

*Egyetemi doktori (PhD) értekezés*

A xenotrópikus egér leukémia vírussal rokon vírus  
(XMRV) proteáz biokémiai karakterizálása

Matúz Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Tőzsér József



Debreceni Egyetem  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola  
Debrecen, 2013

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	6
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	9
2.1. A retrovírusok általános jellemzése.....	9
2.2. A retrovírusok életciklusa.....	12
2.3. Endogén retrovírusok .....	14
2.4. Az egér leukémia vírus jellemzése .....	15
2.5. A xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) jellemzése .....	16
2.6. A HIV-1 proteáz jellemzése .....	19
2.7. A HIV-1 proteáz gátlás lehetőségei.....	21
2.8. Az XMRV proteáz jellemzése és összehasonlítása egyéb retrovirális proteázokkal ....	24
2.9. Célkitűzés .....	28
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	29
3.1. Az XMRV és a HIV-1 proteázok, valamint az MLV Gag $\Delta 2$ fragmentum szubsztrát tisztítása .....	29
3.2. Aktivitás vizsgálat .....	30
<i>Kinetikai paraméterek meghatározása</i> .....	30
3.3. Dimerizációs és urea-disszociációs vizsgálat .....	32
3.4. Gátolhatósági vizsgálatok.....	33
3.4.1. Gátolhatósági vizsgálatok HPLC módszerrel .....	33
3.4.2. Gátolhatósági vizsgálatok SDS-PAGE módszerrel .....	34
3.5. Röntgenkrisztallográfia .....	35
3.6. Molekuláris modellezés .....	35
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK</b> .....	37
4.1. Enzimkinetikai és stabilitási vizsgálatok .....	37
4.1.1. XMRV proteáz kinetikai vizsgálata HPLC módszerrel.....	37
4.1.2. XMRV és HIV-1 proteázok dimerizációs és urea-disszociációs vizsgálata .....	38
4.2. Gátolhatósági vizsgálatok .....	39
4.2.1. Gátolhatósági vizsgálatok HPLC módszerrel .....	39
4.2.2. Gátolhatósági vizsgálatok SDS-PAGE módszerrel .....	41
4.2.2.1. MLV Gag $\Delta 2$ fragmentum szubsztrát előállítás.....	41
4.2.2.2. MLV Gag $\Delta 2$ fragmentum szubsztrát hasítása és gátlása .....	42
4.3. Röntgenkrisztallográfia és molekuláris modellezés .....	44

4.3.1. XMRV enzim-inhibitor kölcsönhatás vizsgálata.....	44
4.3.2. Az XMRV és a HIV-1 proteázok pepsztatin A és acetyl-pepsztatin inhibitorokkal való kölcsönhatásának vizsgálata.....	46
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>54</b>
<b>5. SUMMARY .....</b>	<b>55</b>
<b>6. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>56</b>
<b>7. TÁRGYSZAVAK.....</b>	<b>74</b>
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>75</b>
<b>9. FÜGGELÉK.....</b>	<b>76</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ATL	felőtt T-sejtes leukémia/limfóma
BST-2	csontvelő stroma antigén 2
CA <sup>1</sup>	kapszid protein
CFS	krónikus fáradtság szindróma
CWR22	humán elsődleges prosztatatarák sejtvonala
Ddi1	DNS károsodás által indukálódó protein
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitól, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-1,4-bis-szulfanilbután-2,3-diol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
<i>env</i>	retrovírusok envelop proteinjét kódoló gén, envelop
ERV	endogén retrovírus
FIV	macska immundeficiencia vírus
<i>gag</i>	retrovírusok szerkezeti fehérjéjét kódoló csoportspecifikus antigén
HAM	HTLV-1 asszociált mielopátia
HERV	humán endogén retrovírus
HIV	humán immundeficiencia vírus
HIV-1	1-es típusú humán immundeficiencia vírus
HIV-2	2-es típusú humán immundeficiencia vírus
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográf
HTLV	humán T-limfotróp vírus
IC <sub>50</sub>	50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció
IN <sup>1</sup>	integráz
Inh	inhibitor
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
KARVnL↓F(NO <sub>2</sub> )EAnL-NH <sub>2</sub>	Lys-Ala-Arg-Val-nLeu↓ <i>p</i> -nitroPhe-Glu-Ala-nLeu-amid
LC <sub>50</sub>	halálos dózis félértéke
LTR	hosszú, terminálisan ismétlődő szakasz
MA <sup>1</sup>	mátrix protein
MBP	maltózkötő fehérje
MLV	egér leukémia vírus
nLeu	norleucin
P1, P2, P3, stb. <sup>1</sup>	szubsztrát aminosavrésze
PIC	preintegrációs komplex
Pipes	piperazin-N, N'-bisz(2-etánszulfonsav)
<i>pol</i>	retrovírusok enzimjeit kódoló gén, polimeráz
PR <sup>1</sup>	retrovirális proteáz
RP	fordított fázisú
RT <sup>1</sup>	reverz transzkriptáz
SDS PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

SIV	majom immundeficiencia vírus
S1, S2, S3, stb. <sup>2</sup>	szubsztrátkötő alhelyek
SU <sup>1</sup>	sejtfelszíni protein
Tat	transzkripció aktivátor
TFA	trifluor-ecetsav
TSP	tropus spasztikus paraparézis
PC	prostatata karcinóma
Rev	splicing szabályozó
XMRV	xenotropikus egér leukémia vírussal rokon vírus

---

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

<sup>2</sup>A szubsztrátkötő alhelyek és az alhelyekre bekötődő szubsztrát aminosavrészek elnevezése Schechter és Berger (1967) szerint. A szubsztrát aminosavész oldalláncok a hasítási helytől N-terminális felé haladva P1, P2, P3, stb., míg a C terminális felé haladva P1', P2', P3', stb., vannak jelölve. A megfelelő szubsztrátkötő alhelyek jelölése S1, S2, S3, stb., illetve S1', S2', S3', stb.

## 1. BEVEZETÉS

A retrovírusok létezése már a múlt században ismert volt, azonban a humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV-1) illetve a szerzett immunhiányos tünetegyüttest (AIDS-t) okozó vírus, a 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) felfedezéséig nem tudtak olyan retrovírusokról, amelyek képesek az embert megfertőzni. Mára azonban már bizonyított, hogy a retrovírusok a gerincesek bármely osztályát megfertőzhetik, a fertőzés kimenetele különböző lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, anémia, immunhiány illetve idegrendszeri elváltozásokat is okozhatnak.

Az endogén retrovírusok olyan RNS vírusok, amelyek DNS kópiájukat beintegrálták a gazda ivarsejt DNS-ébe, az integrálódott kópia generációról generációra öröklődik, endogén elemként van jelen. A legtöbb endogén elem esetén a mutációk következtében a replikációhoz szükséges fehérjék funkcióképtelenné váltak. Néhány egér endogén elem azonban mégis aktív és replikációra képes. Azokat az egér endogén retrovírusokat, amelyek képtelenek megfertőzni az egér gazdasejtet, de más gazdasejtet képesek, a sejtreceptor tropizmusuk alapján nevezték xenotrópikusnak.

A xenotrópikus egér leukémia vírussal rokon vírust (XMRV) 2006-ban humán prosztatatarákos (PC) mintából izolálták, később kapcsolatba hozták a krónikus fáradtság szindrómával (CFS) is, így a tudományos érdeklődés középpontjába került. A kimutatási módszerek érzékenységének növekedésével bebizonyosodott, hogy vizsgálatok jelentős része fals pozitív eredményt adott, mivel az azonosított egér leukémia vírussal (MLV) rokon szekvencia a kereskedelemben forgalmazott egér DNS-sel szennyezett laborreagensekből származott. Kísérleteket folytattak humán prostata tumor xenograft modellben (CWR22), amelyben két korábban nem azonosított endogén egér retrovírus (PreXMRV-1 és PreXMRV-2) rekombinálódásából fertőzőképes XMRV jött létre. A két provírusból (PreXMRV-1 és PreXMRV-2) az egér gazdaszervezetben rekombináció által olyan XMRV keletkezett, amely képes volt megfertőzni a humán prostata tumor sejtvonalat. A rekombinációval keletkező vírusok létrehozhatnak olyan humán patogéneket, mint például a HIV-1, ami a csimpánzból származik (csimpánz eredetű majom immundeficiencia vírus, SIV cpz), két különböző SIV rekombinációjából jött létre és terjedt át az emberre. A retrovírus rekombinációknak nagy hatása van a vírus drogrezisztencia evolúciójára, az immunrendszer megtévesztésére, a szövet-tropizmusára és a gazdaszervezetek számának növekedésére is. Az XMRV-t ugyan szennyeződésként azonosították, de máig sok publikáció születik, amelyekben összefüggésbe hozzák a tumorképződéssel.

Mint minden retrovírus, így az XMRV élekciklusában is kulcsszerepet tölt be a virális proteáz (PR), mely a virális prekursor fehérjék funkcionális részekre történő hasítását végzi, ezért a proteáz fontos kemoterápiás célpont. A proteázok ellen tervezett inhibitorok segítségével nem kívánt élettani hatásuk megakadályozható vagy csökkenthető.

Munkacsoportunk a retrovirális proteázok vizsgálatára fókuszál, számos proteáz esetén folyadékromatográfiás módszerrel vizsgálták az enzimek kinetikai paramétereit, az enzim gátlási profilját, a proteázok szubsztrátspecificitását. A kísérletes eredményeket bioinformatikai eszközök segítségével és szerkezeti biológiai adatokkal is alátámasztották.

Az egér leukémia vírus (MLV) proteáz jól alkalmazható a retrovírusok állatmodelljeként, valamint a génterápiában betöltött szerepe is jelentős, mivel a klinikai alkalmazásba került retrovirális vektorok közül a HIV-1-en alapulóak mellett az egér leukémia vírus módosításával kifejlesztett vektorok a legjelentősebbek. Ezért munkacsoportunk részletesen tanulmányozta az MLV proteázt. A proteináz homológ modellje rendelkezésünkre állt, amelyet Modeller 3 program segítségével a HIV-1 proteináz kristályszerkezetén alapulva építettek fel.

Az XMRV-nek, mint egy újonnan azonosított vírus proteázának vizsgálatát 2011-ben kezdtem meg, mely vírust azonban később egy laboratóriumban keletkezett artefaktumként azonosítottak. Az XMRV proteáz inhibitorral alkotott kristályszerkezete szintén nem volt ismert. Kollaborációban az amerikai Alexander Wlodawer által vezetett Makromolekuláris Krisztallográfiás Laboratórium munkatársaival (National Cancer Institute- Frederick National Laboratory of Cancer Research, USA) vizsgáltuk az általuk előállított és tisztított XMRV proteáz biokémiai jellemzőit. Az XMRV proteáz inhibitor komplexek kristályszerkezet vizsgálatát kollaborációs partnerünk végezte.

Mivel az XMRV szekvenciája igen nagy hasonlóságot mutat az MLV proteináz szekvenciájával, mely proteáz kristályszerkezete a mai napig sem került meghatározásra, így az XMRV proteáz kristályszerkezetének meghatározása jelentős az MLV proteázra vonatkozó szerkezeti információk szempontjából is. Az enzim-inhibitor kristályszerkezetének részletes ismerete, valamint a szubsztrátkötő zsebeket alkotó aminosavak feltérképezése és a kialakuló kölcsönhatások vizsgálata által kívántunk hozzájárulni az XMRV illetve gammaretrovírus alcsaládra sokkal specifikusabb inhibitorok kifejlesztéséhez.

Doktori tanulmányaim során vizsgáltam az XMRV proteáz kinetikai paramétereit, az enzim gátlási profilját. A kísérleti munka támogatásaként bioinformatikai módszert alkalmaztunk, melyben Dr. Mótyán János nyújtott segítséget, a röntgenkrisztallográfiás eredményekkel együtt próbáltuk értelmezni az inhibitor bekötődés módját két klasszikus

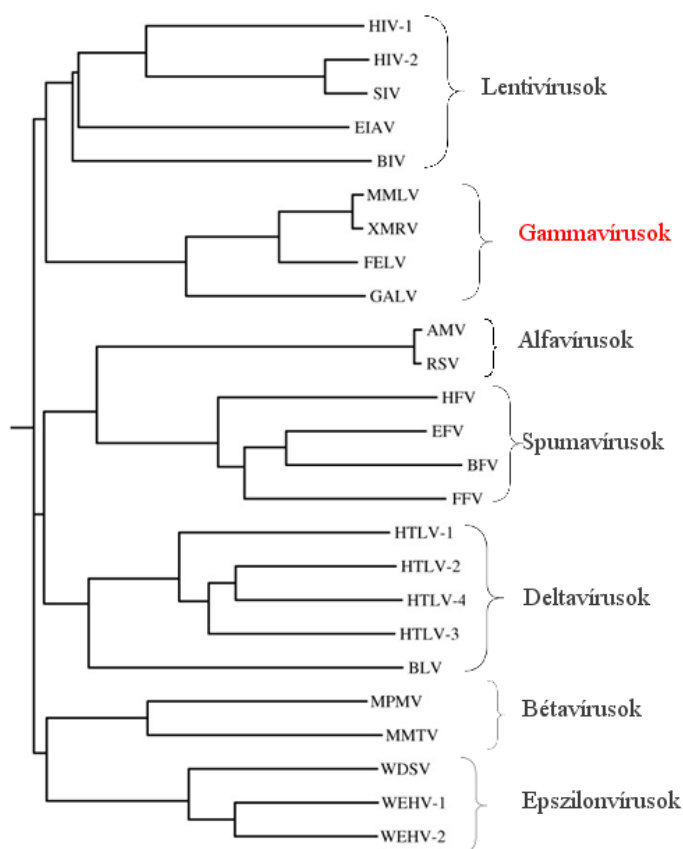
aszpartil proteáz inhibitor (pepszatin A és acetil-pepszatin) esetén, valamint összevetni a HIV-1 proteáz inhibitor bekötődési módjaival.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A retrovírusok általános jellemzése

A retrovírusok olyan pozitív szálú, diploid RNS-genommal rendelkező vírusok, melyek a *Retroviridae* családba tartoznak. Tudományosan bizonyított, hogy a gerincesek bármely osztályát képesek megfertőzni, a betegség nélküli virémián túl a fertőzés következménye lehet daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia vagy immunhiány.

A retrovírusokat hét nemzetségbe sorolták: Alfa-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilonretrovírus, Lenti- és Spumavírus (1. ábra) (Linial és mtsai., 2005). A célsejtek jellege szerint 4 csoportot alkottak (Stoye és Coffin, 1987): az *ekotróp* vírusok (a görög *oikos* szóból származik, jelentése: otthon, hazai, házi) rágcsáló eredetűek; a *xenotróp* vírusok (a görög *xenos* szóból származik, jelentése: idegen), melyek széles körben képesek fertőzni idegen gazdasejtet, míg a *politróp* vírusok (a görög *poly* szóból származik, jelentése: sok), amelyek képesek megfertőzni egér és egyéb sejteket is. A negyedik csoport a módosított politróp vírusokat tartalmazza.

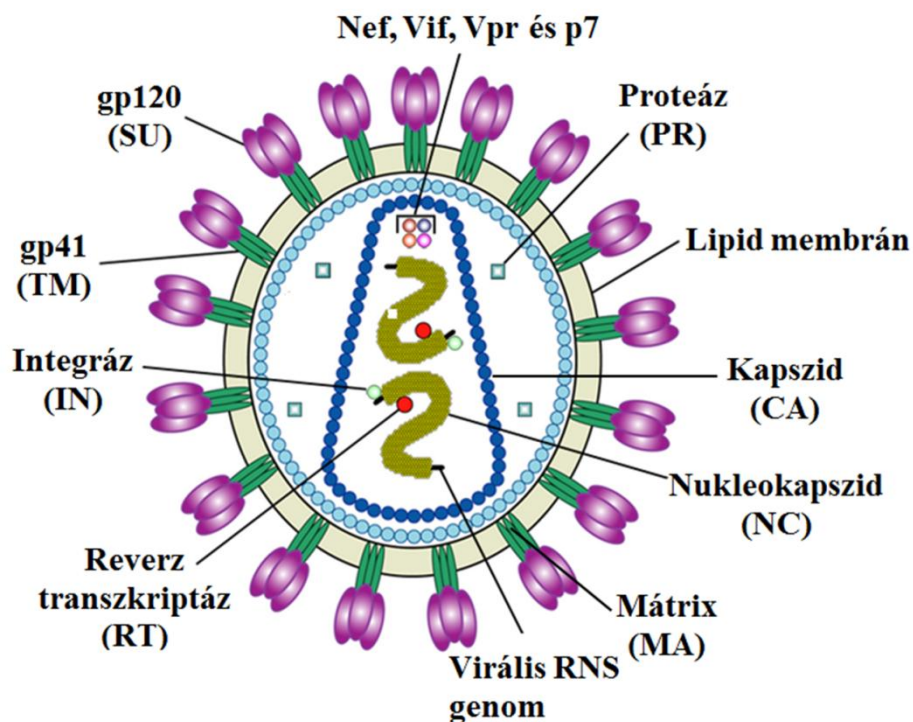


**1. ábra: A retrovírusok filogenetikai fája.** (Készítette: Bagossi Péter)  
Pirossal kiemelve a gammaretrovírus alcsoport, amelybe az MLV és XMRV tartozik.

A retrovírusokat Vilhelm Ellerman és Oluf Bang fedezte fel 1908-ban (Ellerman és Bang, 1908). Az első humán patogén retrovírust, a HTLV-1-t (1-es típusú humán T-limfotróp vírus) 1980-ban Poiesz és munkatársai azonosították (Poiesz és mtsai., 1980). A HTLV-1 fertőzés számos betegséget okozhat, pl. felnőtt T-sejtes leukémiát/limfómát (ATL), trópusi spasztikus paraparézist/HTLV-1 asszociált mielopátiát (TSP/HAM) (Johnson és mtsai., 2001). A HTLV-1 fertőzés egyes területeken endemikus (pl. Japán, Irán, Peru, Kolumbia és a Karib-térség), és a fertőzöttek számát 20 millióra becsülik (Verdonck és mtsai., 2007).

A HTLV-1 felfedezését követte a szerzett immunhiányos szindrómát (AIDS-et) okozó vírus, a HIV-1 (1-es típusú humán immundeficiencia vírus) azonosítása 1983-ban (Barré-Sinoussi és mtsai., 1983, Gallo és mtsai., 1984, Levy és mtsai., 1984). Becslések szerint 2013-ban 35 millióra tehető a HIV-1 fertőzöttek száma, 2,3 millió új HIV fertőzöttet regisztráltak és 1,6 millióan haltak meg valamilyen, az AIDS miatt kialakuló betegségben. Csaknem 13 millióan vesznek részt antivirális terápiában (UNAIDS, 2013).

A retrovírus virionok átmérője 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban (envelope, Env) virális glikoproteinek találhatók. A burokfehérjék heterodimer tripletet tartalmaznak, melyek egy felszíni receptorkötő fehérjéből (SU) és egy ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán (TM) fehérjéből állnak (2. ábra). A belső protein mag mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakja és elhelyezkedése a család különböző fajaiban eltérő. A magban található a nukleokapszid (NC) fehérjével asszociált virális genom, amely az életciklushoz nélkülözhetetlen három enzimet is kódolja: a proteázt (PR), a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt (IN) (Coffin, 1992, 1997).



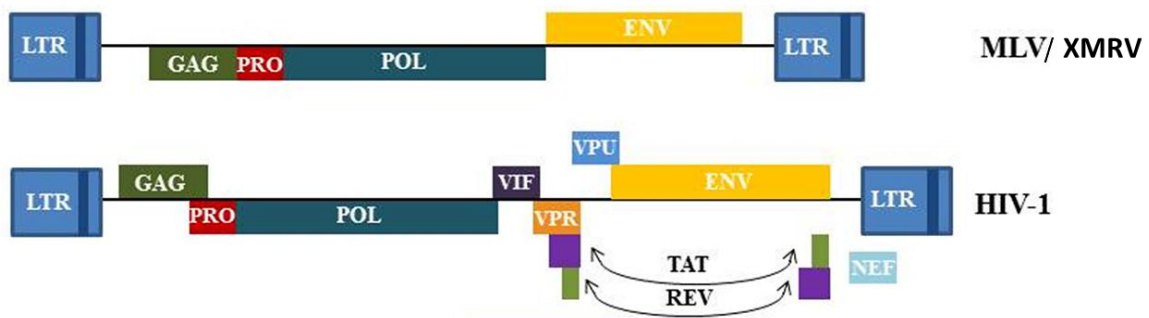
**2. ábra: A HIV-1 virion szerkezete.** (<http://www.stanford.edu> alapján)

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

A HIV-1, a *Lentivirus* genus többi tagjával együtt, összetett genommal rendelkezik (3. ábra), ami azt jelenti, hogy az egyszerű retrovírusokra jellemző géneken kívül egyéb

géntermékeket is kódol (Cullen és Greene, 1990, Pavlakis és Felber, 1990). A Tat és a Rev fehérjék *transz*-aktiváló elemként szabályozzák a HIV-1 génexpressziót (Cullen és Greene, 1990, Pavlakis és Felber, 1990). A Tat fehérje a HIV-1 LTR-specifikus transzkripciójának hatásos aktivátora, ezért erőteljes pozitív visszacsatolást hoz létre. A Tat fehérjének ez a hatása a Rev fehérje felhalmozódását eredményezi, ami meggátolja a többszörösen illesztett, szabályozó mRNS-ek szintézisét és aktiválja az egyszeresen illesztett, a strukturális fehérjéket kódoló mRNS szintézisét (Cullen és Greene, 1990, Kim és mtsai., 1989; Pavlakis és Felber, 1990). A HIV-1 esetében 9 különböző génről több mint 20 eltérő mRNS keletkezik (Cullen és Greene, 1990, Pavlakis és Felber, 1990). Ezek egyike, a Nef protein, korai géntermék, amelynek szabályozó szerepe van. A Vpr, a Vpu és a Vif késői géntermékeknek a morfogenezisben és a vírusok sejtből való kijutásában van szerepük.

A xenotrópikus egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) esetében, melyet 2006-ban izoláltak, a genomszerkezet nagy hasonlóságot mutat az MLV genom szerkezetével (3. ábra).

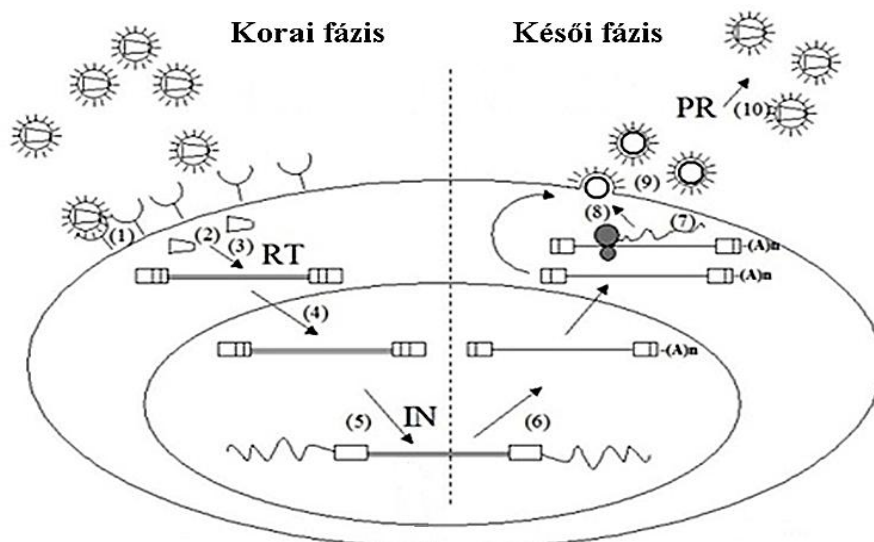


**3. ábra: Az MLV, XMRV és HIV-1 vírusok genomszerkezetének sematikus ábrázolása.** (Cullen és Green 1990 alapján)

## 2.2. A retrovírusok életciklusa

A retrovírusok életciklusa két szakaszra osztható, melyeket korai és késői fázisnak nevezünk. A korai fázis első lépéseként a vírus membránfúzióval vagy receptor közvetített endocitózissal bejut a gazdasejtbe. A reverz transzkripció a belépő kapszid struktúrában történik meg, melyben a pozitív szálú RNS-genom dupla szálú DNS-genommá íródik át. A genomi DNS-ből és a belépő kapszid néhány fehérjekomponenséből preintegrációs komplex (PIC) formálódik, amely bejut a sejtmagba (4. ábra). A legtöbb retrovírus esetében a sejtmagba jutás passzív lépés, így csak osztódó sejteket képesek megfertőzni, melyek sejtmaghártyája nem ép. Azonban a HIV-1 és a *Lentivirus* alcsaládba tartozó egyéb retrovírusok esetében a PIC aktív transzportja lehetővé teszi nem osztódó sejtek fertőzését is

(Tózsér és Oroszlan, 2003). A virális DNS a PIC nélkülözhetetlen részét képező integráz (IN) segítségével beépül a gazdasejt genomjába. A késői fázis első lépése a virális DNS transzkripciója, mely a celluláris RNS-polimeráz II közvetítésével megy végbe. A keletkezett mRNS molekulák egy része módosíthatatlanul elhagyja a sejtmagot és a Gag, illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek templátja lesz a transzláció során, másik része a vírusburokba kerül és az utódvírusok genomjának örökítőanyagként szolgál. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródik át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy celluláris proteáz hatására felületi (SU) és egy transzmembrán (TM) fehérjére hasadnak. Számos, többszörösen illesztett mRNS szolgál a kiegészítő fehérjék, mint a Tat, Rev, Vif, Nef és Vpr szintézisének templátjaként. A Gag fehérjék a gazdasejt membránjának Env proteinekben gazdag részein, a membrán belső felületén csoportosulnak, majd a „fánk-alakú” kapszid struktúrával rendelkező „éretlen” vírusrészecske a „lefűződés” (budding) révén kikerül a sejtől. A vírus a poliproteinek meghatározott helyeken elhasító proteáz aktiválódása után, a processzálas során válik „éretté”, fertőzőképessé. Ekkor a vírusrészecskének tömör, a HIV-1 esetén kúp-alakú belső szerkezete van, MLV esetén ikozaéderes. Mivel csak az „érett” vírusrészecskék fertőzőképesek, a PR működése nélkülözhetetlen a vírus replikáció során (Tózsér, 2003).



**4. ábra: A retrovírusok életciklusa.** (Tózsér és Oroszlan, 2003 alapján).

Korai fázis: (1) Kötődés-penetráció: receptor-antireceptor kölcsönhatás. Endocitózis vagy direkt fúzió. (2) A vírusburok elvesztése pH-függő vagy pH független módon. (3) Provirális DNS-szintézis, melyért a RT felelős. (4) A preintegrációs komplex bejutása a magba. (5) Integráció az IN segítségével

Késői fázis: (6) Provírus expressziója. (7) Transzláció. (8) Vírusrészecske összerendeződése. (9) Vírusrészecske lefűződése. (10) A vírusrészecske „érése” a PR segítségével.

### 2.3. Endogén retrovírusok

Az endogén retrovírusok olyan endogén virális elemek, amelyek retrovírusokból származnak és állkapcsos gerinces (gnathosthoma) genomokban gyakoriak. A retrovírusok replikációs ciklusa a virális genom DNS másolatának “integrációjával” a gazdasejt genomjába történő beilleszkedését vonja maga után. A legtöbb retrovírus ugyan testi sejteket fertőz meg, de a csíravonal (germinális) sejtek (olyan sejtek, amelyek petesejteket és spermát termelnek) esetenkénti fertőződése is előfordulhat, életképes szervezet kifejlődésével. Ez az organizmus fogja hordozni az inzertálódott retrovirális genomot, mint saját genomjának szerves részét, egy “endogén” retrovírust (ERV), amelyet utódja mint egy új allélt fog örökölni. Sok ERV fennmaradt gazdája genomjában évmilliókon keresztül. Azonban legtöbbjük inaktíváló (hatástalanító) mutációt szenvedett a gazda DNS replikációja során és többé nem képes a vírustermelésre. Az ERV-k képesek továbbá részlegesen kihaladni (kilépni) a genomból egy rekombinációs delécióval, amelyben az azonos, az újonnan integrálódott retrovírusokkal szomszédos szekvenciák közötti rekombináció a virális genom belső, protein-kódoló régióinak törlődését eredményezi.

Az endogén retrovírusok aktív szerepet játszhatnak a genomok kialakulásában. A legtöbb tanulmány fókuszában az ember és a főemlősök genomjai állnak, de más gerinceseket is, mint például az egerek és juhok genomját is mélyrehatóan tanulmányozták (Li és mtsai., 2012, Spencer és mtsai., 2012, Black és mtsai., 2010, Ryan és mtsai., 2004). Az ERV genomokkal szomszédos hosszú terminális ismétlődő (LTR) szekvenciák gyakran promotereként és enhanszereként felváltva működnek. Továbbá a retrovirális proteinek feladata, hogy az új gazdasejt funkcióit elősegítsék, különösen a reprodukciót és a fejlődést. A homológ retrovirális szekvenciák közötti rekombináció szintén közreműködik a génkeveredésben és a genetikai változatok generálásában. Az egyedülálló LTR-ekkel és a teljes retrovirális szekvenciákkal összekapcsolódott LTR-ekkel kapcsolatban kimutatták, hogy a gazda génekben, mint transzkripciós elemek szerepelnek. Ezek működése főleg a proteinkódoló gének 5' UTR –be való inzertálására terjed ki (Li és mtsai., 2012, Pi és mtsai., 2010, van de Lagemaat és mtsai., 2003, Kovalskaya és mtsai., 2006). Ezen elemek többsége a pozitív (szensz) szál irányában inzertálódik a neki megfelelő génhez, de azonosítottak olyan LTR-eket is, amelyek a negatív (antiszensz) irányban működnek, illetve a szomszédos gének kétirányú promotereként is (Gogvadze és mtsai., 2009). Néhány esetben az LTR a gén fő promotereként funkcionál. Például a humán AMY1C tartalmaz egy teljes ERV szekvenciát a

promóter régiójában; az összekapcsolódott LTR elősegíti egy emésztő enzim, az amiláz nyálspecifikus expresszióját (Ting és mtsai., 1992).

Az ERV-k többsége, amely a gerincesek genomjaiban fordul elő, ősi, a mutáció által inaktivált és elérte a genetikai fixáció állapotát a gazdafajban. A madarak és nem-humán emlősök esetében - beleértve az egereket, a macskákat és koalákat is - bizonyított, hogy a legújabban integrálódott ERV szekvenciák összefüggésbe hozhatóak különböző betegségekkel.

Továbbá feltételezhető, hogy az ERV-nek szerepe van a humán rákos megbetegedés számos formájában és autoimmun betegségekben (Bannert és mtsai., 2004, Nelson és mtsai., 2003, Singh és mtsai., 2007), kapcsolatba hozták a sclerosis multiplex-szel (SM), valamint HERV antitesteket azonosítottak skizofrén emberek vérmintáiban is.

A humán endogén retrovírus (HERV) provírusok a humán genom egy jelentős részét adják: megközelítőleg 98,000 ERV elemmel és töredékekkel a teljes genom csaknem 8%-át teszik ki (Belshaw és mtsai., 2004). A legtöbb HERV csupán az eredeti vírusok maradványa, amelyek először évmilliókkal korábban integrálódtak. Azonban a vírusok egy családja az emberek és a csimpánzok szétválása óta aktív.

Azt feltételezik, hogy a HIV a HERV-expresszióját indukálja HIV-fertőzött sejtekben, ezért a HERV antigéneket célzó oltóanyag alkalmas lehet a HIV-fertőzött sejtek megsemmisítésére (Garrison és mtsai., 2007).

#### **2.4. Az egér leukémia vírus jellemzése**

Az egér leukémia vírus (MLV) a gammaretrovírus család képviselője (Regenmortel és mtsai., 2000) (1. ábra), amelyet először BALB/c egerek szarkómájából izoláltak (Moloney és mtsai., 1960), innen származik a Moloney egér leukémia vírus (MMLV) elnevezés. Újszülött egerekben a vírus három hónap alatt limfoid leukémiát idézett elő.

Az MLV egyláncú, diploid genomja három, a vírusfertőzéshez és replikációhoz szükséges gént tartalmaz, 5'-*gag-pol-env*-3' sorrendbe rendeződve (3. ábra). Ezeknek a géneknek az expressziója három poliprotein, a Gag (Pr65<sup>gag</sup>), a Gag-Pro-Pol (Pr180<sup>gag-pro-pol</sup>) és az Env (gPr85<sup>env</sup>) képződéséhez vezet. A Gag poliprotein négy domént tartalmaz, melyek megfelelnek a vírus fő szerkezeti fehérjéinek: p15 (MA), p12, p30 (CA) és p10 (NC), amelyek a prekursor fehérje vírus proteináz által katalizált proteolitikus processzáásával válnak szabaddá (Oroszlan és mtsai., 1978). A Gag-Pro-Pol poliprotein szintézise a *gag* terminátor azonos leolvasási keretben történő szupressziójával valósul meg (Yoshinaka és

mtsai., 1985) és a processzálást követően a szerkezeti fehérjék mellett a virális enzimek (PR, RT és IN) megjelenését is eredményezi. Az illesztett mRNS-ről átíródó Env fehérje először glikolizálódik, majd a Golgi-ból a plazmamembránba való transzport során megfelelő celluláris proteázok által egy felületi glikoproteinre (SU, gPr70) és egy transzmembrán fehérjére (TM, Pr15(E)) hasítódik. A transzmembrán fehérje a virális proteáz segítségével tovább processzálódik p12(E) és p2(E) fehérjékre (Katoh és mtsai., 1985, Schultz és mtsai., 1985, Crawford és mtsai., 1985). Ez a hasítás az MLV Env fehérje membránfúziós képességének kialakításához szükséges, így esszenciális a vírus fertőzőképessége szempontjából (Rein és mtsai., 1994).

## **2.5. A xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) jellemzése**

A xenotrópikus egér leukémia vírussal rokon vírus egy laboratóriumban keletkezett gammaretrovírus, ami két egér leukémia vírus rekombinációja során jött létre az 1990-es években. A kimerikus vírust 2006-ban azonosították (Urisman és mtsai., 2006), mint új retrovírust, amelyről feltételezték, hogy humán patogén. A közleményt azonban visszavonták, mivel bebizonyosodott, hogy vagy a minták vagy pedig a laboratóriumi PCR reagensek szennyezettek voltak egér retrovírus szekvenciákkal (Urisman és mtsai., 2012).

Az XMRV vírus genomja nagyfokú rokonságot mutat egy gammaretrovírossal (3. ábra), a xenotrópikus egér leukémia vírussal (murine leukemia virus; MLV), innen ered az XMRV elnevezés. A xenotrópikus egér leukémia vírusok képesek megfertőzni más, magasabb rendű gerinceseket az XPR1 receptorokon keresztül (Battini és mtsai., 1999, Taylor és mtsai., 1999, Yang és mtsai., 1999).

Számos tanulmányban beszámoltak arról, hogy XMRV-t azonosítottak prosztatatarákos betegekből származó mintákban, de német kutatók megcáfolták ezt az állítást, mert nem azonosítottak XMRV specifikus szekvenciákat a páciensek DNS illetve RNS mintáiban és a betegek szérum mintáiban sem (Hohn és mtsai., 2009). Hasonló eredményekről számoltak be Hollandiában (Verhaegh és mtsai., 2011), Japánban (Furuta és mtsai., 2011) és Mexikóban is (Martinez-Fierro és mtsai., 2010). Az Egyesült Államokban 1000 prosztatatarákos páciens mintáját vizsgálta három intézet: a National Cancer Institute (Menéndez-Arias és mtsai., 2011), a Johns Hopkins (Aloia és mtsai., 2010) és a Mayo Clinic (Sfanos és mtsai., 2008), de egyik vizsgálat sem talált XMRV vírust a mintákban.

Feltételezik, hogy az XMRV-nek szerepe lehet a rák kialakulásában, ez azonban még nem bizonyított (Lee és mtsai., 2010). Az erre vonatkozó közlemények ellentmondások.

XMRV eredetű proteint azonosítottak prosztatákban és nem rosszindulatú stroma sejtekben, ezt azonban egy másik tanulmány cáfolta. Ebben a tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy a vírus feltehetően nem közvetlenül támogatja a tumorgenezist (McLaughlin-Drubin és mtsai., 2008). Egy másik vizsgálat során XMRV proteint és nukleinsavakat azonosítottak rosszindulatú sejtekben (Lee és mtsai., 2010, Schlaberg és mtsai., 2009).

Az XMRV-t kapcsolatba hozták egy másik betegséggel, a krónikus fáradtság szindrómával (CFS) is (Lombardi és mtsai., 2009). A CFS-ban szenvedő betegek 67%-ában mutatták ki az XMRV-t, míg az egészséges kontrollcsoport 3,7%-ában. Ebben az esetben is bebizonyosodott, hogy a laborvizsgálatok fals pozitív eredményt adtak (Erlwein és mtsai., 2011a, Sfanos és mtsai., 2011, Wolff és Gerritzen, 2011). Tuke és munkatársai megállapították, hogy a kereskedelmi forgalomban levő RT-PCR reagenseket (polimeráz enzim, puffer) szennyező MLV szekvenciák nagymértékben hasonlítottak a Lo és munkatársai által 2010-ben leírt, humán CFS-es mintákból izolált politropikus MLV szekvenciákhoz (Tuke és mtsai., 2011). Egymástól független laboratóriumok vizsgálták a CFS-es betegek mintáit, nem találtak XMRV-t a betegekből származó vérminták esetén (Erlwein és mtsai., 2010, Groom és mtsai., 2010, van Kuppeveld és mtsai., 2010, Switzer és mtsai., 2010, Henrich és mtsai., 2010, Hong és mtsai., 2010, Hohn és mtsai., 2010, Satterfield és mtsai., 2011, Erlwein és mtsai., 2011b, Furuta és mtsai., 2011), sem pedig az agygerincvelő folyadék minták esetében (Schutzer és mtsai., 2011).

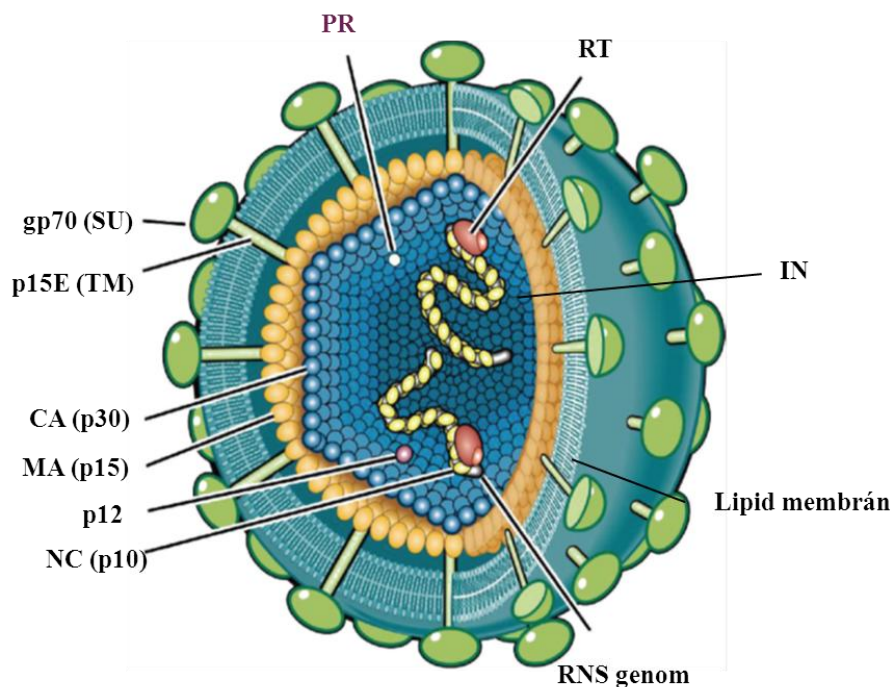
Az XMRV-t összefüggésbe hozták továbbá autizmussal, fibromyalgiával, sclerosis multiplexel, amyotrópikus laterális sclerosissal és Parkinson kórral is. Több kutatócsoport megkísérelte kimutatni ezen betegségek esetében az XMRV-t, de nem volt jelen a vírus autista gyermekek (230 beteg) mintáiban és a kontroll mintákban sem (204 beteg) (Satterfield és mtsai., 2010). Fibromyalgiában szenvedő betegekből származó mintákban sem sikerült a vírust kimutatni (Luczkowiak és mtsai., 2011), és MS betegek mintáiban sem volt jelen (Maric és mtsai., 2010), valamint idiopatikus betegségben szenvedő gyerekek esetén sem (Jeziorski és mtsai., 2010) lehetett azonosítani.

Immunkompetens és immunhiányos személyek légútjából is kimutatták az XMRV-t (Fischer és mtsai., 2010), az immunkompetens egyének 2-3%-a, míg az immunhiányos betegek kb. 10%-a hordozta légútjaiban a vírust, de egy másik tanulmány ebben az esetben is cáfolta az XMRV jelenlétét (Barnes és mtsai., 2010).

A különböző tanulmányok mind alátámasztják a szennyeződés hipotézisét (Smith és mtsai., 2010). A kutatók megállapították, hogy a laboratóriumi reagensek (Sato és mtsai., 2010, Robinson és mtsai., 2010), a szövetminták (Sato és mtsai., 2010) és a vérminták (Oakes

és mtsai., 2010) is tartalmazták a szennyeződést. Amikor egy minta XMRV-re pozitívnak bizonyult, kiderült, hogy egér DNS-sel volt szennyezve (Sakuma és mtsai., 2011). Egy másik cikk beszámol arról, hogy az azonosított XMRV genomi szekvencia nagy hasonlóságot mutat a különböző humán sejtvonalakban levő xenotrópikus egér leukémia vírusokhoz (Hué és mtsai., 2010).

Az XMRV keletkezését is azonosították: két, korábban nem azonosított endogén egér retrovírus (PreXMRV-1 és PreXMRV-2) rekombinálódásából keletkezett, miközben a humán prosztatarák tumor xenograftot (CWR22) *in vivo* passzálták egerekben (Paprotka és mtsai., 2011). A két vírusból (PreXMRV-1 és PreXMRV-2) az egér gazdaszervezetben rekombináció által jött létre a vírus, ami képes volt megfertőzni a humán sejtvonalat. A PreXMRV-1 és PreXMRV-2 szekvenciákat azonosították, és úgy találták, hogy ezek a szekvenciák 99,92%-ban azonosak az XMRV szekvenciával. Az XMRV vírus felépítését mutatja az 5. ábra.



**5. ábra: Az XMRV virion felépítése.** (Kang és mtsai., 2011 alapján).

A rekombinációval keletkező vírusok azonban létrehozhatnak humán patogéneket, mint például a HIV-1 esetében, ami csimpánz eredetű (SIV cpz), és két különböző SIV rekombinációjából jött létre és terjedt át az emberre. A retrovírus rekombinációknak nagy hatása van a vírus drogrezisztencia evolúciójára, az immunrendszer megtévesztésére, szövet tropizmusára és a gazdaszervezetek számának növekedésére.

Az MLV-alapú vektorok használata igen széles körben elterjedt, mivel képesek megfelelő pszeudotipizálással csaknem az összes gerinces, sőt néhány gerinctelen organizmus sejtjeit is megfertőzni. A vektorok olyan virionok, melyeknek a saját genomja nagy részben el lett távolítva és helyette a terápiás gént tartalmazza, így az integráció után nem íródnak át virális fehérjék, így nem képződnek fertőzőképes virionok sem, a bejuttatott gén csak a fertőzött sejtben és annak leánysejtjeiben marad fent. Dong és munkatársai bebizonyították, hogy az XMRV képes helper-vírusként viselkedni, mobilizálni egy MLV-alapú konstrukciót (LNCE) és megfertőzni újabb sejteket (Dong és mtsai., 2008).

Az MLV proteáz jól alkalmazható a retrovírusok állatmodelljeként, valamint a génterápiában betöltött szerepe is jelentős, mivel a klinikai alkalmazásba került retrovirális vektorok közül a HIV-1-en alapulóak mellett az egér leukémia vírus módosításával kifejlesztett vektorok a legjelentősebbek. Ezért munkacsoportunk részletesen tanulmányozta az MLV proteázt. Az MLV proteináz kristályszerkezete nem, homológ modellje azonban rendelkezésünkre állt, amelyet korábban a HIV-1 proteináz kristályszerkezetén alapulva építettek fel.

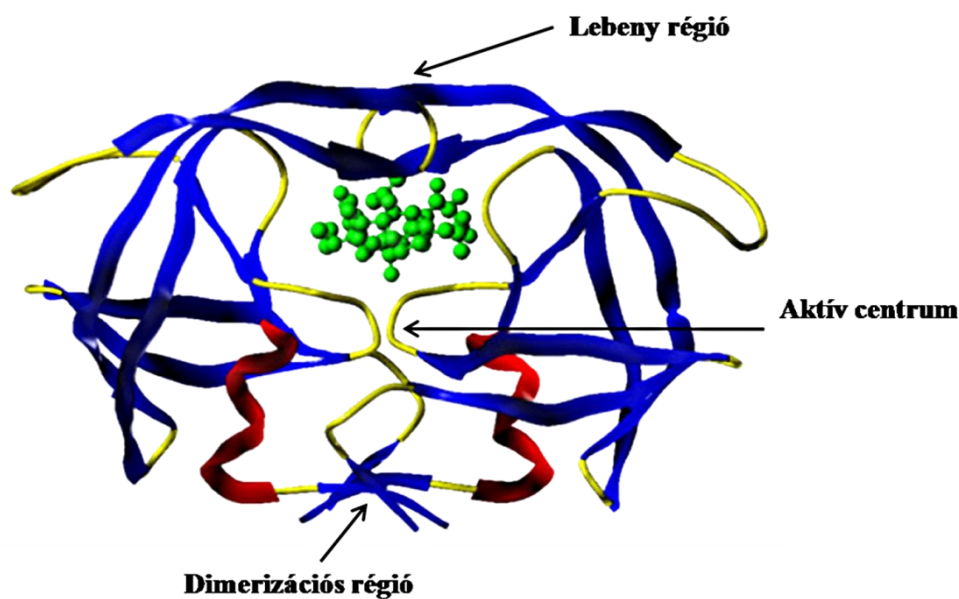
Mivel az XMRV szekvenciája igen nagy hasonlóságot mutat az MLV proteináz szekvenciájával, és a proteáz kristályszerkezete a mai napig sem került meghatározásra, így az XMRV proteáz kristályszerkezetének meghatározása jelentős az MLV proteázra vonatkozó szerkezeti információk szempontjából. Az enzim-inhibitor kristályszerkezetének részletes ismerete, valamint a szubsztrátkötő zsebeket alkotó aminosavak feltérképezése és a kialakuló kölcsönhatások vizsgálata jelentősen hozzájárulhat az XMRV illetve gammaretrovírus alcsaládra sokkal specifikusabb inhibitorok kifejlesztéséhez.

## **2.6. A HIV-1 proteáz jellemzése**

A retrovirális proteázok 99-138 aminosavrészből álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék, amelyek több, aszpartil proteázokra jellemző tulajdonságot mutatnak, ilyen például a pepsztatinnal való gátolhatóság és a katalitikus aszpartát mutációjával előidézhető enzimaktiváció. Azonban a két, topológiailag hasonló, de mégsem teljesen azonos domént hordozó egyláncú celluláris aszpartil proteázoktól (renin, pepszin) eltérően a retrovirális aszpartil proteázok, azaz a retropepszinek két azonos alegységből felépülő, dimer formában működő enzimek. A retrovirális proteázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg (Toh és mtsai., 1985), számos  $\beta$ -redőt és

enzimtől függően alegységenként egy vagy két rövid  $\alpha$ -hélixet tartalmaznak. A két alegység N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy többrétegű antiparallel  $\beta$ -redőt.

A HIV-1 proteázt három jellegzetes régióval jellemezhetjük: az aktív centrum, a lebeny (flap) és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált régió. Az aktív centrumot alkotó katalitikus triád (Asp-Thr-Gly) az N-terminális közelében helyezkedik el (6. ábra). Az alegységek katalitikus triádjai hurokrégióban helyezkednek el, amely analóg a celluláris aszpartil proteázokra leírt  $\psi$ -struktúrával (Oroszlan és Tózsér, 1990). A katalitikus triád aminosavrészei hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz (Davies, 1990, Wlodawer és Erickson, 1993), amit tűzoltófogásnak („fireman’s grip”) neveznek, utalva a kötés geometriájára és erős jellegére. A flexibilis lebeny régió többé-kevésbé konzervált (Miller és mtsai., 1989a, Navia és mtsai., 1989), a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, ezáltal stabilizálva a komplexet (Miller és mtsai., 1989b, Swain és mtsai., 1990, Jaskolski és mtsai., 1991). A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ionpárok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.



**6. ábra:** A HIV-1 proteáz kristályszerkezetére alapított szalagmodell. (Készítette: Dr. Bagossi Péter.) Pirossal jelölve az  $\alpha$ -hélixeket, kézzel a  $\beta$ -redőket, sárgával a hurok régiókat. A bekötődött szubsztrátot zöld színű gömb és pálcika ábrázolással mutatjuk be.

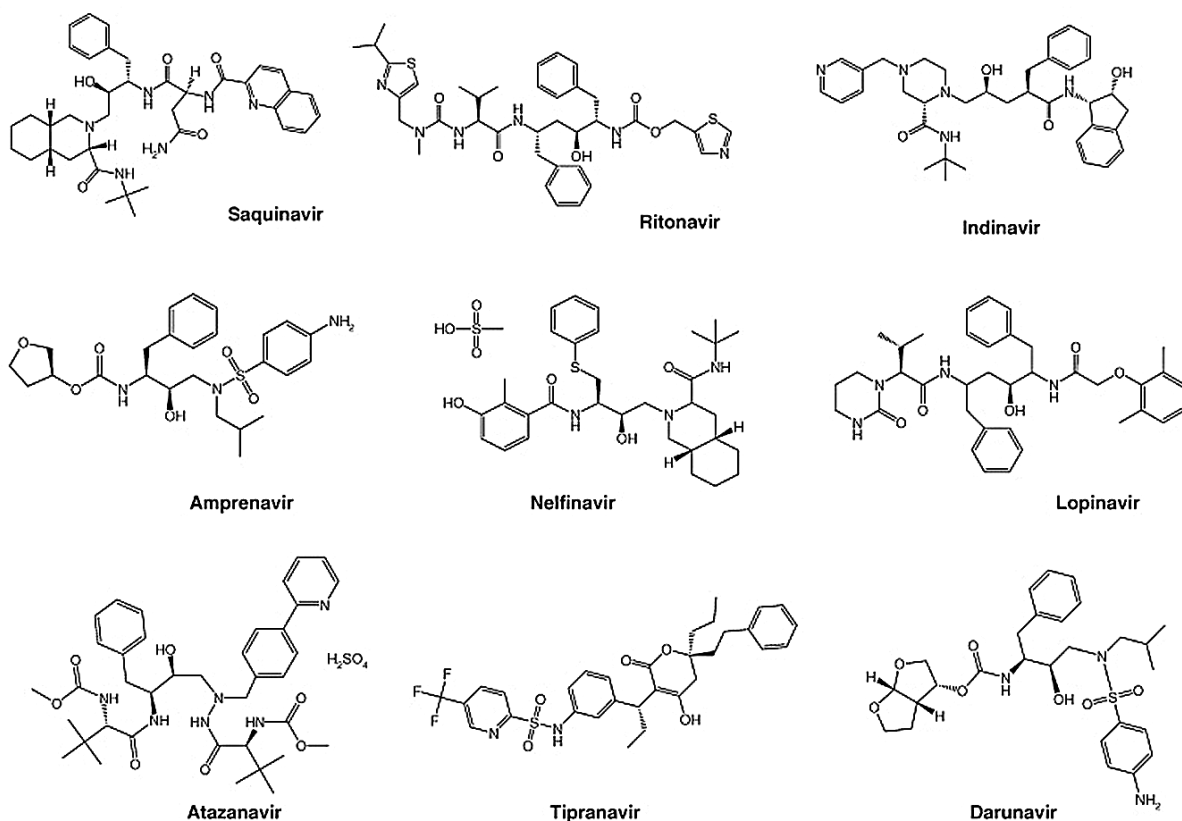
A HIV-1 PR savas pH-jú (4,5-6,5) környezetben mutatja a legnagyobb aktivitást (Grinde és mtsai., 1992) és a celluláris aszpartil proteázokhoz hasonlóan *in vitro* nagy

ionerősség (1-2 M NaCl) mellett is aktív (Kotler és mtsai., 1989). A proteáz pontos hasítási helyeit a virális poliprotein szekvenciájának ismeretében és az érett fehérjék N- és C-terminális szekvenciáinak meghatározásával azonosították. A hasítási helyek összehasonlításával nem találtak konszenzus szekvenciát, de elmondható, hogy a szekvenciák többnyire hidrofób jellegűek. Az a felfedezés, hogy kis szintetikus peptidek szubsztrátként vagy inhibitoroként funkcionálhatnak, megkönnyítette a proteázok specificitásának részletes tanulmányozását (Katz és Skalka, 1994). A HIV-1 PR esetén legalább héttagú oligopeptid szükséges a felismeréshez és a hasításhoz. A rövidebb, nem hasítható peptidek kompetitív gátlószerként használhatók lehetnek (Kotler és mtsai., 1988, Roberts, 1990, Tözser és mtsai., 1991).

## **2.7. A HIV-1 proteáz gátlás lehetőségei**

A klinikumban jelenleg alkalmazott kilenc HIV-1 PR inhibitor neve és szerkezete látható az 7. ábrán. A tipranavir kivételével mindegyik inhibitor szerkezete a HIV-1 PR természetes hasítási helyének szerkezetére hasonlít. Közös tulajdonságuk, hogy P1 pozícióban fenil csoportot hordoznak és egy nem hidrolizálódó, átmeneti állapotot mimikáló csoportot (pl. hidroxietilamin) tartalmaznak a hasítandó kötésnek megfelelő helyen (Menendez-Arias és Tözser, 2008).

A kismolekulájú inhibitorok (7.ábra) alkalmazásánál számolni kell a kombinált terápia (HAART, highly active anti-retroviral therapy) mellékhatásainak kialakulásával, pl. inzulin rezisztencia, lipodisztrófiás szindróma vagy érelmeszesedés (Tözser, 2001, Rudich és mtsai., 2005). Továbbá, a kismolekulájú inhibitorokkal szemben a reverz transzkriptáz hibajavító funkciójának hiánya miatt gyorsan rezisztencia fejlődik ki, és az egyik inhibitorral történő kezelés során megjelenő rezisztens törzsekre gyakran más inhibitorok is hatástalanok lesznek (Swanstrom és Eron, 2000, Barbaro és mtsai., 2005). Az aktív centrumot (Yehia és mtsai., 2004), a dimerizációs felszínt (Schramm és mtsai., 1991, 1999, Caflisch és mtsai., 2000, Hwang és Chmielewski, 2005) vagy a lebeny régiót (Rezacova és mtsai., 2002, Sperka és mtsai., 2005) célzó, nem peptidszerű gátlószerek új lehetőséget jelenthetnek az AIDS elleni küzdelemben.



**7. ábra: Az AIDS-terápiában alkalmazott HIV-1 proteináz inhibitorok.** (Ábra forrása: Menendez-Arias és Tózsér, 2008).

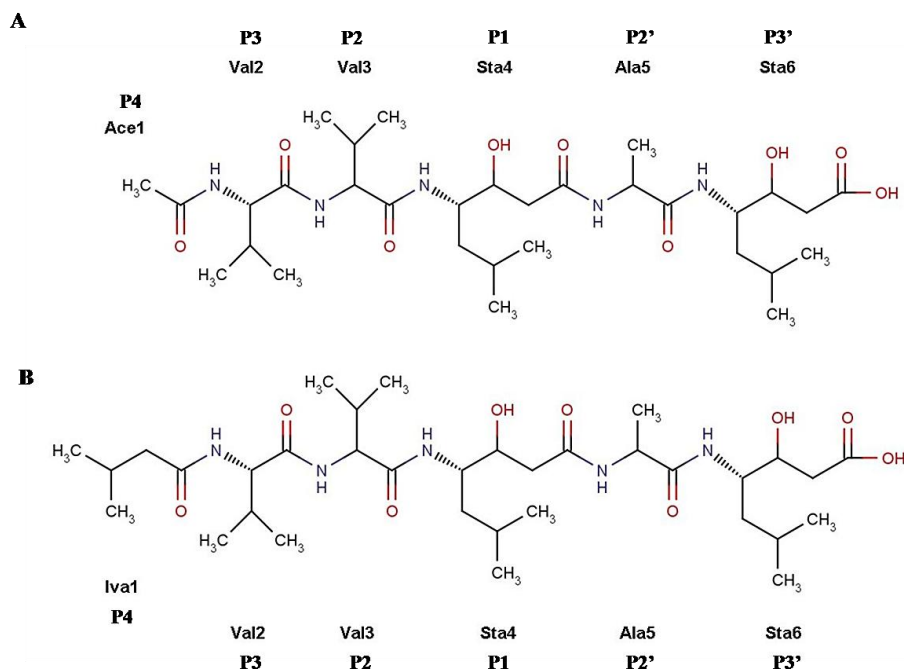
A dimer formában aktív proteázok makromolekuláris inhibitorokkal is gátolhatóak, melyek nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé lehetnek érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkra (Babe és mtsai., 1995, McPhee és mtsai., 1996, Rozzelle és mtsai., 2000, Todd és mtsai., 2000b). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a defektív PR monomerek tervezése és a fertőzött sejtekben történő expressziója hatékony módszer a PR gátlására (Babe és mtsai., 1995, Junker és mtsai., 1996, McPhee és mtsai., 1996, Rozzelle és mtsai., 2000, Todd és mtsai., 2000a, 2000b). Munkacsoportunk is vizsgálta korábban a HIV-1 proteáz gátolhatóságát makromolekuláris inhibitorok alkalmazásával (Miklóssy és mtsai., 2008).

### **Pepsztatin A, acetil-pepsztatin és TL-3**

A pepsztatin (8.B ábra) egy mikrobiológiai eredetű N-acilpentapeptid, hatékony renin inhibitor (Aoyagi és mtsai., 1971). *In vivo* kísérletekben ritkán használják, mivel fiziológiás közegben alacsony oldékonyságú. Aszpartil proteáz inhibitor, a hatékony inhibitor koncentráció a marha leukémia vírus (BLV), a Moloney egér leukémia vírus (MLV) és a humán T-limfotróp vírus 1 (HTLV-1) enzimek esetében elég magas (Katoh és mtsai., 1987).

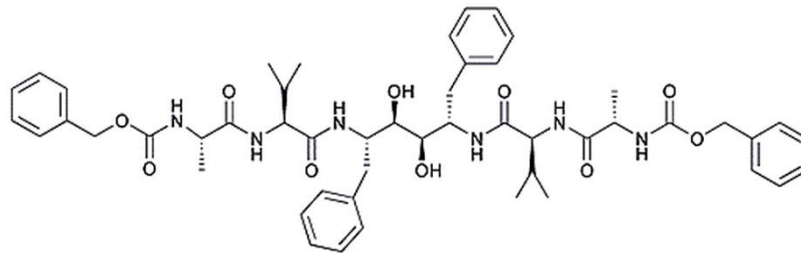
Azonban jelentős inhibitorhatást figyeltek meg madár eredetű retrovírus proteázok esetén (Dittmar és mtsai., 1978). A pepsztatin A HIV-1 proteázzal szemben kevésbé bizonyult hatékony inhibitornak, mint a celluláris aszpartil proteázok ellen (Pearl és Taylor, 1987). Az IC<sub>50</sub> (50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció) HIV-1 proteáz enzim esetében *in vivo*  $7 \times 10^{-5}$  M, míg *in vitro*  $2,5 \times 10^{-4}$  M értéket adott (Katoh és mtsai., 1987). Más források a pepsztatin A alacsony toxicitásáról számolnak be Epstein-Barr vírussal fertőzött Raji sejtek esetén (Morigaki és mtsai., 1981). Egerekben az LC<sub>50</sub> (halálos dózis félértéke) értékét intraperitoneálisan 1190 mg/kg-nak határozták meg (Greenbaum és mtsai., 1975).

Az acetil-pepszatint (8.A ábra), mely a pepsztatinnak egy acetil származéka, hatékony HIV-1 proteáz inhibitornak bizonyult (Richards és mtsai., 1989), a K<sub>i</sub> gátlási állandó értéként 20 nM értéket határoztak meg pH 4,7-n (pH 7,0-n > 1000 nM). A 2-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-2) proteáz esetében azonban még hatékonyabbnak gátlószernek bizonyult, mivel erősen kötődik a proteázhoz, ezért az aktív enzim koncentrációjának meghatározására, az aktívhely titrálásához is használható. Azt feltételezték, hogy egy molekula inhibitor képes hatékonyan bekötődni mindkét virális enzim esetében (Richards és mtsai., 1989).



**8. ábra: Az acetil-pepszatint (A) és a pepsztatin A (B) szerkezeti képlete.** (Matúz és mtsai., 2012 alapján). Az inhibitor aminosavréssz oldalláncok a hasítási helytől N-terminális felé haladva P1, P2, P3, stb., míg a C terminális felé haladva P1', P2', P3', stb., vannak jelölve (Schechter és Berger, 1976 szerint). Az inhibitor molekulák aminosavrésszeinek számozása a HIV-1 proteáz acetil-pepszatinnal alkotott komplexé alapján történt (PBD kód: 5HVP).

A TL-3 (9. ábra) egy C2 szimmetrikus proteáz inhibitor, amely HIV illetve FIV (macska immundeficiencia vírus) proteázok esetén hatékony inhibitornak bizonyult. Széles specificitású inhibitor, amely mikromoláris koncentrációban képes hatékonyan gátolni *in vitro* a humán, a majom és a macska immundeficiencia vírus replikációját (Lee és mtsai., 1998). A HIV (PBD kód: 2AZB) illetve FIV proteázok (PBD kód: 2HAH) inhibitorral alkotott komplexeinek kristályszerkezete ismert (Heaslet és mtsai., 2006, 2007). Jelentős protektív hatását mutatták ki a korai neurológiai változásokkal szemben a FIV-vel fertőzött macskák központi idegrendszerében (Rozières és mtsai., 2004).



**9. ábra: A TL-3 szerkezeti képlete.**

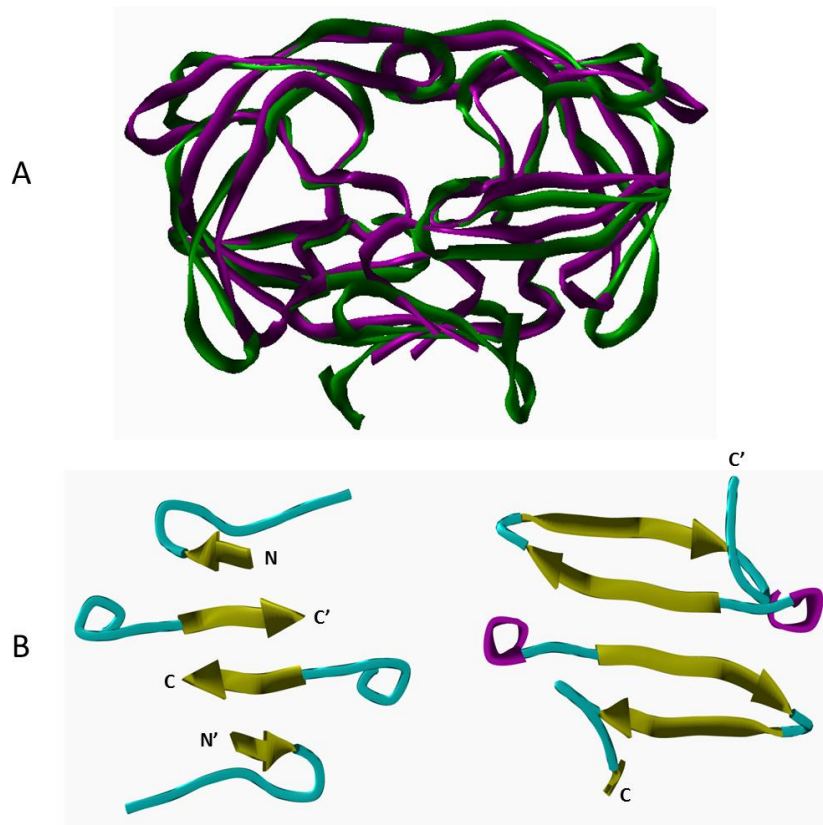
## **2.8. Az XMRV proteáz jellemzése és összehasonlítása egyéb retrovirális proteázokkal**

Mind az XMRV genomja, mind az általunk vizsgált proteáz szekvenciája nagy hasonlóságot mutat az egér leukémia vírusával (10. ábra). Annak ellenére, hogy az MLV széles körben alkalmazott géntranszfer kísérletekben, az MLV proteáz esetében rendelkezésre álló szerkezeti információink korlátozottak. Az MLV és XMRV proteázok szekvenciája 98%-ban azonos, a 125 aminosav hosszúságú szekvenciában 123 aminosav megegyezik (10. ábra), az eltérő aminosavak nem a szubsztrátkötő zsebben találhatóak. A szekvencia azonosság a HIV-1 és az MLV proteázok között 24%, a hasonlóság 41%, a szubsztrátkötő hely aminosav-összetétele esetében az azonosság 40%-os, míg a hasonlóság 50% (Eizert és mtsai., 2008).

		10	20	30	40	50	
HIV-1	-----	PQITLW	RPLVTIKIGG	QLKEALLDT	GADDTVLEEMSLP	GPRWKP	KMIIGGI
		10	20	30	40	50	
MLV		TLDDQGGQ	GQEPPE	PRITLKVGGQ	PVTF	FLVDTGAQH	SVLTQNP
XMRV		TLGDQGGQ	GQEPPE	PRITLKVGGQ	PVTF	FLVDTGAQH	SVLTQNP
	↑		* * * *	***	* ****	**	* * * *
		53	60	70	80	90	99
HIV-1		FIKVRQYDQ	ILIEICGHKA	IGTVLVGP	-TPVNI	IIGRNLLTQ	IGCTLNF-----
		60	70	80	90	100	110
MLV		GKRYRW	TDRKVHLAT	GKVTHSFL	HVPDCPY	PLLGRDLLTKL	KAQIHFE
XMRV		GKRYRW	TDRKVHLAT	GKVTHSFL	HVPDCPY	PLLGRDLLTKL	KAQIHFE
		*	*	* *	** ***	*	↑

**10. ábra: A HIV-1 PR, az MLV PR és az XMRV PR szerkezet-alapú szekvenciaillesztése.** (Ábra forrása: Matúz és mtsai., 2012). Az azonos aminosavak csillaggal vannak jelölve, a szubsztrátkötő zsebek felépítésében szereplő aminosavak szürkével vannak jelölve. A nyilak az MLV és XMRV esetében eltérő aminosavakat jelölik.

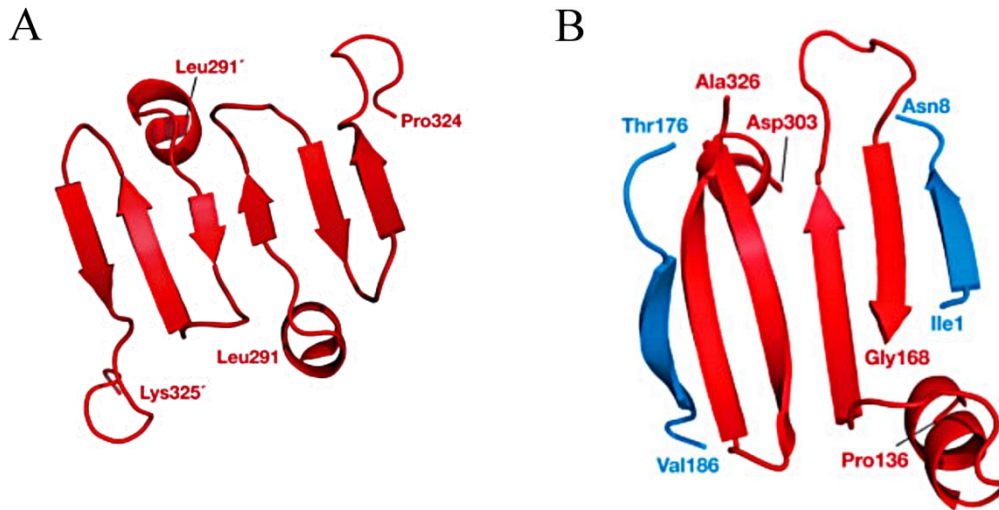
Míg a HIV-1 és XMRV proteázok szerkezete a kristályszerkezeti adatok alapján hasonló (11.A ábra), a dimerizációs módjuk azonban eltérő (11.B ábra). Az XMRV PR dimerizációs régiója két hajtű fordulatot tartalmaz, a dimerizációs felületet két-két, a monomerek C-terminális végein elhelyezkedő  $\beta$ -redő alkotja (Li és mtsai., 2011b). A HIV-1 proteáz esetén szintén négy antiparalell  $\beta$ -redő vesz részt a dimerizációs régió kialakításában, azonban a monomerek N-terminális régiói szerepelnek a dimerizációs régió külső, míg a monomerek C-terminális régiói a dimerizációs régió belső  $\beta$ -redőinek kialakításában (11.B ábra).



**11. ábra: Az XMRV és HIV-1 proteáz teljes szerkezetének és dimerizációs helyének összehasonlítása.** (Ábra forrása: Matúz és mtsai., 2012). (A) HIV-1 (lila) és XMRV (zöld) proteázok teljes szerkezete egymásra illetve, szalagmodellen bemutatva. (B) A HIV-1 (bal) és az XMRV (jobb) proteázok dimerizációs régióinak összehasonlítása szalagmodell segítségével (sárga színnel jelölve a  $\beta$ -redők, ciánkék színnel a hurokrégiók, lila színnel az  $\alpha$ -hélixek).

Li és munkatársai megállapították, hogy az XMRV retropepszin proteáz szerkezete eltér más retropepszinek (HIV PR, FIV PR) szerkezetétől, a dimerizációs helye nagyobb hasonlóságot mutat a pepszin típusú enzimek dimerizációs régiójához (12.B ábra). Az XMRV dimerizációs módja sokkal zártabb, mint a DNS károsodás által indukálódó (Ddi1) eukarióta (*Saccharomyces cerevisiae*) proteáz doménjének dimerizációs helye (12.A ábra). Az XMRV PR és Ddi1 esetén az N- és C- terminális régió hosszabb, mint a legtöbb retropepszinben. A Ddi1 dimerizációs helyét a C-terminálison elhelyezkedő protomer (három egymást követő  $\beta$ -redő) alkotja. A XMRV PR esetén az összekapcsolódó egységet monomerenként két  $\beta$ -redő alkotja. A Ddi1 szerkezete esetében a  $\beta$ -redők, amelyek a dimerizációban részt vesznek  $\sim 45^\circ$ -kal elfordulnak a HIV-1 PR-hoz és más retropepszinekhez képest. Az XMRV PR és a Ddi1 esetén is a C-terminális  $\alpha$ -hélixet követő két  $\beta$ -redő rész vesz a dimerizációs hely kialakításában, mind topológiailag mind szerkezetileg azonos a

megfelelő pepszinszerű aszpartil proteázok doménjainak C-terminális hurkaival. Az XMRV PR esetében azonban a harmadik  $\beta$ -redő hiányzik, így az XMRV PR zártabb dimerizációs szerkezetűnek tűnik, mint más retrovírus proteázok (Li és mtsai., 2011a).



**12. ábra: Aszpartil proteázok dimerizációs helyei.** (Ábra forrása: Li és mtsai., 2011a). A) DNS károsodás által indukálódó (Ddi1) protein, B) pepszin. Az N-terminális régiók kék színnel, a C-terminális régiók pirossal jelölve.

## 2.9. Célkitűzés

Doktori munkám során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

Az *E.coli* sejtekben expresszált XMRV proteáz karakterizálását, az enzim kinetikai paramétereinek meghatározását folyadékkromatográfias módszer segítségével, az enzim dimerizációs és disszociációs képességének vizsgálatát és annak összehasonlítását HIV-1 proteáz paramétereivel.

Az enzim gátlási profiljának vizsgálatát különböző proteáz-ellenes inhibitorral, két különböző módszerrel: alacsony ionerősségű közegben gélelektroforézis segítségével illetve magas ionerősségű közegben folyadékkromatográfias módszerrel.

Az XMRV proteáz enzim gátlását kívántuk vizsgálni pepsztatin A és acetil-pepsztatin inhibitorok esetében. Kísérleti munkánkat molekuláris modellezéssel egészítettük ki, valamint az amerikai kollaborációs partnerünk által rendelkezésünkre bocsájtott, az XMRV PR-inhibitor komplexek röntgenkristallográfias vizsgálataiból származó adatokkal együtt kívántuk értelmezni az enzim-inhibitor kölcsönhatásokat.

Össze kívántuk hasonlítani a két klasszikus aszpartil proteáz inhibitor (pepsztatin A és acetil-pepsztatin) esetén az XMRV és HIV-1 enzim gátlási módját és értelmezni a kölcsönhatásokat.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

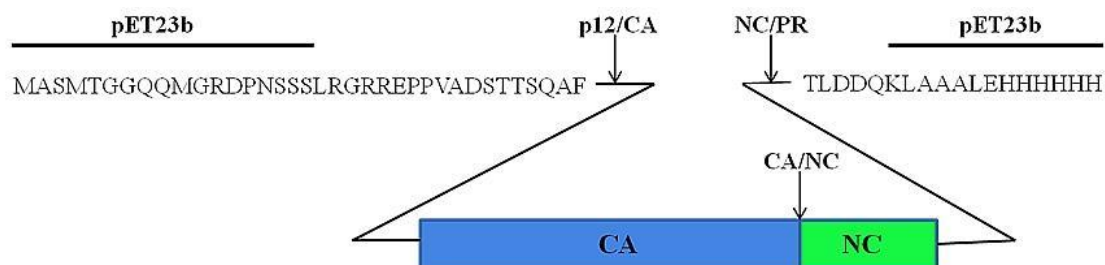
#### 3.1. Az XMRV és a HIV-1 proteázok, valamint az MLV Gag $\Delta 2$ fragmentum szubsztrát tisztítása

A tisztított XMRV proteázt Alexander Wlodawer és munkatársai bocsátották rendelkezésünkre, melyet *E.coli* sejtekben expresszáltak és N-terminális His<sub>6</sub>-véggel láttak el, ezért nikkel-kelát affinitás kromatográfiával tisztítottak az irodalomban korábban leírtak szerint (Gillette és mtsai., 2011), szerkezetét röntgenkristallográfiával vizsgálták (Li és mtsai., 2011a).

A HIV-1 proteázt a korábban leírtak alapján *E.coli* sejtekben állítottuk elő (Louis és mtsai., 1991, 1999). A HIV-1 proteáz expressziója a megfelelő plazmidokat hordozó *E. coli* BL21(DE3) kultúrákban történt. A sejteket 37 °C-on 100 µg/ml ampicillin-tartalmú Luria-Bertani tápoldatban addig növesztettük, amíg a 600 nm-en mért abszorbanciájuk 0,7 és 1,0 közé került. Ekkor 1 mM IPTG-vel indukáltuk az expressziót 3,5 órán keresztül. A sejteket 2000 g-vel 20 percig 4 °C-on történő centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a felülúszó eltávolítása után felvettük a pelletet lízis pufferben (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1,0 mM DTT, 0,5% Triton X-100, pH 8,2) vettük fel és jégen történő szonikálással (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) tártuk fel. A lizátumot 9000 g-vel 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd 3 M urea-tartalmú lízis pufferrel szuszpendáltuk és újra szonikáltuk. Ezt a mosási lépést még háromszor ismételtük meg, melynek eredményeképpen tiszta inklúziós testeket nyertünk. Az utolsó mosási lépés után kapott pelletet denaturációs pufferben oldottuk fel (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8 M urea, pH 8,0) és 0,22 µm pórusméretű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) átszűrtük. A fehérjéket POROS 20 R2 kromatográfias oszlopon (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) HPLC-vel tisztítottuk 0,05 v/v% TFA jelenlétében lineáris víz-acetonitril gradiens (0-100%) alkalmazásával. A proteáz tartalmú frakciók tisztaságát 16%-os poliakriamid géleken (Bio-Rad) ellenőriztük. A tiszta fehérjéket tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és SpeedVac SVC 100H koncentrátor (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA) segítségével beszárítottuk. A proteáz tartalmú száraz pelletet 6 M guanidin-hidroklorid oldatban vettük fel. Az oldat fehérje koncentrációját Bradford spektrofotometriás eljárással határoztuk meg (Bradford, 1976), marha szérum albumin (BSA) standard kalibrációs sor felhasználásával (0-4,5 µg).

Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrátot (13. ábra) a munkacsoportunk által publikált expressziós rendszerben, valamint tisztítási protokolnak megfelelően állítottuk elő (Fehér és

mtsai., 2006). Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum a teljes MLV cDNS-t tartalmazó klónból (Gorelik és mtsai., 1988) PCR reakció segítségével szaporították fel. A pET23b (Novagen) vektorba klónozták és a C-terminális végen His<sub>6</sub>-vel ellátott MLV Gag  $\Delta 2$  konstrukciót *E.coli* BL21(DE3) kompetens sejtekbe transzformálták hősokk (42 °C) segítségével. A sejteket 37 °C-on növesztették 100 µg/ml ampicillin-tartalmú Luria-Bertani tápoldatban, amíg a 600 nm-en mért abszorbancia 0,7 és 1,0 közé került. Ekkor 1 mM IPTG-vel indukálták az expressziót 2 órán keresztül. A sejteket 2000 g-vel 20 percig 4 °C-on történő centrifugálással gyűjtötték össze, majd a felülúszó eltávolítása után a pelletet lízis pufferben vették fel (20 mM Na-foszfát, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7,0) és jégen történő szonikálással (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) tárták fel. A lizátumot 9000 g-vel 20 percig 4 °C-on centrifugálták, majd a felülúszót 0,22 µm pórusméretű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) átszűrték, és nikkel kelát affinitás kromatográfiával tisztították (HisTrap oszlop, Pharmacia), az eluáló puffer 250 mM imidazolt tartalmazott. A fehérjéket gélszűréssel választották el Superdex<sup>TM</sup>30 (Pharmacia) oszlop segítségével, 20 mM Na-foszfát pufferben (150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7,0). A kapott fehérjeoldatok koncentrációját Bradford spektrofotometriás mérési módszerrel határozták meg, az előzőekben ismertetett körülmények között.



**13. ábra MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát (MLV  $\Delta$ p12-CA-NC- $\Delta$ PR) fehérje szekvenciájának részlete.** (Fehér és mtsai., 2006 alapján). Vastag betűvel jelölve a klónozó vektor valamint nyíllal jelölve az MLV PR hasítási helyei.

### 3.2. Aktivitás vizsgálat

#### Kinetikai paraméterek meghatározása

A HPLC-vel tisztított szilárd peptidet Dr. Stephen Oroszlantól és Dr. Terry D. Copelandtól kaptuk (Frederick, MD, USA). A peptid-törzsoldat desztillált vízzel hígították, melyek pontos koncentrációját aminosav analízissel határozták meg (Louis és mtsai., 1999a).

Az XMRV proteáz aktivitás méréséhez 20 nM koncentrációjú tisztított XMRV proteázt, 10 µl 2× töménységű reakciópuffert (0,5 M kálium-foszfát, 10 v/v% glicerol, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 4 M NaCl, pH 5,6) és 0,5 mM végkoncentrációjú, módosított (P3 helyen Leu-szubsztituált) MLV MA/p12 hasítóhely szekvenciájú szintetikus decapeptidszubsztrátot (RSLLY↓PALTP) használtunk, míg HIV-1 PR esetén a VSQNY↓PIVQ szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrátot alkalmaztuk. A reakcióelegyet 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd 180 µl 1 v/v%-os TFA oldattal leállítottuk az enzimreakciót és a kapott oldatokat automata injektor segítségével Nova-Pak C<sub>18</sub> reverz fázisú kromatográfiás oszlopra (3,9 mm x 150 mm, Waters Associates Inc.) vittük fel. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradiens alkalmazásával (0-100 v/v%) és 0,05 v/v% TFA jelenlétében választottuk el a termékektől és a pufferkomponensektől. Az elválasztást 206 nm-en követtük és a hidrolízis mértékét a kromatográfiás görbe csúcs alatti területeinek meghatározásával számítottuk. Az integrációs értékeknek megfelelő peptidmennyiség kiszámításához korábban meghatározott referenciaértékeket használtunk. A referenciaértékeket, valamint a hasítási helyeket a csúcsoknak megfelelő frakciók aminosavanalízisével és szekvenálásával határozták meg a HIV-1 proteázra (Tózsér és mtsai., 1992). Az enzimkoncentrációkat úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátok hidrolízise 20% alatt maradjon. A termékek azonosítására a retenciós időket vettük figyelembe. Minden mintánál két párhuzamos mérést végeztünk, a számításokhoz átlagértéküket használtuk. A standard hiba 10% alatt volt.

A Michaelis-Menten állandó meghatározásakor növekvő koncentrációban (0,03-0,7 mM) alkalmaztuk a szintetikus oligopeptid szubsztrátot (RSLLY↓PALTP), hat különböző koncentráció esetén, a reakció körülményei megegyeztek az előzőekben ismertetett körülményekkel. A párhuzamos mérésekből származó integrációs értékekből a korábban (HIV-1 proteázra) meghatározott referenciaértékek segítségével meghatároztuk a peptidmennyiségeket, majd figyelembe véve az 1 órás inkubálási időt, számítottuk a reakciósebesség értékeit. A kinetikai paramétereket SigmaPlot 8.0 program (SigmaPlot Software Corp.) felhasználásával a reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció adatok Michaelis-Menten egyenlethez való illesztésével határoztuk meg, nemlineáris regressziós módszerrel ( $f = a \cdot x / (b + x)$  függvény segítségével). Meghatároztuk a maximális reakciósebessége 50%-os értékéhez tartozó szubsztrát koncentráció értékét ( $K_M$ ). A kinetikai állandók standard deviációi 20% alatt voltak.

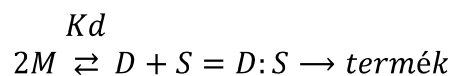
Aktívcentrum titrálással határoztuk meg az aktív enzim mennyiségét. Ezekben a kísérletekben 0,45 mM végkoncentrációjú szubsztrát oldatot, valamint 0,01-90 nM végkoncentrációjú amprenavir DMSO-val hígított oldatát mértünk a reakcióelegybe. Az aktív

enzim koncentrációjának meghatározása során a párhuzamos mérésekből származó aktivitások értékeit ábrázoltuk az inhibitor koncentráció függvényében, az illesztés (legalább 8 pont felvételével) nemlineáris regressziós módszerrel ( $f=y_0+a*\exp(-b*x)$  függvény) SigmaPlot 8.0 program segítségével történt, a függvény lineáris szakaszának meredekségéből szintén a programot alkalmazva határoztuk meg az aktív enzim koncentrációját.

A katalitikus állandót ( $k_{cat}$ ) az aktívcentrum titrálással kapott aktív enzimkoncentráció felhasználásával számoltuk, mint a maximális reakciósebesség és az aktív enzimkoncentráció hányadosát.

### 3.3. Dimerizációs és urea-disszociációs vizsgálat

Az XMRV és HIV-1 proteázok esetében aktivitásmérés segítségével határoztuk meg a látszólagos dimerizációs állandót ( $K_{dapp}$ ), melyet először a HIV-1 proteáz esetében határoztak meg (Jordan és mtsai., 1992) aktivitás mérésen alapuló módszer segítségével. Azt feltételezzük tehát, hogy az aktív proteáz dimer (D) egyensúlyban van az inaktív monomer (M) formával, így a következő módon írhatjuk le az enzim szubsztráttal (S) való reakcióját:



A vizsgálat során Lys-Ala-Arg-Val-nLeu↓*p*-nitroPhe-Glu-Ala-nLeu-amid (KARVnL↓F(NO<sub>2</sub>)EAnL-NH<sub>2</sub>, SIGMA) szubsztrátot alkalmaztunk, 2× töménységű inkubálópufferben (100 mM MES, 200 mM Tris, 100 mM nátrium-acetát, 2 M NaCl, pH 5,0). A reakcióelegy 0,3 mM végkoncentrációjú szubsztrát oldatot és 0,1-100 nM enzimpreparátumot tartalmazott. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk 20 percig, majd 1v/v%-os TFA oldattal állítottuk le a reakciót és HPLC analízisnek vetettük alá a reakcióelegyeket. Az elválasztást 206 nm-en végeztük és a hidrolízis mértékét a kromatográfias görbe csúcs alatti területeinek meghatározásával számítottuk. SigmaPlot 8.0 program segítségével ábrázoltuk a párhuzamos mérésekből származó relatív specifikus aktivitást a proteáz koncentráció függvényében, majd 2 paraméteres nem lineáris ( $f=y_0+a*\exp(-b*x)$  függvény) illesztést alkalmaztunk. Az 50%-os enzimkoncentrációhoz tartozó enzimaktivitás a látszólagos dimerizációs állandó ( $K_{dapp}$ ).

Az aktív dimer proteázok stabilitásvizsgálatát urea denaturálás segítségével végeztük, amelyről az irodalom már különböző HIV-1 proteáz mutánsok esetén beszámolt (Liu és

mtsai., 2005). A denaturálás során a fehérje szerkezetében változások jönnek létre, és ezzel egyidejűleg biológiai tulajdonságai is (pl. enzimatis vagy hormonhatás) elvesznek. A folyamat többnyire irreverzibilis. Egy nagyobb rendezettségű állapotból egy rendezetlen felé való átmenetnek felel meg. Denaturáláskor felbomlanak a gyenge kötőerők, amelyek a globuláris fehérjét a natív konformációban stabilizálják. Az urea denaturáló hatásának lehetséges mechanizmusára több feltevés is létezik. Közvetlen illetve közvetett módon történhet. Közvetlen mód esetén az urea destabilizálja a fehérjét (a fehérje hídofób oldalláncával való kölcsönhatás által, vagy a főlánccal való kölcsönhatás által, vagy a poláris oldallánccal való kölcsönhatás során), a közvetett hatás esetén a víz molekula destabilizálja a fehérjét.

Az urea disszociációs állandó  $UC_{50}$  értékét (50%-os disszociáció esetén mért urea koncentráció) szintén HPLC módszer segítségével mértük, 0,3 mM koncentrációjú  $KARVnL\downarrow F(NO_2)EAnL-NH_2$  (SIGMA) szubsztrát alkalmazásával. A reakcióelegyek összetétele és az inkubálás körülményei megegyeznek az előzőekben leírtakkal, ebben az esetben azonban a puffer növekvő koncentrációban, 0-4 M ureát tartalmazott. Az XMRV proteáz végkoncentrációja az elegyben 34 nM, a HIV-1 proteázé 5,5 nM volt. A termékek HPLC analízisét követően a párhuzamos mérésekből származó relatív specifikus aktivitásokat ábrázoltuk az ureakoncentráció függvényében (0-4 M), majd nemlineáris ( $f = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$  függvény) illesztést alkalmaztunk.

### **3.4. Gátolhatósági vizsgálatok**

#### ***3.4.1. Gátolhatósági vizsgálatok HPLC módszerrel***

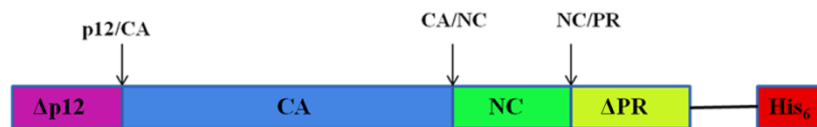
Az XMRV proteázt 20 mM Pipes, pH 7,0; 100 mM NaCl, 10% glicerol és 0,5% NP40 tartalmú pufferrel hígítottuk. Az MLV proteáz esetében leírtak szerint végeztük a HPLC analízist (Fehér és mtsai., 2006). A reakcióelegy 20 nM proteázt, 2× töménységű reakciópuffert (0,5 M kálium-foszfát, 10 v/v% glicerol, 10 mM DTT, 4 M NaCl, pH 5,6) és 0,5 mM végkoncentrációjú  $RSLLY\downarrow PALTP$  szintetikus oligopeptid szubsztrátot tartalmazott. A szubsztrát a P3 Leu-szubsztituált módosított dekapeptid volt, amely az MLV MA/p12 hasítóhely szekvenciáját ( $RSSLY\downarrow PALTP$ ) tartalmazta.

A gátlási kísérletek során 0,45 mM szubsztrát oldatot és az inhibitorok (acetil-pepszatin, pepszatin A, amprenavir, TL-3 vagy atanavir) DMSO-val hígított oldatát alkalmaztuk, valamint kontrollként az inhibitor helyett DMSO-t pipettáztunk az elegybe. A

reakcióelegyet rázatás alkalmazása mellett 37 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 1v/v% trifluoecetsav (TFA) hozzáadásával állítottuk le. Az enzim koncentrációját úgy változtattuk, hogy a szubsztrát átalakulása 20% alatt legyen. A  $K_i$  értékeket az  $IC_{50}$  (50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció) értékek segítségével határoztuk meg,  $K_i = (IC_{50} - [E])/2 / (1 + [S]/K_M)$  összefüggés alapján, ahol  $[E]$  és  $[S]$  a proteáz és szubsztrát koncentrációk (Maibaum és mtsai., 1988). Az  $IC_{50}$  értékek meghatározása során a párhuzamos mérésekből származó aktivitások értékeit ábrázoltuk az inhibitor koncentráció függvényében, az illesztés (legalább 8 pont felvételével) nemlineáris regressziós módszerrel történt.

### 3.4.2. Gátolhatósági vizsgálatok SDS-PAGE módszerrel

A gátolhatósági vizsgálatokhoz rekombináns MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrátot használtunk, mely a p12/CA, CA/NC, NC/PR hasítási helyeket tartalmazza (Fehér és mtsai., 2006) (14.ábra).



**14. ábra: MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát.**

A szubsztrátot (3,7  $\mu M$ ) inkubáló pufferben (75 mM foszfát, 0,5 mM EDTA, pH 5,6) 1 óráig 37°C vízfürdőben inkubáltuk, a hasítási elegy 30 nM XMRV proteázt tartalmazott, valamint DMSO-ban oldott amprenavirt (3,3  $\mu M$ ) vagy TL-3-at (1 mM). A kontroll minták esetében vagy az inhibitor oldat hiányzott az elegyből, ilyenkor DMSO oldatot használtunk az inhibitor helyett, vagy az enzim preparátum helyett puffer oldatot a reakcióelegyben. Az enzimreakciókat nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) mintafelvívő puffer hozzáadásával állítottuk le és a fehérjéket 95 °C-on 8 percig denaturáltuk, majd a termékeket SDS-PAGE segítségével elválasztottuk és Coomassie Brilliant Blue festést követően Protein ladder (Fermentas) fehérje molekula standard segítségével azonosítottuk.

Az acetil-pepszatin illetve a pepszatin A inhibitorokkal végzett gátlási kísérletek során a rekombináns MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum (MLV  $\Delta p12$ -CA-NC- $\Delta PR$ ) 0,9  $\mu M$  koncentrációban volt jelen a reakcióelegyben,. Az XMRV proteázt (30 nM) acetil-pepszatin

(3,0  $\mu\text{M}$ ) vagy pepsztatin A (28,8  $\mu\text{M}$ ) inhibitorral 1 óráig 37 °C-on tartottuk inkubáló pufferben (75 mM foszfát, 0,5 mM EDTA, pH 5,6). Ebben az esetben is alkalmaztunk enzim kontrollt, illetve inhibitor nélküli reakcióelegyet. A reakció az előbbieken ismertetett módon lett leállítva illetve analizálva.

### 3.5. Röntgenkristallográfia

Az XMRV PR röntgenkristallográfiás vizsgálatát Alexander Wlodawer és munkatársai végezték el. A kristályosítás során 6 mg/ml-re töményített XMRV proteázt használtak. A TL-3 és a pepsztatin inhibitorok esetében az inhibitorokat 4:1-es XMRV proteáz (monomer): inhibitor molarányban adták, az amprenavir esetében ez az arány 1:1 volt, az acetil-pepsztatin esetében 4:1-es PR:inhibitor molarányt alkalmaztak. A kristályosítást a függőcsepp gőzdiffúziós módszerrel végezték. Az XMRV PR/TL-3 komplex kristályai pH 5,5-n (PBD kód: 3SLZ) (Li és mtsai., 2011b), míg az XMRV PR/pepsztatin A komplex kristályai pH 7,0-n nőttek (PBD kód: 3SM1) (Li és mtsai., 2011b), az amprenavir komplex (PBD kód: 3SM2) kristályai pedig pH 4,75-n (Li és mtsai., 2011b).

### 3.6. Molekuláris modellezés

A HIV-1, az MLV és az XMRV PR szekvenciák szerkezetalapú többszörös szekvenciaillesztését a korábban publikát módon hajtottuk végre (Bagossi és mtsai., 2005). A HIV-1 PR acetil-pepsztatinnal képzett komplexének (PBD kód: 5HVP) (Fitzgerald és mtsai., 1990) és az XMRV PR pepsztatin A-val alkotott komplexének (PBD kód: 3SM1) (Li és mtsai., 2011b) a kristályszerkezeti adatait használtuk fel, hogy a HIV-1 és az XMRV proteázok egy vagy két pepsztatin A vagy acetil-pepsztatin inhibitor molekulával alkotott komplexének a 3D-s modelljét felépítsük.

Az enzim-inhibitor komplexek kiindulási szerkezeteit úgy állítottuk elő, hogy az inhibitor molekulát (egy inhibitor kötött mód) vagy molekulákat (két inhibitor kötött mód) a proteáz aktív helyére illesztettük, a kristályszerkezetekben lévő vízmolekulák döntő többségének megtartásával. A szubsztrátkötő helyen a beillesztett inhibitor molekulával ütközésbe kerülő vízmolekulákat eltávolítottuk. Egy inhibitor kötött módban, az átmeneti állapot analójként működő inhibitor esetén, a katalitikus vízmolekulát eltávolítottuk és a központi sztatín származék hidroxil csoportjával helyettesítettük, míg a két inhibitor kötött módban, a szubsztrát analójként működő inhibitor kötődése esetén, a katalitikus vízmolekulát

meghagytuk a kiindulási szerkezetben, mivel a szubsztrát-analóggént történő kötődéskor a katalitikus vízmolekula nem szorul ki a katalitikus Asp-ok közül, míg az átmeneti állapot analógok esetében igen. Az enzim-inhibitor komplexek minimalizálása 500 Powell iterációs lépésben, AMBER7\_FF99 erőter és 4-es dielektromos alkalmazásával történt, aggregátumok definiálása nélkül, a nem-kötő kölcsönhatások határtávolság értéke („cutoff”): 8 Å volt. A minimalizált enzim-inhibitor komplex szerkezetek alapján minden szubsztrátkötő alhely esetében kiszámítottuk az adott alhelyre kötődő inhibitor aminosavrész és az enzim közötti kölcsönhatási energiát (kcal/mol). A ligand fokozatos rövidítése mellett az egyes alhelyeken a kölcsönhatási energiát a szabad enzim és az inhibitor esetében számolt energiáknak az enzim-inhibitor komplex teljes energiájából történő kivonásával határoztuk meg.

A munka során AMBER7\_FF99 erőterrel dolgoztunk, mely fehérjékre készített erőter alkalmazása során a teljes energia (total energy,  $E_{\text{total}}$ ) számítása a kötés-nyújtás (bond stretching energy,  $E_{\text{str}}$ ), a kötésszög-hajlítás (angle bending energy,  $E_{\text{bend}}$ ), a torzió változás (torsional energy,  $E_{\text{tors}}$ ), valamint a van der Waals (van der Waals energy,  $E_{\text{vdw}}$ ) és az elektrosztatikus kölcsönhatások (electrostatic energy,  $E_{\text{ele}}$ ) energiájának figyelembe vételével történik, az alábbi egyenlet szerint:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{str}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{vdw/ele}}$$

Az energiaértékek számítása a fenti tényezőkön alapul és a Sybyl programmal történő számításaink során az AMBER7\_FF99 erőter alapbeállításainak megfelelően történt. A paraméterek beállítása során például a nem-kötő kölcsönhatások hozzájárulását csak egységesen lehet kezelni, mivel a Sybyl program nem ad lehetőséget a van der Waals és a Coulomb kölcsönhatások határtávolság értékeinek külön történő beállítására. Így a programban a nem-kötő kölcsönhatások határtávolsága (non-bonded cutoff) változtatásának hatása csak a dielektromos állandó értékének változtatásával érhető el.

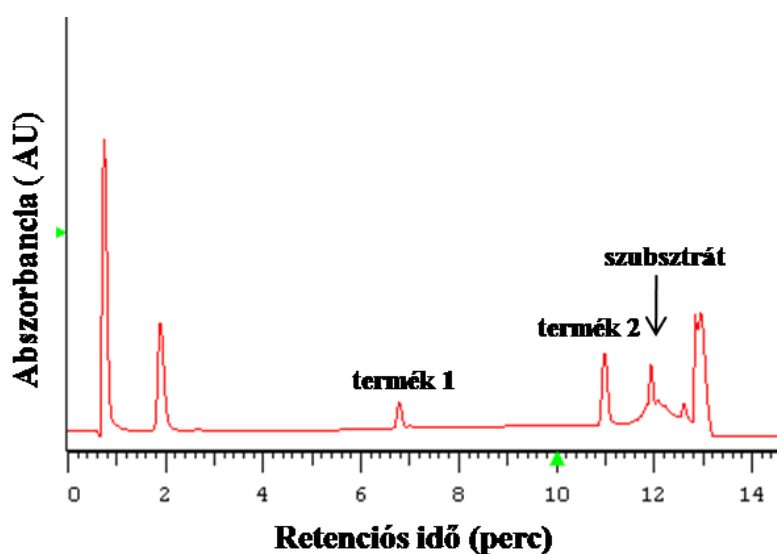
A számítások és a modellek megjelenítése Silicon Graphics Fuel munkaállomáson történt (SiliconGraphics International, Fermont, CA, USA), az ábrák készítéséhez a Sybyl szoftvert használtuk.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

### 4.1. Enzimkinetikai és stabilitási vizsgálatok

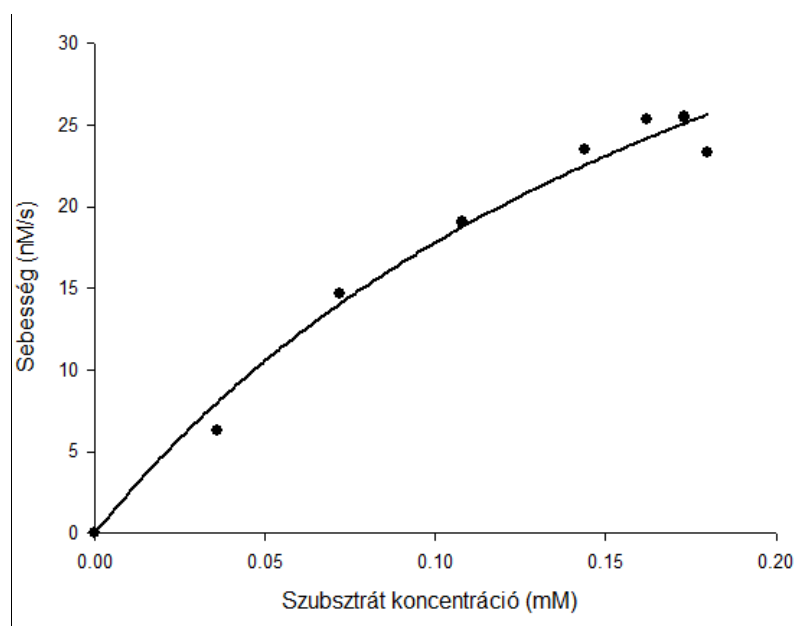
#### 4.1.1. XMRV proteáz kinetikai vizsgálata HPLC módszerrel

Az XMRV aktivitásának vizsgálatát egy szintetikus dekapeptid szubsztrát felhasználásával végeztük, amely az MLV MA/p12 hasítóhely P3-Leu módosított szekvenciáját (RSLLY↓PALTP) tartalmazta (15. ábra).



**15. ábra: MLV MA/p12 hasítóhelyen P3-Leu módosított szekvenciájú szintetikus dekapeptid szubsztrát (RSLLY↓PALTP) XMRV proteázzal történő hasításának HPLC kromatogramja.**

Az XMRV proteáz és MLV MA/p12 P3-Leu módosított szintetikus dekapeptid szubsztrát reakcióban az enzim Michaelis-Menten állandója  $0,216 \pm 0,027$  mM, az enzim katalitikus állandója  $0,55 \pm 0,04$  s<sup>-1</sup>, és specificitási állandója  $2,55 \pm 0,37$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> értéknek adódott. A specificitási állandó ( $k_{cat}/K_M$ ) értéke hasonló, mint amit munkacsoportunk korábban az MLV proteáz ( $2,74 \pm 0,32$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) esetében határozott meg MLV MA/p12 hasítási helyű (PRSSLY↓PALTP) oligopeptid esetén (Fehér és mtsai., 2006).



**16. ábra:  $K_m$  meghatározása SigmaPlot program segítségével.**

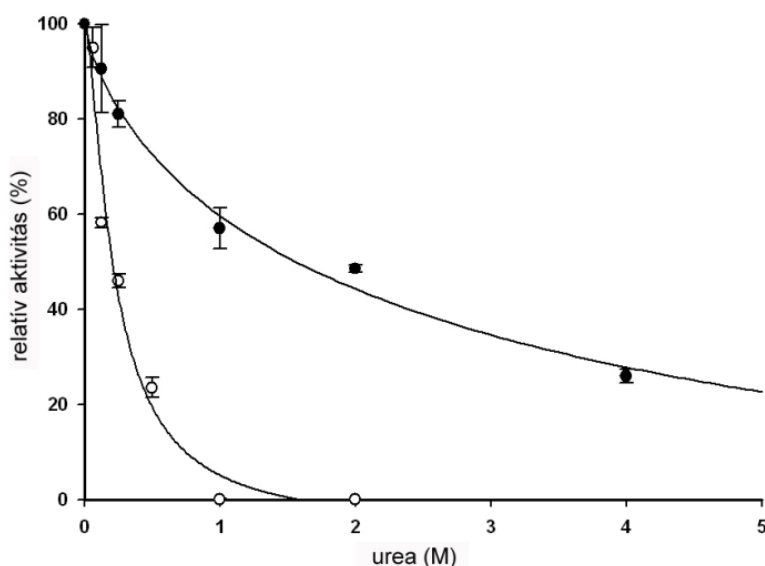
#### **4.1.2. XMRV és HIV-1 proteázok dimerizációs és urea-disszociációs vizsgálata**

Az XMRV PR látszólagos dimerizációs állandó ( $K_{dapp}$ ) értéke az XMRX PR esetén KARVnL↓F(NO<sub>2</sub>)EAnL-NH<sub>2</sub> szubsztrát alkalmazásával 115 nM-nak (1. táblázat) adódott. A HIV-1 proteáz esetében 1,0 nM értéket határoztunk meg, ami összhangban van a korábban az irodalomban más módszerrel meghatározott értékkel (< 5 nM) (Fehér és mtsai., 2006).

Az aktív dimer proteázok stabilitás vizsgálatát urea denaturálás segítségével végeztük, 0,3 mM koncentrációjú szubsztrát alkalmazásával, növekvő koncentrációjú urea (0-4 M) alkalmazásával, HPLC analízist alkalmazva, amelyről az irodalom már különböző HIV-1 proteáz mutánsok esetén beszámolt (Liu és mtsai., 2005). A HIV-1 PR urea-disszociációs állandó ( $UD_{50}$ ) értékét hasonlóan találtuk a korábban az irodalomban fotometriásan meghatározott értékhez (vad típus esetén  $UD_{50}=1,22$  M, Olivares és mtsai., 2007), az XMRV PR azonban jóval érzékenyebbnek bizonyult az urea koncentrációra, 0,2 M  $UD_{50}$  értéket határoztunk meg, ami összhangban van a nagyobb  $K_{dapp}$  értékkel (1.táblázat, 17. ábra).

**1. táblázat: Az XMRV proteáz és a HIV-1 proteáz dimerizációs és urea-disszociációs értékei.** Az értékek meghatározása KARVnL↓F(NO<sub>2</sub>)EAnL-NH<sub>2</sub> szubsztrát felhasználásával történt.

	XMRV PR	HIV-1 PR
Dimerizációs állandó ( $K_{dapp}$ )	115 nM	1,0 nM
Urea disszociációs állandó ( $UD_{50}$ )	0,2 M	1,47 M



**17. ábra: XMRV és HIV-1 proteázok urea-disszociációs görbéi.** A HIV-1 PR (●) és az XMRV PR (○) disszociációs értékeit növekvő urea koncentráció mellett HPLC módszerrel mértük KARVnL↓F(NO<sub>2</sub>)EAnL-NH<sub>2</sub> szubsztráttal.

## 4.2. Gátolhatósági vizsgálatok

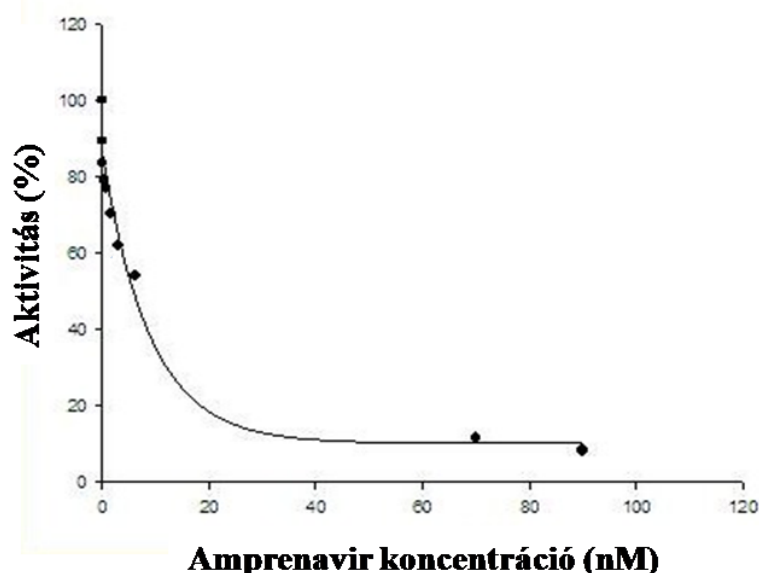
### 4.2.1. Gátolhatósági vizsgálatok HPLC módszerrel

A  $K_i$  értékek alapján az amprenavir bizonyult a leghatékonyabb inhibitornak az XMRV PR esetén a tesztelt inhibitorok közül (2. táblázat, 18. ábra), az enzim aktívcentrum titrálását is ezzel a HIV-1 proteáz inhibitorral végeztük. A Bradford fehérje meghatározás során kapott fehérje koncentráció ismeretében, valamint a HPLC módszerrel meghatározott aktív

enzimkoncentráció alapján úgy találtuk, hogy az tiszta enzim 12%-a volt aktív formában. A legkevésbé hatékony inhibitornak a pepsztatin A bizonyult.

**2. táblázat: Az XMRV proteáz gátlása HIV-1 proteáz ellenes inhibitorokkal.  $K_i$  meghatározása RSLLY↓PALTP szintetikus oligopeptid szubsztráttal HPLC-módszerrel történt 37 °C-os 1 órás inkubáció alkalmazásával.**

Inhibitor	$K_i$ (nM)
<i>amprenavir</i>	0,2
<i>atazanavir</i>	1,8
<i>TL-3</i>	102
<i>pepszatin</i>	1442



**18. ábra: XMRV PR gátlása amprenavirral. A  $K_i$  gátlási állandót az  $IC_{50}$  értékek segítségével határoztuk meg a  $K_i = (IC_{50} - [E])/2 / (1 + [S]/K_M)$  összefüggés alapján (Maibaum és mtsai., 1988).**

Az acetyl-pepszatin méréseink alapján alkalmasabb inhibitornak bizonyult a HIV-1 proteáz esetén mint a pepsztatin A. Az MLV proteáz esetén az acetyl-pepszatin az irodalmi adatok szerint gyenge inhibitornak bizonyult, bár a  $K_i$  értékét nem határozták meg (Menendez-Arias és mtsai., 1993). Az acetyl-pepszatin gátolta mind az XMRV mind a HIV-1 proteázt, a látszólagos  $K_i$  érték jelentősen alacsonyabb volt a HIV-1 PR esetén mint XMRV proteáz esetén (3. táblázat). A HIV-1 proteázt mindkét inhibitor nanomoláris koncentrációban gátolta (3. táblázat).

**3. táblázat: Az XMRV és a HIV-1 proteázok  $K_i$  értékének meghatározása HPLC módszerrel.** Az XMRV PR esetén a RSLLY↓PALTP, míg a HIV-1 PR esetén a VSQNY↓PIVQ szekvenciájú szintetikus oligopeptid szubsztrátokat alkalmaztuk.

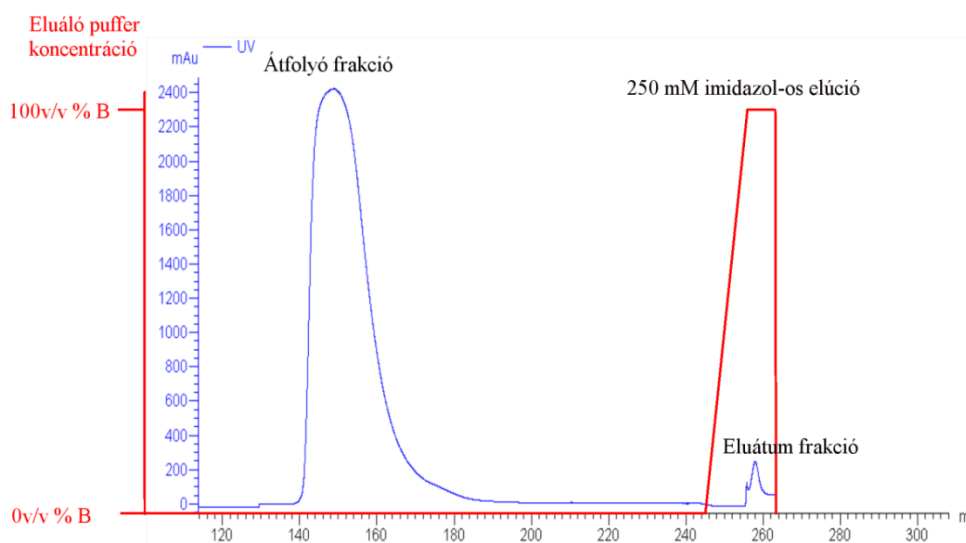
	XMRV PR	HIV-1 PR
Inhibitor	$K_i$ (nM)	$K_i$ (nM)
<i>pepszatin A</i>	1 442 ± 123	22 ± 1,6
<i>acetil-pepszatin</i>	712 ± 39	13 ± 1,5

#### 4.2.2. Gátlhatósági vizsgálatok SDS-PAGE módszerrel

##### 4.2.2.1. MLV Gag Δ2 fragmentum szusztrát előállítása

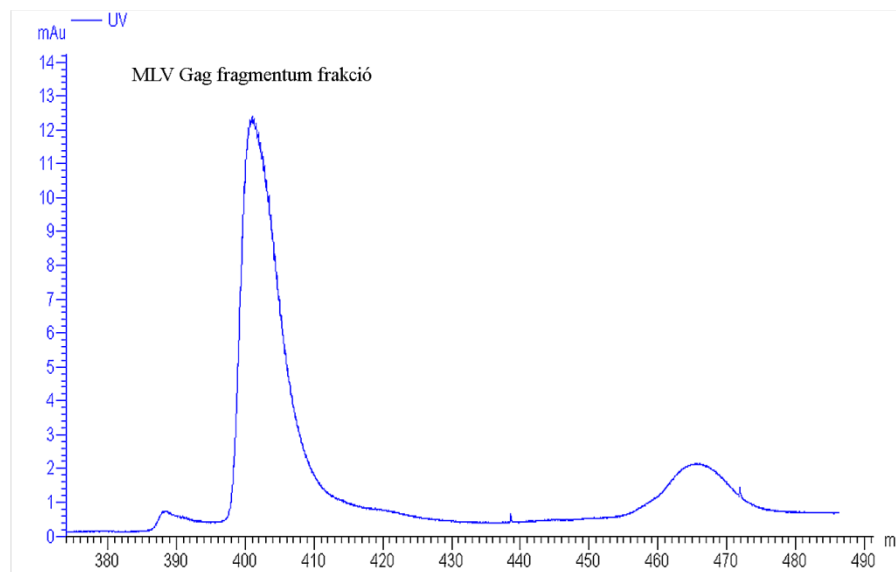
Az XMRV proteáz aktivitását rekombináns MLV Gag Δ2 fragmentum szusztrát segítségével alacsony ionerősségű közegben is vizsgáltuk.

A C-terminális végen His<sub>6</sub>-vel ellátott pET23b (Novagen) vektorba klónozott MLV GagΔ2 konstrukciót *E.coli* BL21(DE3) kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd expresszáltuk a korábban leírtak szerint (Fehér és mtsai., 2006), nikkkel-kelet affinitás kromatográfiával tisztítottuk (19. ábra), 250 mM imidazol tartalmú eluáló puffer alkalmazásával.



**19. ábra: MLV Gag Δ2 fragmentum szubsztrát Ni-kelet affinitás kromatográfiával történő elválasztásának kromatogramja.** Az elválasztás HisTrap oszlopon (Pharmacia) történt, a fehérjét 210 nm hullámhosszon detektáltuk.

Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum fehérjét gélszűrőssel tisztítottuk tovább Superdex<sup>TM</sup> 30 oszlop segítségével (20. ábra).



**20. ábra: MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát gélszűrésének kromatogramja.** Az elválasztás Superdex<sup>TM</sup>30 oszlop (Pharmacia) felhasználásával, 210 nm hullámhosszon történő detektálással történt.

#### 4.2.2.2. MLV Gag $\Delta 2$ fragmentum szubsztrát hasítása és gátlása

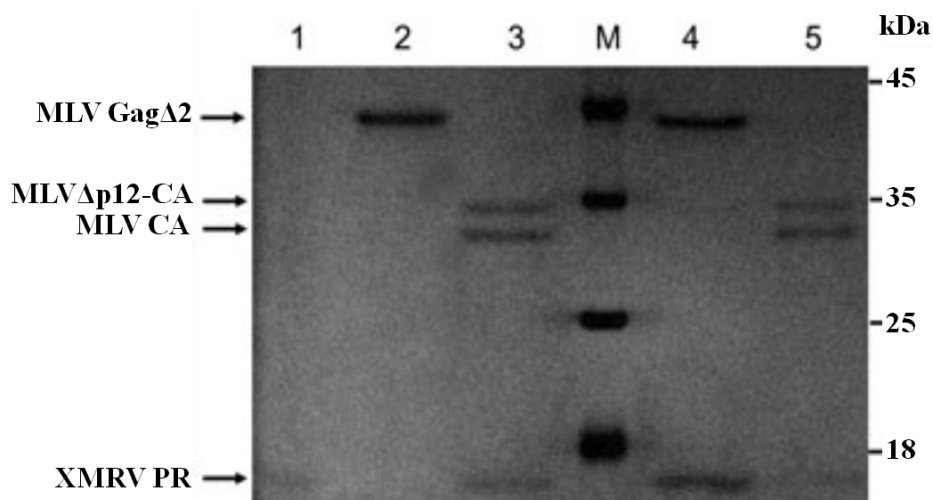
Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát a p12/CA, CA/NC és NC/PR hasítási helyeket tartalmazza (Fehér és mtsai., 2006) (14. ábra). A korábban elvégzett kísérletek alapján az MLV proteázzal való hasítás esetén a rekombináns szubsztrát feltehetően a p12/CA vagy CA/NC helyek valamelyikénél hasad elsőként (Fehér és mtsai., 2006).

A rekombináns szubsztrát XMRV proteázzal való hasításakor az MLV CA (31 kDa) és az MLV  $\Delta$ p12-CA (34 kDa) fragmensek megjelenését tapasztaltuk (21. ábra).

Eredményeink alapján feltételzhető, hogy a CA/NC hasítási hely valóban kitüntetett és az itt történő gyors processzálás miatt jelennek meg a CA és a  $\Delta$ p12-CA fragmensek. A keletkező  $\Delta$ p12, NC, NC- $\Delta$ PR és  $\Delta$ PR fragmentek mérete kisebb az XMRV proteáz méreténél, ezért nem látszik a gélképen (21. ábra). Nem tapasztaltuk a CA-NC- $\Delta$ PR fragmens megjelenését. Lehetséges magyarázat lehet, hogy ez a fragmens nem festődik jól Comassie Blue festékkel és nem látszik a gélképen. Ezen fragmens keletkezésének hiánya, azaz a p12/CA helyen a csökkent hasítási hatékonyság sztérikus okokkal magyarázható, ugyanis a

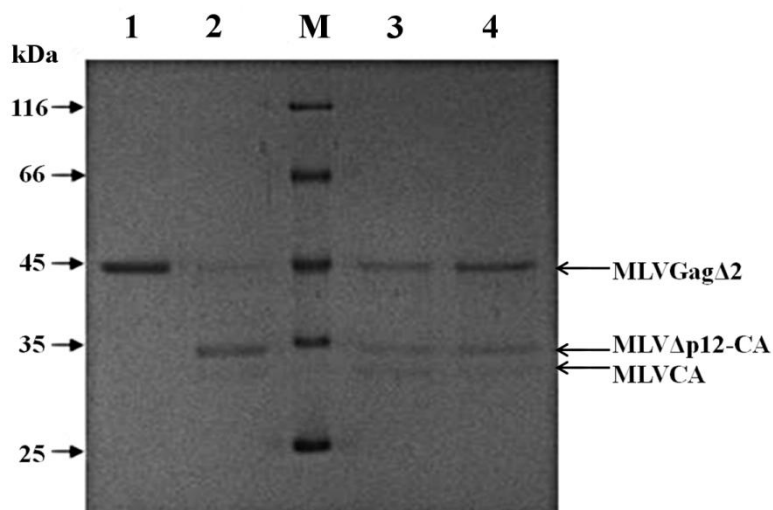
Gag fehérje erős oligomerizációs hajlama miatt a p12/CA hasítási szekvencia hozzáférhetősége eltérő lehet (Fehér és mtsai., 2006).

Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát XMRV proteázzal történő hasítását leghatékonyabban az amprenavir gátolta, már 3,3  $\mu\text{M}$  mennyiség szinte teljesen megakadályozta a hasítási termékek képződését, míg a TL-3 inhibitor esetén az 1mM-os koncentráció is kevésnek bizonyult a hatékony gátló hatás eléréséhez (21. ábra). Nagy ionerősségű közegben, HPLC módszer alkalmazása esetén alacsonyabb TL-3 koncentráció is hatékonyabb gátlást eredményezett (2. táblázat).



**21. ábra: Rekombináns MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát hasítása XMRV proteázzal és a hasítás gátlása amprenavirral és TL-3 inhibitorokkal, 14%-os SDS-poliakrilamid gélen.** 1: XMRV PR (30 nM). 2: rekombináns MLV Gag $\Delta 2$  (3,7  $\mu\text{M}$ ). 3: XMRV PR proteáz és MLV Gag $\Delta 2$  hasítási elegye inhibitor nélkül. 4: gátlás amprenavirral (3,3  $\mu\text{M}$ ). 5: gátlás TL-3-mal (1 mM). M: molekula méret (kDa) protein standard jelölve (Fermentas, SM 0431). Az MLV  $\Delta p12$ -CA (34 kDa) és MLV CA (31 kDa) a képződött hasítási termékeket jelöli.

Az XMRV proteázt rekombináns szubsztrát alkalmazása esetén viszonylag erősen gátolja az acetil-pepszatin összehasonlítva a pepszatin A-val. A magas ionerősségű közegben (4 M NaCl tartalmú) inkubációs pufferben HPLC módszerrel mért gátlást (3. táblázat) összehasonlítottuk az alacsony ionerősségű közegben meghatározott (SDS-PAGE analízissel vizsgált) gátlási koncentrációval és úgy találtuk, hogy 3  $\mu\text{M}$  acetil-pepszatin (22. ábra) elég volt az XMRV enzim protein hasításának gátlásához, míg a pepszatin A esetén a hasonló, közel 50% gátlás eléréséhez szükséges inhibitor koncentráció 28  $\mu\text{M}$ -nak adódott (22. ábra).



**22. ábra: XMRV proteáz rekombináns MLV Gag  $\Delta$ 2 fragmentum szubsztrát acetil-pepszstatin és pepszstatin A-val történő gátlásának 14%-os SDS-PAGE gélképe.** 1: MLV Gag  $\Delta$ 2 (0,9  $\mu$ M). 2: MLV Gag $\Delta$ 2 szubsztrát hasítása XMRV proteázzal (30 nM). 3: hasítás gátlása acetil-pepszstatinnal (3,1  $\mu$ M). 4: hasítás gátlása pepszstatin A-val (28  $\mu$ M). M: molekula tömeg (kDa) standard (Fermentas, SM 0431) jelölve. Az MLV  $\Delta$ p12-CA (34 kDa) és MLV CA (31 kDa) a képződött hasítási termékeket jelöli.

### 4.3. Röntgenkristallográfia és molekuláris modellezés

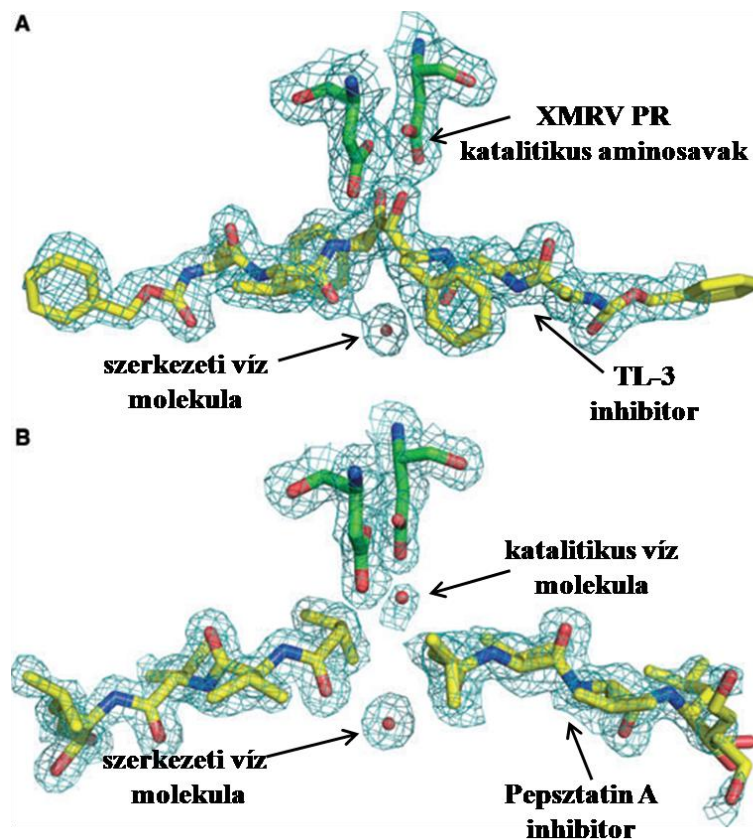
#### 4.3.1. XMRV enzim-inhibitor kölcsönhatás vizsgálata

Az XMRV PR aszpartil proteáz inhibitorokkal (pepszstatin A, acetil-pepszstatin, TL-3) alkotott komplexeinek kristályszerkezetét Alexander Wlodawer és munkatársai vizsgálták korábban (Li és mtsai., 2011a, 2012). Az XMRV enzim-inhibitor komplexek kristályait Li és munkatársai csak az apoenzim kristályok növekedésétől eltérő körülmények között tudták növeszteni (Li és mtsai., 2011a). Amint azt várták, az enzim azon lebeny régiói (amelyek a retropepszinekből az aktív helyeket takarják, és amik az apoenzimben részben rendezetlenek) teljesen rendezettek voltak az enzim-inhibitor komplexekben.

Az XMRV proteáznak a C2 szimmetrikus TL-3 inhibitorral alkotott komplexében (22.A ábra) az inhibitor molekula a proteáz dimerhez egy kifeszített (kanonikus) konformációban kötődik. Az elektronsűrűség az inhibitornak megfelelően nagyon kiegyenlített és a TL-3 főként egy irányban kötődik és csak alacsony kötési arány (20%) figyelhető meg a másik irányban. Habár az inhibitor szimmetrikus, az enzimhez való kötődési módja nem szimmetrikus, így az inhibitor irányítottságát az a tény határozza meg, hogy az enzim aktív centrumában a TL-3 két központi hidroxil csoportja közül csak egy hidroxil csoport foglalja el

a nukleofil vízmolekula helyét a két katalitikus aszpartát között. A második hidroxil csoport a dimerben a két katalitikus aszpartát közül csak az egyikkel lép kölcsönhatásba (Li és mtsai., 2011b).

A pepsztatin A enzimhez való kötődési módja azonban nagyon szokatlanak adódott. Egyetlen pepsztatin A molekula helyett két molekula kötődik az enzimhez, az N-terminális izovaleril csoportok a katalitikus hely felé orientálódnak (22.B ábra). Szintén jelen van az a katalitikus vízmolekula, amely rendszerint megtalálható a két aszpartát között a nem gátolt aszpartil proteázok szerkezeteiben, habár ez a hely valószínűleg csak részben foglalt, amint azt a viszonylag gyengébb elektronsűrűség is jelzi. Másrészt az a vízmolekula, amely elősegíti az inhibitor és az enzim lebenyei közötti kölcsönhatás kialakulását (Perryman és mtsai., 2010) teljesen kötött mindkét inhibitor komplexben.



**22. ábra:** Az XMRV PR és inhibitorok közötti kölcsönhatás. (Li és mtsai., 2011b alapján). Elektronsűrűség térkép egy TL-3 inhibitor (A) és két pepsztatin A molekula (B) kötődése esetén

A pepsztatin A nagyon eltérő módon kötődik az XMRV enzimhez a többi inhibitorhoz képest, mivel két inhibitor molekula kötődik az enzim dimerjéhez, míg a TL-3 vagy az amprenavir esetében csak egyetlen inhibitor molekula. Ennek ellenére az inhibitorok és az

enzim közötti kölcsönhatások rendkívül hasonlóak. Az aszpartil proteáz inhibitorok nem kanonikus kötési módjait már korábban is feljegyezték például a plazmepszin I és II komplexeinél (Bhaumik és mtsai., 2011, Prade és mtsai., 2005) valamint a hiszto-aszpartil proteázok számos inhibitoránál (Bhaumik és mtsai., 2011). Azonban a pepsztatin A kötési módjához hasonló még nem közöltek.

#### **4.3.2. Az XMRV és a HIV-1 proteázok pepsztatin A és acetyl-pepsztatin inhibitorokkal való kölcsönhatásának vizsgálata**

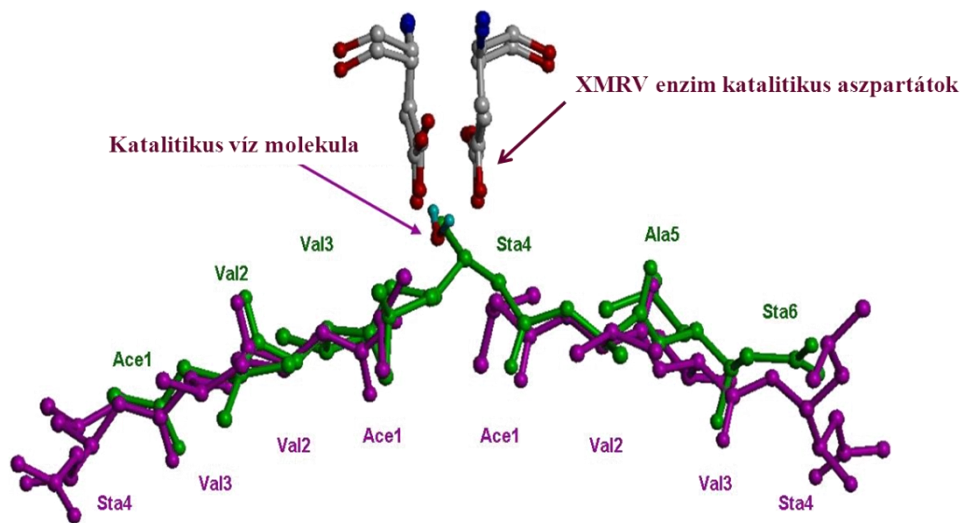
A kölcsönhatási energia-számításokat azzal a céllal hajtottuk végre, hogy vizsgáljuk az enzim–inhibitor kölcsönhatásokat és magyarázzuk a pepsztatin A és az acetyl-pepsztatin inhibitoroknak a HIV-1 PR-hoz és az XMRV PR-hoz eltérő módon való kötődését. Kétféle kötődési módot tanulmányoztunk (23. ábra): az elsőben egyetlen inhibitor kötődését modelleztük úgy, ahogy azt a HIV-1 PR/acetyl-pepsztatin kristályszerkezetében találták (Hansen és mtsai., 1988), míg a második kötődési módban két molekula egyszerre kötődik az enzimhez, egymással szemben elhelyezkedve úgy, ahogy az XMRV PR/pepsztatin A kristályszerkezetében látható (Li és mtsai., 2011b).

Az inhibitorok közötti gátlási hatékonyság különbségek azonban nem értelmezhetőek kizárólag a számított kölcsönhatási energiák alapján, ugyanis az S4/S4' helyek az oldószer felé nyitottak, ami megnehezíti vizsgálatukat. A munkacsoportunk már korábban folytatott (Eizert és mtsai., 2008) vizsgálatokat, melyben számos retrovirális proteáz aminosav preferenciáját vizsgálták szintetikus oligopeptid szubsztrát-sorozatok segítségével, valamint meghatározták a szubsztrátkötő alhelyek méretét is. A jelen vizsgálatokban nem végeztük el a zsebek méretének vizsgálatát. Az MLV és XMRV enzimek nagy szekvencia azonosságot mutatnak, ezért az egyes szubsztrátkötő alhelyeket felépítő aminosavak is megegyeznek. Így a korábbi aminosav-preferencia-vizsgálatok eredményeivel együtt értelmeztük eredményeinket.

A HIV-1 proteáznak mind acetyl-pepsztatinnal (Hansen és mtsai., 1988), mind pepsztatin A-val alkotott komplexének kristályszerkezete ismert (Fitzgerald és mtsai., 1990). A HIV-1 PR esetében egyetlen acetyl-pepsztatin molekula kötődik az enzimhez átmeneti állapot analójként, melynek következtében a központi sztatín (Sta) származék hidroxil csoportja a katalitikus aszpartát oldalláncai között helyezkedik el, a katalitikus vízmolekulát helyettesítve (Hansen és mtsai., 1988).

A HIV-1 enzim pepsztatin A-hoz való kötődése (Fitzgerald és mtsai., 1990) eltér az XMRV proteáz más inhibitorainak kötődési módjától (Li és mtsai., 2011b).

A sztatin tartalmú inhibitorok XMRV és HIV-1 proteázokhoz való kötődését mutatja a 23. ábra.



**23. ábra: Acetil-pepszatin kötődése HIV-1 proteázhoz valamint pepsztatin A kötődési módja XMRV protáz esetén.** (Matúz és mtsai., 2012 alapján) Zöld színnel jelölve az acetil-pepszatin kötődési módja HIV-1 PR-hoz (PDB kód: 5HVP) (Fitzgerald és mtsai., 1990) és lila színnel jelölve a pepsztatin A kötődése XMRV (PDB kód: 3SM1) (Li és mtsai., 2011b) proteázhoz.

Az acetil-pepszatin XMRV proteázhoz való kötődése esetén a katalitikus aszpartátok közelében tapasztalt nagyon gyenge elektronsűrűség azt sugallja, hogy a kötőmódnak hasonlónak kellene lennie a pepsztatin A kötődéséhez, vagyis két molekula egymással szemben elhelyezkedve található a komplexben. Az elektronsűrűség térképen csak a P1-P4 aminosavak látszanak, a „kilógó” aminosavak nem látszanak a szerkezetben, azok a kristályszerkezetben rendezetlenek. A kristályszerkezetek alapján feltételezhető, hogy az XMRV proteáz esetén mindkét, az egyszeres illetve kétszeres kötődési mód megvalósul illetve a kevert módon is megvalósulhat a gátlás.

A pepsztatin A-nak az XMRV proteázhoz történő kötődése esetében, kötődő inhibitor molekula nem átmeneti állapot analógnaként működik (Li és mtsai., 2011b). A kölcsönhatási energiákat az inhibitoroknak az enzimekhez történő mindkét kötődési módjára kiszámoltuk. A számolt egyedi alhelyek kölcsönhatási energiák jelentős különbséget a két inhibitor esetén csak ott mutattak, ahol az acetyl (Ace) vagy izovaleril (Iva) csoportok alakítanak ki kölcsönhatást az enzimmel, ugyanis a pepsztatin A és az acetil-pepszatin molekulák csak az N-terminális végükben különböznek egymástól (7. ábra). Az eredményeink azt mutatják, hogy a pepsztatin A nagyobb Iva csoportjának a megkötése az összes vizsgált kötődési

módban nagyobb kölcsönhatási energiát eredményezett, mint az acetil-pepszatin kisebb Ace csoportjának a bekötődése, összhangban az enzim-ligand kölcsönhatások általánosan hidrofób természetével (6. táblázat). Ezzel ellentétben az enzimkinetikai vizsgálatok alapján az acetil-pepszatin mindkét proteáz esetén hatékonyabbnak bizonyult a pepszatin A-hoz képest, ami nem magyarázható kizárólag csak a vizsgálatainkban alkalmazott kölcsönhatási energia számítási eljárás segítségével kapott értékek figyelembevételével. A két pepszatin A molekula XMRV proteázhoz való kötődésének vizsgálata esetén lényegesen magasabb enzim-inhibitor kölcsönhatási energiát eredményezett egyetlen molekula megkötéséhez képest, amíg a HIV-1 proteáznál az egyszeres inhibitor kötődése bizonyult kedvezőbbnek (4. táblázat). Az XMRV PR esetén a két pepszatin A kötődése tűnt kedvezőbbnek, míg az acetil-pepszatin kötődésének szimulálása közel -105 kcal/mol kölcsönhatási energia értéket eredményezett (4. táblázat).

A kísérletes gátlási vizsgálatok eredményeivel összevetve elmondható, hogy HIV-1 enzim esetén a pepszatin A és az acetil-pepszatin bekötődésének lehetséges módjai közül az egy inhibitoros bekötődés valószínűsíthető, amikor is átmeneti analóg kötődési mód valósul meg, ez eredményez alacsony gátlási állandó értéket (5. táblázat). Az XMRV enzim esetén a kötődés módja két inhibitoros, ami egy kedvezőtlen szubsztrát analóg kötődési módot eredményez, ezáltal a gátlási állandó értéke magas (5. táblázat). Az enzim acetil-pepszatinhoz való kötődése esetén a kölcsönhatási energiák alapján mind az egyszeres illetve kétszeres bekötődés megvalósulhat (4. táblázat).

**4. táblázat: Az XMRV proteáz acetil-pepszatin és pepszatin A inhibitorokkal alkotott komplexei esetében számított teljes kölcsönhatási energia értékek.** Számított teljes kölcsönhatási energia értékek (kcal/mol) az enzimek és inhibitor molekula/molekulák között, kiemelve a kedvezőbbnek ítélt kötődési módhoz tartozó kölcsönhatási energiák.

Kötődés módja	egy inhibitor kötődésekor		két inhibitor kötődésekor	
	<i>pepszatin A</i>	<i>acetil-pepszatin</i>	<i>pepszatin A</i>	<i>acetil-pepszatin</i>
<i>HIV-1 PR</i>	<b>-114,9</b>	<b>-112,6</b>	-111,5	-97,9
<i>XMRV PR</i>	-109,4	-105,3	<b>-124,3</b>	-105,6

5. táblázat: Az XMRV és HIV-1 proteáz gátlási állandó értékei acetil-pepszatin és pepszatin A inhibitorok esetén valamint a kölcsönhatási energiák alapján lehetséges inhibitor kötődési módok.

	<i>XMRV PR</i>		<i>HIV-1 PR</i>	
	$K_i$ (nM)	bekötődés lehetséges módja	$K_i$ (nM)	bekötődés lehetséges módja
<i>pepszatin A</i>	1442±123	két inhibitor	22±1,6	egy inhibitor
<i>acetil-pepszatin</i>	712±39	egy vagy két inhibitor	13±0,5	egy inhibitor

6. táblázat: Az egyes szubsztrátkötő alhelyek esetében számított kölcsönhatási energiák (kcal/mol) hozzájárulása az enzim-ligand teljes kölcsönhatási energiájához. Kék háttérrel kiemelve a kedvezőbbnek ítélt kötődési módhoz tartozó kölcsönhatási energiák.

#### EGY INHIBITOR BEKÖTŐDÉSE

Enzim-inh. komplex	Szubsztrátkötő alhelyek								Teljes energia
	S4	S3	S2	S1	S1'	S2'	S3'	S4'	
<i>HIV-1 - pepszatin</i>	Iva1	Val2	Val3	Sta 4		Ala5	Sta6		
	-10,85	-14,1	-16,32	-26,35		-11,43	-35,4		-114,85
<i>HIV-1 - acetil-pepszatin</i>	Ace1	Val2	Val3	Sta4		Ala5	Sta6		
	-7,06	-13,87	-16,63	-26,44		-12,05	-36,51		-112,56

<i>XMRV PR - pepszatin</i>	Iva1	Val2	Val3	Sta4		Ala5	Sta6		
	-10,9	-15,41	-15,14	-26,56		-11,1	-30,2		-109,35
<i>XMRV PR - acetil-pepszatin</i>	Ace1	Val2	Val3	Sta4		Ala5	Sta6		
	-6,17	-15,29	-15,11	-27,46		-10,96	-30,31		-105,3

#### KÉT INHIBITOR BEKÖTŐDÉSE

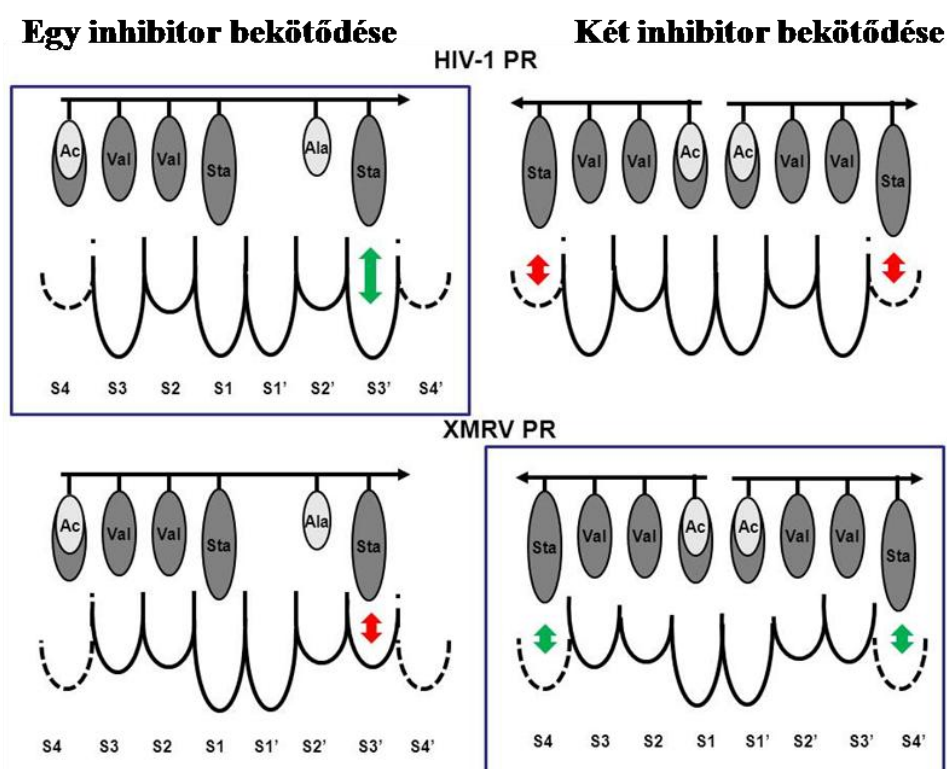
Enzim-inh. komplex	Szubsztrátkötő alhelyek								Teljes energia
	S4	S3	S2	S1	S1'	S2'	S3'	S4'	
<i>HIV-1 -pepszatin</i>	Sta4	Val3	Val2	Iva1	Iva1	Val2	Val3	Sta4	
	-10,48	-11,32	-16,23	-16,51	-16,42	-17,1	-11,13	-12,25	-111,54
<i>HIV-1 -acetil-pepszatin</i>	Sta4	Val3	Val2	Ace1	Ace1	Val2	Val3	Sta4	
	-11,61	-11,72	-16,86	-8,04	-9,01	-17,04	-11,27	-12,39	-97,93

<i>XMRV PR - pepszatin</i>	Sta4	Val3	Val2	Iva1	Iva1	Val2	Val3	Sta4	
	-14,75	-13,89	-15,76	-17,39	-17,69	-16,19	-13,41	-15,26	-124,34
<i>XMRV PR -acetil-pepszatin</i>	Sta4	Val3	Val2	Ace1	Ace1	Val2	Val3	Sta4	
	-15,36	-13,74	-16,09	-7,08	-8,39	-16,7	-13,12	-15,16	-105,64

Az XMRV PR szerkezeti és biokémiai vizsgálatainak eredményei azt mutatják, hogy más retropepszinekhez képest az enzim topológiájában lévő jelentős különbségek ellenére az enzim kölcsönhatásai ennek az enzimosztálynak a jól jellemzett inhibitoraival hasonlóak, mind szerkezeti, mind kinetikai értelemben, kivéve a pepsztatin A szokatlan kötődési módját.

Az XMRV és az MLV proteázok nagyfokú szekvencia hasonlósága és a szubsztrátkötő helyek azonos összetétele miatt feltételezhető a két enzim specificitásának nagyfokú hasonlósága. Az MLV proteáz esetében korábban már meghatározták az egyes szubsztrátkötő helyek aminosav-preferenciáját a HIV-1 (és egyéb) proteázokhoz képest (Menendez-Arias és mtsai., 1993, Bagossi és mtsai., 2005, Eizert és mtsai., 2008). Mind az MLV mind a HIV-1 PR szubsztrátkötő helyei túlnyomóan hidrofób jellegűek. Azonban a szubsztrát-specifitásban különbözőségeket is írtak le, aminek oka valószínűleg az, hogy a szubsztrátkötő helyek felépítésében más aminosavrészek vesznek részt (Li és mtsai., 2011a). Mind az MLV, mind a HIV-1 proteázok S1 helye nagyméretű, és előnyben részesíti az aromás oldalláncokat (Eizert és mtsai., 2008). Mindkét vizsgált kötőmódban, az S1 helyen számolt energiák hasonlóak mind a két enzimnél (6. táblázat). Ezek a szubsztrátkötő helyek is hozzájárulnak a „kötőmódokhoz”, azonban a gátlásban tapasztalható különbségek nem az aminosav-preferencia miatt vannak. A HIV-1 PR a kicsi hidrofób vagy egészen poláros oldalláncokat részesíti előnyben az S2 helyen, míg az MLV sokkal inkább a nagy hidrofób oldalláncokat preferálja (Menendez-Arias és mtsai., 1993). Mindkét inhibitor-kötő módban egy Val aminosavrész foglalja el az S2 helyet, míg vagy Ala vagy pedig Val aminosavrész foglalja el az S2' helyet, és az egyes kötőmódok esetében számított kölcsönhatási energiák hasonló értékeket adnak mindkét enzim esetében (6. táblázat). Az MLV PR S2 (és S2' hely) és S3/S3' kötőhelyei kisebbek, mint a HIV-1 proteázban az ennek megfelelő helyek, az előnyben részesített P3 aminosavrészek átlagos térfogata is nagyobbak bizonyult a HIV-1 PR esetében, mint az MLV proteáz esetén (Eizert és mtsai., 2008). Mindkét kötési módban az S3 hely egy Val aminosavrész foglalja el, míg az S3' hely vagy egy Val (két-inhibitoros kötő mód) vagy egy terjedelmesebb Sta származék foglalja el. A zsebek méretével összehangban a Sta6-S3' kölcsönhatás sokkal kedvezőbb a HIV-1 PR esetében, mint az XMRV proteáznál az egyszeres kötési módban (6. táblázat). Úgy tűnik, hogy az S4/S4' kölcsönhatás is lényegesen hozzájárul a két proteáz eltérő inhibitor kötődési módjához. Az MLV/XMRV PR jórészt hidrofób S4/S4' kötőhelye jobban köt meg nagyméretű hidrofób aminosavrészeket (Menendez-Arias és mtsai., 1993) és az MLV/XMRV PR S4/S4' kötőhelyeinek átlagos üregtérfogata is alapvetően nagyobb a HIV-1 proteázénál (Eizert és mtsai., 2008), ami lehetővé teszi, hogy a Sta4 csoportok kitöltsék az S4/S4'

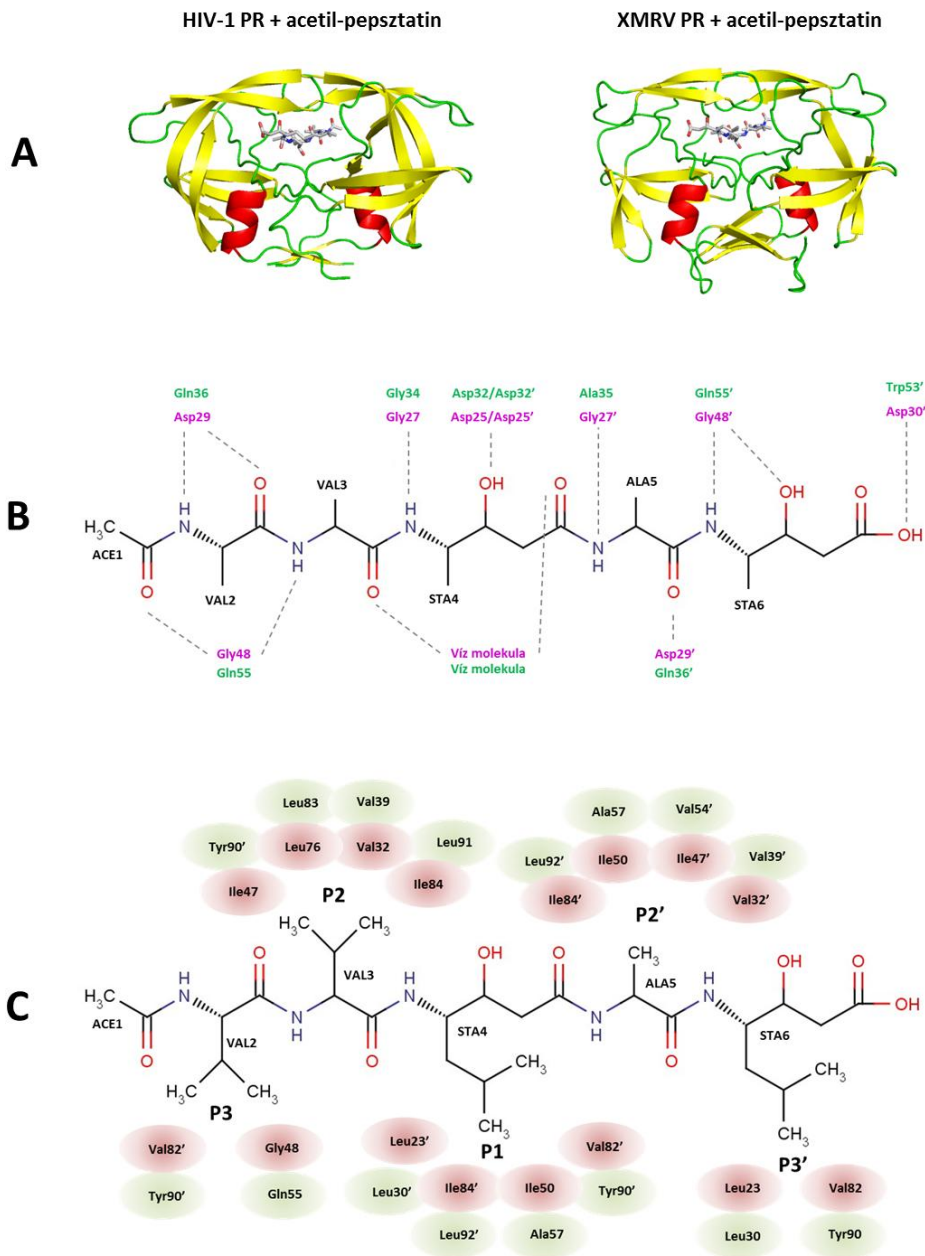
helyeket két pepsztatin A vagy acetil-pepszttatin molekula kötődésekor. Ezért a nagyobb Sta4 csoportok S4/S4' helyekre történő kötődései kevésbé kedvezőek a HIV-1 proteáz esetében, amely különbséget az XMRV proteázhoz képest az S4/S4' alhely alacsonyabb interakciós energiái is megerősítenek (6. táblázat). Érdeemes megjegyezni, hogy amíg az XMRV PR esetében két molekula pepsztatin A inhibitor kötődése valóban kedvező energetikailag, addig az XMRV PR esetében két molekula acetil-pepszttatin kötődésekor nagyon hasonló kölcsönhatási energiákat eredményezett, az acetil csoportok által biztosított lényegesen alacsonyabb S1-P1 és S1'-P1' kölcsönhatások miatt (24. ábra).



**24. ábra: A pepsztatin A és az acetil-pepszttatin inhibitorok HIV-1 és XMRV proteázokhoz való kötődési módjainak ábrázolása.** (Ábra forrása: Matúz és mtsai., 2012). A kristályszerkezeti adatok alapján a kedvezőbb kötődési módok bekeretezéssel vannak jelölve. A nyilak az inhibitorok irányát mutatják a N-terminális végtől az C-terminális felé, a szürke színű körök az inhibitor molekulák oldalláncait jelölik, a nagyobb méretű oldalláncokat nagyobb méretű körök jelölik. Az izovaleril csoporthoz képest kevésbé hidrofób acetil csoportok világosabb színű körökkel vannak jelölve. A pepsztatin A és az acetil-pepszttatin molekulák csak az N-terminális csoportjukban különböznek egymástól, a világosabbra színezett acetil csoport az N-terminális végén található, az izovaleril csoport is az N-terminálison található, sötétre színezve. A szubsztrátkötő zsebeket vonalak jelölik, a szaggatott vonallal jelölt S4 és S4' zseb a legkevésbé definiált, az oldószer felé nyitott (Eizert és mtsai., 2008). Az egyes szubsztrátkötő zsebek esetében az inhibitorral kialakított kedvező kölcsönhatások zöld, míg a kedvezőtlen kölcsönhatások piros nyíllal vannak jelölve.

Tehát a számított kölcsönhatási energiák alapján elmondható, hogy az S4/S4' kölcsönhatás lényegesen hozzájárul az acetil-pepszatin és pepszatin inhibitoroknak a HIV-1 és az XMRV proteázokhoz történő kötődéséhez. A pepszatin A-XMRV való kötődése két inhibitoros kötőmód esetén energetikailag kedvezőbb, míg az acetil-pepszatin esetében mindkét kötődési mód kölcsönhatása hasonló kölcsönhatási energiákat adott. Tehát a pepszatin A szubsztrát analóggént kötődik az XMRV proteázhoz szubsztrát analóg módon, amely kevésbé hatékony gátlást eredményez, míg az acetil-pepszatinnal való kölcsönhatás esetében megvalósulhat mind a két kötődési mód. ASta6-S3' kölcsönhatás sokkal kedvezőbb a HIV-1 PR esetében, mint az XMRV PR-nál, így a HIV-1 az egyszeres kötési módot részesíti előnyben (25. ábra). Ez a kötődés átmeneti analóg kötődési módnak felel meg, így a gátlás hatékonysága nagyobb, a gátlási állandó értéke alacsony, ezt igazolják a gátlási állandó értékek (2. táblázat).

Tehát vizsgáltuk az XMRV proteáz kinetikai paramétereit, az enzim gátlási profilját. A kísérleti munka támogatásaként bioinformatikai módszert alkalmaztunk, valamint a röntgenkristallográfiás eredményekkel együtt próbáltuk értelmezni az inhibitor bekötődés módját két klasszikus aszpartil proteáz inhibitor (pepszatin A és acetil-pepszatin) esetén, és eredményeinket össze kívántuk vetni a HIV-1 proteáz inhibitor bekötődési módjaival. Az enzim-inhibitor kristályszerkezetének részletes ismerete, valamint a szubsztrátkötő zsebeket alkotó aminosavak részletes ismerete és a kialakuló kölcsönhatások feltérképezése jelentősen hozzájárulhat az XMRV és a gammaretrovírusok ellen tervezett sokkal specifikusabb inhibitorok fejlesztéséhez.



**25. ábra: A HIV-1 és az XMRV proteázok szubsztrátkötő alhelyeinek összehasonlítása.** (Készítette: Dr. Mótyán János) A) A HIV-1 és az XMRV proteázok egy acetil-pepszatin molekulával alkotott komplexek szalagmodellje, az acetil-pepszatin molekula pálcikamoddellel ábrázolva. B) Az enzim és az acetil-pepszatin között kialakuló hidrogénkötéseket szürke szaggatott vonalak jelölik. A HIV-1 PR aminosavrészek lila, az XMRV PR aminosavrészek zöld színnel van jelölve. C) A hidrofób kölcsönhatások kialakításában szereplő aminosavrészeket zöld szín jelöli a HIV-1 acetil-pepszatinnal alkotott komplexé esetében, lila szín jelöli az XMRV azonos pozícióban lévő aminosavrészeit.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Célul tűztük ki a xenotrópikus egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) proteáz kinetikai vizsgálatát, az enzim stabilitásának és gátolhatóságának vizsgálatát HPLC valamint SDS-PAGE módszerek segítségével. Az enzim kinetikai paramétereit ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) szintetikus oligopeptid szubsztrát segítségével vizsgáltuk, az enzim dimerizációs képességét ( $K_{dapp}$ ), valamint az enzim denaturációra hajlamát ( $UD_{50}$ ) 0-4 M urea tartalmú közegben. Vizsgáltuk a proteáz gátolhatóságát különböző proteáz inhibitorok (amprenavir, TL-3, acetil-pepszatin és pepszatin A) segítségével, magas ionerősségű közeg esetében HPLC módszert, míg alacsony sókoncentráció esetén SDS-PAGE módszert alkalmaztunk a gátlás nyomon követésére. Az SDS-PAGE módszer esetén szubsztrátként egy rekombináns egér leukémi vírus (MLV) Gag fragmentumot alkalmaztunk. Összehasonlítottuk az enzim stabilitási értékeit a 1-es típusú humán immundeficiencia vírus (HIV-1) proteáz értékeivel. Molekuláris modellezéssel hasonlítottuk össze a HIV-1 és XMRV proteázoknak az acetil-pepszatin és pepszatin A inhibitorokkal alkotott komplexeit, a számított kölcsönhatási energiák segítségével vizsgáltuk az inhibitorok lehetséges kötőmódjait. Kollaborációs partnereink az enzim-inhibitor komplexeket (amprenavir, TL-3, acetil-pepszatin és pepszatin A) röntgenkristallográfiás elemzésnek vetették alá, ezzel magyarázatot adva a gátlás lehetséges módjára.

Az XMRV PR jóval érzékenyebbnek bizonyult az urea koncentrációra, mint a HIV-1 proteáz. A  $K_i$  értékek alapján a tesztelt inhibitorok közül az amprenavir bizonyult a leghatékonyabb, míg a pepszatin A a legkevésbé hatékony inhibitornak.

A korábbi (Bagossi és mtsai., 2005, Eizert és mtsai., 2008) és jelenlegi molekuláris modellezésen alapuló vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az S4/S4' kölcsönhatás is lényegesen hozzájárul az acetil-pepszatin és pepszatin inhibitoroknak a HIV-1 és az XMRV proteázokhoz történő kötődéséhez. Az XMRV proteáz-pepszatin A két inhibitoros kötőmódja energetikailag kedvezőbb, míg az acetil-pepszatin esetében az egyszeres és kettős kötődési mód hasonló kölcsönhatási energiákat adott. Az S3/S3' kötőhely mérete XMRV esetén kisebb, mint a HIV-1 esetén, így a Sta6-S3' kölcsönhatás sokkal kedvezőbb a HIV-1 PR esetében, mint az XMRV PR-nál, ezért a HIV-1 az egyszeres kötési módot részesíti előnyben.

A röntgenkristallográfiái adatok alapján, megállapítottuk, hogy az acetil-pepszatin a többi inhibitorhoz képest eltérő módon kötődik az enzimhez, mivel két inhibitor molekula kötődik az XMRV PR dimerjéhez, míg a TL-3 és az amprenavir egyetlen molekulával kötődik, mégis az inhibitorok és az enzim közötti kölcsönhatások rendkívül hasonlóak.

## 5. SUMMARY

Our objective was the kinetic examination of the viral protease of the xenotropic murine leukemia virus related virus (XMRV) and the examination of the stability and inhibition of the enzyme with the help of the HPLC as well as the SDS-PAGE methods. We examined the kinetic parameters of the enzyme ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) with the help of a synthetic oligopeptide substrate while the stability of the enzyme, i.e. its apparent dissociation constant ( $K_{dapp}$ ) and the tendency of the enzyme towards denaturation ( $UD_{50}$ ) - in a buffer containing an incrementing urea concentration. We examined the inhibition of the protease by various protease inhibitors (amprenavir, TL-3, acetyl-pepstatin and pepstatin A), while applying the HPLC method in a high salt concentration buffer, and an SDS-PAGE method in the case of a low salt concentration to follow up the inhibition measurements. In the case of the SDS-PAGE method we applied an murine leukemia virus (MLV) Gag fragment as a substrate. We compared the stability values of the enzyme with the values of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. We modeled the enzyme-inhibitor complex formed in this way (in the case of acetyl-pepstatin and pepstatin A) and we examined the interaction energies and the potential binding of the inhibitors. Our collaborators subjected the enzyme-inhibitor complex (amprenavir, TL-3, acetyl-pepstatin, and pepstatin A) to an X-ray crystallographic analysis thus providing an explanation on the possible ways of inhibition.

XMRV protease proved to be much more sensitive to the concentration of urea than the HIV-1 protease. Among the inhibitors tested, on the basis of  $K_i$  values, amprenavir proved to be the most efficient, while pepstatin A the least efficient inhibitor.

On the basis of molecular modeling we established that the S4/S4' interaction also substantially contributes to the binding of the acetyl-pepstatin and pepstatin inhibitors to the HIV-1 and XMRV proteases. The two-inhibitor binding method of the XMRV protease-pepstatine A is more favorable from an energetic point of view, while in the case of acetyl-pepstatin, the interaction of the two binding ways provided similar interactional energies. The Sta6-S3' interaction is much more favorable in the case of the HIV-1 PR than in the case of the XMRV PR, thus HIV-1 prefers the single binding method.

X-ray crystallographic data were disclosed to us by our collaborators, and those data suggested that acetyl-pepstatin binds to the enzyme in a different manner as compared to other inhibitors as two inhibitor molecules are bound to the PR dimer of XMRV PR while TL-3 or amprenavir with a single molecule, yet the interactions between the inhibitors and the enzyme are remarkably similar.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

- Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1971). Effect of pepstatin on acid proteases. *J. Antibiot.*, **24**, 687-694.
- Aloia, A. L., Sfanos, K. S.; Isaacs, W. B., Zheng, Q., Maldarelli, F., De Marzo, A. M., Rein, A. (2010). XMRV: a new virus in prostate cancer? *Cancer Res.*, **70**, 10028–33.
- Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P., Tózsér, J. (2005). Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage site. *J. Virol.*, **79**, 4213-4218.
- Barnes, E., Flanagan, P., Brown, A., Robinson, N., Brown, H., McClure, M., Oxenius, A., Collier, J. Weber, J, Günthard, H. F, Hirschel, B, Fidler, S, Phillips, R, Frater, J. (2010). Failure to detect xenotropic murine leukemia virus-related virus in blood of individuals at high risk of blood-borne viral infections. *J. Infect. Dis.*, **202**, 1482–1485.
- Babe, L. M., Rose, J., Craik, C. S. (1995). Trans-dominant inhibitory human immunodeficiency virus type 1 protease monomers prevent protease activation and virion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10069-10073.
- Barbaro, G., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C. T. (2005). Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 1805-1843.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
- Battini, J. L., Rasko, J. E., Miller, A. D. (1999). A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1385–1390.
- Bannert, N., Kurth, R. (2004). Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14572–14579.

- Belshaw, R., Pereira, V., Katzourakis, A., Talbo, G., Paces, J., Burt, A., Tristem, M. (2004). Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4894–4899.
- Black, S. G., Arnaud, F., Palmarini, M., Spencer, T. E. (2010). Endogenous Retroviruses in Trophoblast Differentiation and Placental Development. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **64**, 255–264.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Caflisch, A., Schramm, H. J., Karplus, M. (2000). Design of dimerization inhibitors of HIV-1 aspartic proteinase: a computer-based combinatorial approach. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **14**, 161-179.
- Coffin, J. M. (1992) Structure and classification of retroviruses. The Retroviridae (ed. Levy, J.A.), 19-49. Plenum Press, NY, USA.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E. (1997). Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Crawford, S., Goff, S. P. (1985). A deletion mutation in the 5'part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins. *J. Virol.*, **53**, 899-907.
- Cullen, B. R., Greene, W. C. (1990). Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **178**, 1-5.
- Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **19**, 189-215.
- Dittmar, K., J., Moelling, K. (1978). Biochemical properties of p15-associated protease in an avian RNA tumor virus. *J. Virol.*, **28**, 106-118.
- Dong, B., Silverman, R. H., Kandel, E. S. (2008) A natural human retrovirus efficiently complements vectors based on murine leukemia virus. *PLoS One.*, **4**, 3144.
- Ellermann, V. and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.*, **46**, 595-609.

- Erlwein, O., Kaye, S., McClure, M. O., Weber, J., Wills, G., Collier, D., Wessely, S., Cleare, A. (2010). Failure to detect the novel retrovirus XMRV in chronic fatigue syndrome. *PLoS One*, **5**, e8519.
- Erlwein, O.; Robinson, M. J; Kaye, S.; Wills, G., Izui, S; Wessely, S., Weber, J., Cleare, A., Collier, D., McClure, M. O. (2011a). Investigation into the Presence of and Serological Response to XMRV in CFS Patients. Kim. *PLoS One*, **6**, e17592.
- Erlwein, O., Robinson, M. J., Dustan, S., Weber, J., Kaye, S., McClure, M. O. (2011b). DNA extraction columns contaminated with murine sequences. *PLoS One*, **6**, 23484.
- Eizert, H., Bander, P., Bagossi, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Boross, P., Weber, I. T., Tózsér, J. (2008). Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type 1 cleavage site. *J. Virol.*, **82**, 10111-10117.
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Kádas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I. T., Tózsér, J. (2006). Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the HIV-1 protease. *J. Gen. Virol.*, **87**, 1321-1330.
- Fischer, N., Schulz, C., Stieler, K., Hohn, O., Lange, C., Drosten, C., Aepfelbacher, M. (2010). Xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus in respiratory tract. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 1000–1002.
- Fitzgerald, P. M., McKeever, B. M., Van Middlesworth, J. F., Springer, J. P., Heimbach, J. C., Leu, C. T., Herber, W. K., Dixon, R. A., Darke, P. L. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepsztatin At 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14209-14219.
- Furuta, R., A., Miyazawa, T., Sugiyama, T., Kuratsune, H., Ikeda, Y., Sato, E., Misawa, N., Nakatomi, Y. (2011). No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan. *Retrovirology*, **8**, 20.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.

- Garrison, K. E., Jones, R. B., Meiklejohn, D. A., Anwar, N., Ndhlovu, L. C., Chapman, J. M., Erickson, A. L., Agrawal, A., Spotts, G., Hecht, F. M., Rakoff-Nahoum, S., Lenz, J., Ostrowski, M. A., Nixon, D. F. (2007). T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.*, **3** (11) e 165.
- Gogvadze, E., Stukacheva, E., Buzdin, A., Sverdlov, E. (2009). Human-specific modulation of transcriptional activity provided by endogenous retroviral insertions. *J. Virol.*, **83**, 6098–6105.
- Gillette, W. K., Esposito, D., Taylor, T. E., Hopkins, R. F., Bagni, R. K., Hartley, J. L. (2011). Purify First: Rapid expression and purification of proteins from XMRV. *Protein Expr. Purif.*, **76**, 238–247.
- Greenbaum, L. M., Grebow, P., Johnston, M., Prakash, A., Semente, G. (1975). Pepsztatin, an inhibitor of leukokinin formation and ascitic fluid accumulation. *Cancer Res.*, **35**, 706–710.
- Groom, H. C. T.; Boucherit, V. C., Makinson, K., Randal, E., Baptista, S., Hagan, S., Gow, J. W; Mattes, F. M. (2010). Absence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in UK patients with chronic fatigue syndrome. *Retrovirology*, **7**, 10.
- Hansen, J., Schulze, T., Mellert, W., Moelling, K. (1988). Identification and characterization of HIV-specific RNase H by monoclonal antibody. *The EMBO J.*, **7**, 239 – 243.
- Heaslet, H., Lin, Y. C., Tam, K., Torbett, B. E., Elder, J. H., Stout, C. D. (2007). Crystal structure of an FIV/HIV chimeric protease complexed with the broad-based inhibitor, TL-3. *Retrovirology*, **4**, 1.
- Henrich, T. J.; Li, J. Z.; Felsenstein, D.; Kotton, C. N.; Plenge, R. M.; Pereyra, F.; Marty, F. M; Lin, N. H. (2010). Xenotropic murine leukemia virus-related virus prevalence in patients with chronic fatigue syndrome or chronic immunomodulatory conditions. *J. Infect. Dis.*, **202**, 1478–81.
- Hohn, O., Krause, H., Barbarotto, P. (2009). Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology*, **6**, 92.

- Hohn, O., Strohschein, K., Brandt, A. U., Seeher, S., Klein, S., Kurth, R., Paul, F., Meisel, C., Scheibenbogen, C., Bannert, N. (2010). No Evidence for XMRV in German CFS and MS Patients with Fatigue Despite the Ability of the Virus to Infect Human Blood Cells In Vitro. *PLoS One*, **5**, e 15632.
- Hong, P., Li, J., Li, Y. (2010). Failure to detect Xenotropic murine leukaemia virus-related virus in Chinese patients with chronic fatigue syndrome. *Virology J.*, **7**, 224.
- Hué, S., Gray, E. R.; Gall, A., Katzourakis, A., Tan, C. P.; Houldcroft, C. J., McLaren, S.; Pillay, D. (2010). Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology*, **7** (1), 111.
- Hwang, Y. S., Chmielewski, J. (2005). Development of low molecular weight HIV-1 protease dimerization inhibitors. *J. Med. Chem.*, **48**, 2239-2242.
- Jaskólski, M., Tomasselli, A. G., Sawyer, T. K., Staples, D. G., Heinrikson, R. L., Schneider, J., Kent, S. B. H., Wlodawer, A. (1991). Structure at 2.5 Å resolution of chemically synthesised human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry*, **30**, 1600-1609.
- Jeziorski, E., Foulongne, V., Ludwig, C; Louhaem, D., Chiocchia, G., Segondy, M.; Rodière, M., Sitbon, M., Courgnaud, V. (2010). No evidence for XMRV association in pediatric idiopathic diseases in France. *Retrovirology*, **7**, 63.
- Johnson, J. M., Harrod, R., Franchini, G. (2001). Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.*, **82**, 135-47.
- Jordan, S. P., Zugay, J., Darke, P. L., Kuo, L. C. (1992). Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20028–20032.
- Junker, U., Escaich, S., Plavec, I., Baker, J., McPhee, F., Rose, J. R., Craik, C. S., Böhnlein, E. (1996). Intracellular expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease variants inhibits replication of wild-type and protease inhibitor-resistant HIV-1 strains in human T-cell lines. *J. Virol.*, **70**, 7765-7772.
- Kang, D. E., Lee, M. C., Das Gupta, J., Klein, E. A., Silverman, R. H. (2011) XMRV Discovery and prostate cancer-related research. *Adv. Virol.*, **432837**, 10 .

- Katoh, I., Yoshinaka, Y., Rein, A., Shibuya, M., Odaka, T., Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus maturation: Protease region required for conversion from "immature" to "mature" core form and for virus infectivity. *Virology*, **145**, 280-292.
- Katoh, I., Yasunaga, T., Ikawa, Y., Yoshinaka, Y. (1987). Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase. *Nature (London)*, **329**, 654-656.
- Katz, R. A., Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 133-173.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.*, **63**, 3708-3713.
- Kotler, M., Katz, R. A., Danbo, W., Leis, J., Skalka, A. M. (1988). Synthetic peptides as substrates and inhibitors of a retroviral protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4185-89.
- Kotler, M., Danho, W., Katz, R. A., Leis, J., Skalka, A. M. (1989). Avian retroviral proteases and cellular aspartic proteases are distinguished by activities on peptide substrates. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3428-3435.
- Kovalskaya, E., Buzdin, A., Gogvadze, E., Vinogradova, T., Sverdlov, E. (2006). Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*, **346**, 373-378.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J. M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S. P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A. M., Temin, H. M., Vogt, V. (1988). Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.*, **62**, 1808-1809.
- Lee, T., Laco, G. S., Torbett, B. E., Fox, H. S., Elder, J. H., Lerner, D. L., Wong, C. H. (1998). Analysis of the S3 and S3' subsite specificities of feline immunodeficiency virus (FIV) protease: Development of a broad-based protease inhibitor efficacious against FIV, SIV, and HIV in vitro and ex vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 939.
- Lee, K., Jones, K. S. (2010). The path well traveled: using mammalian retroviruses to guide research on XMRV. *Mol. Interv.*, **10**, 20-24.

- Levy, J. A., Shimabukuro, J. M. (1985). Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J. Infect. Dis.*, **152**, 734-738.
- Li, J., Akagi, K., Hu, Y., Trivett, A. L., Hlynialuk, C. J., Swing, D. A., Volfovsky, N., Morgan, T. C., Golubeva, Y., Stephens, R. M., Smith, D. E., Symer, D. E. (2012). Mouse endogenous retroviruses can trigger premature transcriptional termination at a distance. *Genome Res.*, **22**, 870–884.
- Li, M., DiMaio, F., Zhou, D., Gustchina, A., Lubkowski, J., Dauter, Z., Baker, D., Wlodawer, A. (2011a). Crystal structure of XMRV protease differs from the structures of other retrópepsins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 227-229.
- Li, M., Gustchina, A., Matúz, K., Tózsér, J., Namwong, S., Goldfarb, N. E., Dunn, B. M., Wlodawer, A. (2011b). Structural and biochemical characterization of the inhibitor complexes of xenotrópic murine leukemia virus-related virus protease. *FEBS J.*, **278**, 4413-4424.
- Linial, M. L., Fan, H., Hahn, B., Löwer, R., Neil, J., Quackenbush, S., Rethwilm, A., Sonigo, P., Stoye, J., Tristem, M. (2005). Retroviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, 421–440.
- Liu, F., Boross, P. I., Wang, Y F., Tozser, J., Louis, J. M., Harrison, R. W., Weber, I. T. (2005). Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J. Mol. Biol.*, **354**, 789-800.
- Lo, S. C., Pripuzova, N., Li, B., Komaroff, A. L., Hung, G. C., Wang, R., Alter, H. J. (2010). Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15874–15879.
- Lo, S. C., Pripuzova, N., Li, B., Komaroff, A. L., Hung, G. C., Wang, R., Alter, H. J. (2012). Retraction of Lo et al., Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 346.

- Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W. D, Gupta, J. P. M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Sadowski P. (2009). Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science*, **326**, 585–589. (partial retraction)
- Louis, J. M., McDonald, R., Nashed, N., Wondrak, E. M., Jerina, D., Oroszlan, S., Mora, P. (1991). Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 361–369.
- Louis, J. M., Oroszlan, S., Tózsér, J. (1999). Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6660–6666.
- Luczkowiak, J., Sierra, O., González-Martín, J. J., Herrero-Beaumont, G., Delgado, R. (2011). No xenotropic murine leukemia virus-related virus detected in fibromyalgia patients. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 314–315.
- Maibaum, J., Rich, D. H. (1988). Inhibition of porcine pepsin by two substrate analogues containing statine. The effect of histidine at the P2 subsite on the inhibition of aspartic proteinases. *J. Med. Chem.*, **31**, 625–629.
- Matúz, K., Mótyán, J., Li, M., Wlodawer, A., Tózsér J. (2012). Inhibition of XMRV and HIV-1 proteases by pepstatin A and acetyl-pepstatin. *FEBS J.*, **279**, 3276-86.
- Maric, R., Pedersen, F. S., Kjeldbjerg, A., Moeller-Larsen, A., Bahrami, S., Brudek, T., Petersen, T., Christensen, T. (2010). Absence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in Danish patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Virol.*, **49**, 227–8.
- Martinez-Fierro, M. L., Leach, R. J., Gomez-Guerra, L. S., Garza-Guajardo, R., Johnson-Pais, T., Beuten, J., Morales-Rodriguez, I. B.; Hernandez-Ordoñez, M ,A. (2010). Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer. *BMC Cancer*, **10**, 326.
- McLaughlin-Drubin, M. E., Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 127–50.
- McPhee, F., Good, A. C., Kuntz, I. D., Craik, C. S. (1996). Engineering human immunodeficiency virus 1 protease heterodimers as macromolecular inhibitors of viral maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11477-11481.

- Menendez-Arias, L., Gotte, D., Oroszlan, S. (1993). Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology*, **196**, 557–563.
- Menendez-Arias, L., Tózsér, J. (2008). HIV-1 protease inhibitors: effects on HIV-2 replication and resistance. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 42-49.
- Menéndez-Arias, L. (2011). Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Rev.Med. Virol.*, **21**, 3–17.
- Miklóssy, G., Tózsér, J., Kádas, J., Ishima, R., Louis, J. M., Bagossi, P. (2008). Novel macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. *Prot. Eng. Des. Sel.*, **21**, 453-461.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J. K. M., Leis, J., Wlodawer, A. (1989a). Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature*, **337**, 576-579.
- Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B. K., Toth, M., Marshall, G. R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S. B., Wlodawer, A. (1989b) Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-base inhibitor at 2,3 Å resolution. *Science*, **246**, 1149-1152.
- Moloney, J. B. (1960). Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **24**, 933-51.
- Morigaki, T., Sugavara, K., Ito, Y. (1981). Effect of protease inhibitors on the activation of Epstein-Barr virus repressed in cultured lymphoid cells. *Intervirology*, **16**, 49-52.
- Navia, M. A., Fitzgerald, P. M. D., Mckeever, B. M., Leu, C. T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Dark, P.L., Springer, J. P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*, **337**, 615-620.
- Nelson, P. N., Carnegie, P. R., Martin, J., Davari Ejtehadi, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J. (2003). Demystified . Human endogenous retroviruses. *Mo. Pathol.*, **56**, 11–18.
- Olivares, I., Mulky, A., Boross, P. I., Tózsér, J., Kappes, J. C., López-Galíndez, C., Menéndez-Arias, L. J. (2007). HIV-1 protease dimer interface mutations that compensate for viral reverse transcriptase instability in infectious virions. *J. Mol. Biol.*, **372**, 369-381.

- Oakes, B., Tai, A. K., Cingöz, O., Henefield, M. H., Levine, S., Coffin, J. M., Huber, B. T. (2010). Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology*, **7**, 109.
- Oroszlan, S., Henderson, L. E., Stephenson, J. R., Copeland, T. D., Long, C. W., Ihle, J. N., Gilden, R. V. (1978). Amino- and carboxyl-terminal amino acid sequences of proteins coded by gag gene of murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1404-1408.
- Oroszlan, S., Tózsér, J. (1990). The retroviral proteinases. *Seminars in Virology*, **1**, 369-378.
- Paprotka, T., Venkatachari, N. J., Chaipan, C., Burdick, R., Delviks-Frankenberry, K. A., Hu, W. S., Pathak, V. K. (2010). Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs. *J. Virol.*, **84**, 5719–5729.
- Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K. A., Cingoz, O., Martinez, A., Kung, H. J., Tepper, C. G., Hu, W. S., Fivash, M. J. Jr., Coffin, J. M., Pathak, V. K. (2011). Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science*, **333**, 97–101.
- Pavlakakis, G. N., Felber, B. K. (1990). Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol.*, **2**, 20-31.
- Pearl, L. H., Taylor, W. R. (1987). A structural model for the retroviral proteases. *Nature*, **329**, 351-353.
- Pearson, L., Garcia, J., Wu, F., Modesti, N., Nelson, J., Gaynor, R. (1990). A transdominant tat mutant that inhibits tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5079-5083.
- Perryman, A. L., Zhang, Q., Soutter, H. H., Rosenfeld, R., McRee, D. E., Olson, A. J., Elder, J. E., Stout, C. D. (2010). Fragment -based screen against HIV protease. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **75**, 257-268.
- Pi, W., Zhu, X., Wu, M., Wang, Y., Fulzele, S., Eroglu, A., Ling, J., Tuan, D. (2010). Long-range function of an intergenic retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12992–12997.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P.A., Minna, J. D. and Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7415-7419.

- Prade, L., Jones, A. F., Boss, C., Richard-Bildstein, S., Meyer, S., Binkert, C., Bur, D. (2005). X-ray structure of plasmepsin II complexed with a potent achiral inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **280**, 23837-43.
- Randolph, J. T., DeGoey, D. A. (2004). Peptidomimetic inhibitors of HIV protease. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 1079-1095.
- Regenmortel, M., Fauquet, C., Bishop, D E, Carstens, E., Estes, M., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M., McGeoch, D., Pringle, C., Wickner, R. (2000). 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press*, San Diego, 1-1045.
- Rein, E. Harvin, D. P., Mirro, J. M., Ernst, S. M., Gorelick, R. J.(1994). Evidence that a central domain of nucleocapsid protein is required for RNA packaging in murine leukemia virus. *J. Virol.*, **68**, 6124–6129.
- Rezacova, P., Brynda, J., Fabry, M., Horejsi, M., Stouracova, R., Lescar, J., Chitarra, V., Riottot, M. M., Sedlacek, J., Bentley, G. A. (2002). Inhibition of HIV protease by monoclonal antibodies. *J. Mol. Recognit.*, **15**, 272-276.
- Richards, A. D., Roberts, R. F., Dunn, B. M., Graves, M. C., Kay, J. (1989). Effective blocking of HIV-1 proteinase activity by characteristic inhibitors of aspartic proteinases. *FEBS Lett.*, **247**, 113-117.
- Roberts, N. A., Martin, J. A., Kinchington, D., Broadhurst, A. V., Craig, J. C. (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science*, **248**, 358-61.
- Robinson, M. J., Erlwein, O. W., Kaye, S; Weber., J; Cingoz, O., Patel, A., Walker, M. M., Kim, W. J. (2010). Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology*, **7**, 108.
- Rozières, S., Swan, C. H., Sheeter, D. A., Clingerman, K. J., Lin, Y. C., Resendiz, S.H., Henriksen, S., Torbett, B. E., Elder, J. H. (2004). Assessment of FIV-C infection of cats as a function of treatment with the protease inhibitor, TL-3. *Retrovirology*, **1**, 38.
- Rozzelle, J. E., Dauber, D. S., Todd, S., Kelley, R., Craik, C. S. (2000). Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. Characterization of designed heterodimers. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7080-7086.

- Rudich, A., Ben-Romano, R., Etzion, S., Bashan, N. (2005). Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol. Scand.*, **183**, 75-88.
- Ryan, F. P. (2004). Human endogenous retroviruses in health and disease: a symbiotic perspective. *J. R. Soc. Med.*, **97**, 560–565.
- Sakuma, T., Hue, S., Squillace, K. A., Tonne, J. M., Blackburn, P.R., Ohmine, S., Thatava, T., Towers, G. J., Ikeda, Y. (2011). No Evidence of XMRV in Prostate Cancer Cohorts in the Midwestern United States. *Retrovirology*, **8**, 23.
- Sali, A., Blundell, T. L. (1990). Definition of general topological equivalence in protein structures. A procedure involving comparison of properties and relationships through simulated annealing and dynamic programming. *J. Mol. Biol.*, **212**, 403–428.
- Satterfield, B. C., Garcia, R. A., Gurrieri, F., Schwartz, C. E. (2010). PCR and serology find no association between xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and autism. *Mol Autism.*, **1**, 14.
- Satterfield, B. C., Garcia, R. A., Jia, H., Tang, S., Zheng, H., Switzer, W. M. (2011). Serologic and PCR testing of persons with chronic fatigue syndrome in the United States shows no association with xenotropic or polytropic murine leukemia virus-related viruses. *Retrovirology*, **8**, 12.
- Sato, E., Furuta, R. A., Miyazawa, T. (2010). An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology*, **7**, 110.
- Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157-62.
- Schramm, H. J., Nakashima, H., Schramm, W., Wakayama, H., Yamamoto, N. (1991). HIV-1 reproduction is inhibited by peptides derived from the N- and C-termini of HIV-1 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 847-851.
- Schramm, H. J., de Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., Buttner, J., Dick, A., Schramm, W. (1999). Lipopeptides as dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biol. Chem.*, **380**, 593-596.

- Schutzer, S. E.; Rounds, M. A.; Natelson, B. H.; Ecker, D. J., Eshoo, M. W. (2011). Analysis of cerebrospinal fluid from chronic fatigue patients for multiple human ubiquitous viruses and XMRV. *Ann. Neurol.*, **69**.
- Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M., Singh, I. R. (2009). XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16351–6.
- Scourfield, A., Waters, L., Nelson, M. (2011). Drug combinations for HIV: what's new? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **9**, 1001–1011.
- Sfanos, K. S., Sauvageot, J., Fedor, H. L., Dick, J. D., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. (2008). A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. *Prostate*, **68**, 306–320.
- Sfanos, K. S., Aloia, A. L., Hicks, J. L., Esopi, D. M., Steranka, J. P., Shao, W., Martinez, S. S. Yegnasubramanian, S., Burns, K. H., Rein, A., De Marzo, A. M. (2011). Identification of replication competent murine gammaretroviruses in commonly used prostate cancer cell lines, *PLoS One*, **6**, 20874.
- Shultz, A., Rein, A. (1985). Maturation of murine leukemia virus env proteins in the absence of other viral proteins. *Virology*, **145**, 335-339.
- Singh, S. K. (2007). Endogenous retroviruses: suspects in the disease world. *Future Microbiol.*, **2**, 269–275.
- Smith, R., Oakes, B., Tai, A. K., Cingöz, O., Henefield, M. H., Levine, S., Coffin, J. M., Huber, B. T. (2010). Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology*, **7**, 109.
- Spencer, T. E., Palmarini, M. (2012). Endogenous retroviruses of sheep: a model system for understanding physiological adaptation to an evolving ruminant genome. *J. Reprod. Dev.*, **58**, 33–37.
- Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P., Tózsér, J. (2005). Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3086-3090.
- Stoye, J. P., Coffin, J. M. (1987). The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J. Virol.*, **61**, 2659–2669.

- Swain, A. L., Miller, M. M., Green, J., Rich, D. H., Schneider, J., Kent, S. B. H., Wlodawer, A. (1990). X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8805-8809.
- Swanstrom, R., Eron, J. (2000). Human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors: therapeutic successes and failures, suppression and resistance. *Pharmacol. Ther.*, **86**, 145-170.
- Switzer, W. M., Jia, H., Hohn, O., Zheng, H., Tang, S., Shankar, A., Bannert, N.; Simmons, G., Hendry R. M, Falkenberg, V. R, Reeves, W. C., Heneine, W. (2010). Absence of evidence of Xenotropic Murine Leukemia Virus-related virus infection in persons with Chronic Fatigue Syndrome and healthy controls in the United States. *Retrovirology*, **7**, 57.
- Taylor, C. S., Nouri, A., Lee, C. G., Kozak, C., Kabat, D. (1999). Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 927–932.
- Ting, C. N., Rosenber, M. P., Snow, C. M., Samuelson, L.C., Meisler, M., H. (1992). Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.*, **6**, 1457–1465.
- Todd, S., Anderson, C., Jolly, D. J., Craik, C. S. (2000a). HIV protease as a target for retrovirus vector-mediated gene therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 168-188.
- Todd, S., Laboissiere, M. C., Craik, C. S. (2000b). Yeast two-hybrid assay for examining human immunodeficiency virus protease heterodimer formation with dominant-negative inhibitors and multidrug-resistant variants. *Anal. Biochem.*, **277**, 247-253.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K., Miyata, T. (1985). Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature*, **315**, 691.
- Tózsér, J., Blaha, I., Copeland, T. D., Wondrak, E. M., Oroszlan, S. (1991). Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett.*, **281**, 77–80.
- Tózsér J., Weber I. T, Gustchina A, Bláha I, Copeland T. D, Louis J. M, Oroszlan S. (1992). Kinetic and modeling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry*. **31**, 4793-800.

- Tózsér, J., (2001). HIV inhibitors: problems and reality. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **946**, 145-159.
- Tózsér, J. (2003). Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr. Topics in Med. Chem.*, **3**, 1447-1457.
- Tózsér, J., Oroszlan, S. (2003). Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 1803-1815.
- Tuke, P. W., Tettmar, K. I., Tamuri, A., Stoye, J. P., Tedder, R. S. (2011). PCR master mixes harbour murine DNA sequences. Caveat emptor! *PLoS One*, **6**, e19953.
- UNAIDS (2013) UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. URL: [http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf).
- Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R. (2006). Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.*, **2**, e25.
- Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H., DeRisi, J. L. (2012). Retraction: Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL Variant. *PLoS Pathog.*, **8**, 10.1371.
- van Kuppeveld, F. J., Jong, A. S., Lanke, K. H., Verhaegh, G. W., Melcher, W. J., Swanink, C. M., Bleijenberg, G., Netea, M. G., Galama, J. M., van der Meer, J. W. (2010). Prevalence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in patients with chronic fatigue syndrome in the Netherlands: retrospective analysis of samples from an established cohort. *BMJ*, **340**, c1018.
- van de Lagemaat, L. N., Landry, J. R., Mager, D. L., Medstrand, P. (2003). Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet.*, **19**, 530–536.
- Varmus, H. E., Brown, P. (1989). Retroviruses. In: Howe, M. and Berg, D. (eds) Mobile DNA. *ASM Press*, Washington DC, USA. 53-109.

- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A. M., Vanham, G., Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.*, **7**, 266–81.
- Verhaegh, G. W., De Jong, A. S.; Smit, F. P., Jannink, S. A., Melchers, W. J., Schalken, J. A. (2011). Prevalence of human xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus (XMRV) in Dutch prostate cancer patients. *Prostate*, **71**, 415–420.
- Wolff, D., Gerritzen, A. (2011). Presence of murine leukemia virus (MLV)-related virus gene sequences in a commercial RT-PCR reagent. *Clin. Lab.*, **57**, 631–634.
- Yang, T. L., Gu, L., Xu, S., Hollan, C. A., Kitamura, T. (1999) Receptors for polytropic and xenotropic mouse leukaemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. *Nat. Genet.*, **21**, 216–219.
- Yehia, N. A., Antuch, W., Beck, B., Hess, S., Schauer-Vukasinovic, V., Almstetter, M., Furer, P., Herdtweck, E., Domling, A. (2004). Novel nonpeptidic inhibitors of HIV-1 protease obtained via a new multicomponent chemistry strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 3121-3125.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T. D., Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1618-1622.

Iktatószám: DEENKÉTK/303/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Matúz Krisztina

Neptun kód: MUW3NK

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Matúz, K.**, Mótyán, J.A., Li, M., Wlodawer, A., Tózsér, J.: Inhibition of XMRV and HIV-1 proteases by pepstatin A and acetyl-pepstatin.  
*FEBS J.* 279 (17), 3276-3286, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08714>  
IF:3.79 (2011)
2. Li, M., Gustchina, A., **Matúz, K.**, Tózsér, J., Namwong, S., Goldfarb, N.E., Dunn, B.M., Wlodawer, A.:  
Structural and biochemical characterization of the inhibitor complexes of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease.  
*FEBS J.* 278 (22), 4413-4424, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08364.x>  
IF:3.79



### További Közlemények

3. Kádas, J., Boross, P., Weber, I.T., Bagossi, P., **Matúz, K.**, Tózsér, J.: C-terminal residues of mature human T-lymphotropic virus type 1 protease are critical for dimerization and catalytic activity.  
*Biochem. J.* 416 (3), 357-364, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20071132>  
IF:4.371
4. Sperka, T., Miklóssy, G., Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., **Matúz, K.**, Harrison, R.W., Weber, I.T., Tózsér, J.: Bovine leukemia virus protease: Comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus protease.  
*J. Gen. Virol.* 88 (7), 2052-2063, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82704-0>  
IF:3.12

**Összesített impakt faktor: 15.071**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapján szolgáló közlemények esetén): 7.58**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.17



## 7. TÁRGYSZAVAK / KEYWORDS

**XMRV PR**, xenotrópikus egér leukemia vírus proteáz / xenotropic murine leukemia protease

**MLV PR**, egér leukemia vírus proteáz / murine leukemia virus protease

**HIV-1 PR**, 1-es típusú humán immundeficiencia vírus proteáz / human immunodeficiency virus protease

**MLV Gag fragmentum** / MLV Gag fragment

**pepszatin A** / pepstatin A

**acetyl-pepszatin** / acetyl-pepstatin

**TL-3** / TL-3

**amprenavir** / amprenavir

**inhibitor komplex** / inhibitor complex

**röntgenkristályszerkezet** / X-ray crystallography

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Tózsér József* egyetemi tanár Úrnak a munkám során nyújtott professzionális szakmai irányítását és emberi támogatását.

Köszönöm *Dr. Fésüs László* akadémikus, egyetemi tanár Úrnak, hogy tanulmányaimat a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezhettem, melyet emberileg és szakmailag mindvégig támogatott.

Köszönöm *Dr. Boross Péter* egyetemi tanársegéd Úrnak a gyakorlati munkában nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönetet mondok *Dr. Sperka Tamás*nak, *Dr. Kádas János*nak, *Dr. Miklóssy Gabriellának*, †*Dr. Bagossi Péter*nek és *Dr. Mótyán János*nak szakmai segítségükért, valamint *Dr. Varga Angelika*, *Dr. Eizert Helga*, *Golda Mária* és *Dr. Mohamed Mahdi* kollégáimnak és egyben barátaimnak, hogy bármikor számíthattam rájuk. *Bander Pálmának*, *Dr. Farkas Bencének*, *Bozóki Beának*, *Tóth Ferencnek*, *Nagy Katának*, *Gazda Líviának* szakmai és emberi támogatását is tisztelettel megköszönöm.

Köszönöm *Pető Szilvia* és *Szabó Katalin* asszisztenseknek a baráti és szakmai segítségüket.

Elismeréssel és megbecsüléssel adózom a DE Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet dolgozóinak, akik valamilyen formában hozzájárultak Ph.D. értekezésem elkészítéséhez.

Köszönöm *Alexander Wlodawer*nek és munkacsoportjának, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az XMRV enzimet valamint, röntgenkristallográfiás méréseikkel és tapasztalataikkal hozzájárultak munkámhoz.

A kutatás a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/ KONV-2010-0007 projekt, az OTKA K68288 és az OTKA 101591 pályázatok támogatásával valósulhatott meg.

Köszönöm édesanyámnak és édesapámnak, férjemnek a támogatásukat, akik nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

## 9. FÜGGELÉK

### Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

**Matúz K.:** Studies on the inhibition of the gammaretrovirus XMRV protease (2011). *4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Galyatető, 2011. január 11–14.

**Matúz K.:** Studies on the inhibition of the gammaretrovirus XMRV protease (2012). *5th Molecular Cell and Immune Biology Winter School*, Galyatető, 2012. január 03–07.

### Egyéb előadások:

**Matúz K.** HTLV (humán T-limfotróp vírus) és BLV (marha leukémia vírus) mutáns proteázok vizsgálata. *Ph.D. és Tudományos Diákköri Konferencia*, Debrecen, 2006.

**Matúz K.** Mutáns deltaretrovírus proteázok vizsgálata. *Ph.D. és Tudományos Diákköri Konferencia*, Debrecen, 2007.

### Poszterek:

**Matúz K.,** Bagossi P., Kádas J., Tőzsér J. Deltaretrovírus proteázok szerkezetjölása mutagenézis-vizsgálatok segítségével. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése*, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 02.

Miklóssy G., **Matúz K.,** Kádas J., Tőzsér J., Bagossi P. Transz domináns negatív HIV proteáz gátló hatása. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése*, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 02.

**Matúz K.,** Boross P., Bagossi P., Miklóssy G., Tőzsér J. Mutáns deltaretrovírus proteázok vizsgálata. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése*, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.

Miklóssy G., Kádas J., **Matúz K.,** Tőzsér J., Bagossi P. Mutáns HIV-1 proteázok transz-domináns gátló hatása. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése*, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.

Farkas, B., **Matúz, K.,** Tőzsér, J. Studies on the inhibition of a gammaretroviral protease, *European Medical Students' Conference -EMESCO 2012*, Debrecen, 2012. október 18-20.

**Matúz, K.** Kassay, N., Tózsér, J. Kinetic characterization of Human T-cell lymphoma virus type 3 protease. *Hungarian Molecular Life Sciences 2013 (Molekuláris Élettudományi Konferencia 2013)*, Siófok, 2013. április 5-7.