

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A xenotróp 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**

# **A xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) proteáz biokémiai karakterizálása**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

**Matúz Krisztina**

okleveles vegyész

Készült a

Debreceni Egyetem

**Molekuláris Sejt- és Immunbiológia**

doktori iskolája keretében

**Témavezető: Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora**

*A doktori szigorlati bizottság:*

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nyitray László, az MTA doktora

Dr. Kónya József, PhD

*A doktori szigorlat időpontja:* Debreceni Egyetem ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézet Könyvtára  
2015. május 7. 11<sup>00</sup> óra

*Az értekezés bírálói:*

Dr. Bakó Éva, PhD

Dr. Venekei István, PhD

*A bírálóbizottság:*

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nyitray László, az MTA doktora

Dr. Kónya József, PhD

Dr. Bakó Éva, PhD

Dr. Venekei István, PhD

*Az értekezés védésének időpontja:* Debreceni Egyetem ÁOK Patológiai Intézet Tanterme  
2015. május 7. 13<sup>00</sup> óra

## 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 prosztatatarakos (PC) mintából izolálták, később kapcsolatba hozták a krónikus fáradtság szindrómával (CFS) is. 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 életciklusában 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.

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 azonosították. Az XMRV proteáz inhibitorral alkotott kristályszerkezete szintén nem volt ismert. Kollaborációban az amerikai Alexander Wlodawer által vezetett Makromolekuláris Kristallográfiás 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 röntgenkristallográfiás 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 retrovírus virionok átmérője 80-100 nm között változik, külső lipid burkukban (Env) virális glikoproteinek találhatóak. A burokfehérjék heterodimer tripletet tartalmaznak, melyek egy felszíni receptorkötő alhelyből (SU) és egy ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán (TM) alhelyből állnak. A belső protein mag mátrix (MA) és kapszid (CA) fehérjékből épül fel, alakjuk és elhelyezkedésük a család különböző fajaiban eltérő. A magban található a nukleokapszid (NC) fehérjével asszociált virális genom, amely az életciklushoz nélkülözhetetlen, 3 enzimet is kódol: a proteázt (PR), a reverz transzkriptázt (RT) és az integrázt (IN). A virális genom szerveződése szerint egyszerű és összetett retrovírusokat különböztetünk meg. A legegyszerűbb virális genommal rendelkező vírus, az egér leukémia vírus (MLV) esetében, a retrovirális replikációhoz csupán három, a vírus által kódolt gén szükséges. A *gag*, mely a virion struktúrális fehérjéit, a *pol*, mely a virális enzimeket és az *env*, 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 (LTR, long terminal repeat) találhatóak.

## 2.2. Endogén retrovírusok

Az endogén retrovírusok olyan endogén virális elemek, amelyek retrovírusokból származnak és állkapcsos gerinces (gnathostoma) genomokban gyakoriak. A retrovírusok replikációs ciklusa a virális genom DNS másolatának "integrációjával" a gazdasejt genomjába történő beilleszkedését vonja maga után. Ez az organizmus fogja hordozni az inzertálódott retrovirális genomot, mint "endogén" retrovírust (ERV), amelyet utódja mint egy új allélt fog örökölni. 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 betegségben, 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. A legtöbb HERV csupán az eredeti vírusok maradványa, amelyek először évmilliókkal korábban integrálódtak.

## 2.3. 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. A legtöbb retrovírus esetében ez 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. A virális DNS a PIC nélkülözhetetlen részét képező IN segítségével beépül a gazdasejt genomjába. A késői fázis első lépése a virális DNS transzkripciója, mely a celluláris RNS-polimeráz II közvetítésével megy végbe. A keletkezett mRNS molekulák egy része módosíthatatlanul elhagyja a sejtmagot és a Gag, illetve Gag-Pro-Pol poliproteinek templátja lesz a transzláció során, másik része a vírusburokba kerül és az utódvírusok genomjának örökítőanyagként szolgál. Egy kisebb, illesztett mRNS-ről íródnak át az *env*-kódolt fehérjék, melyek előbb glikozilálódnak, majd a plazmamembránba való transzport során egy felületi (SU) és egy transzmembrán (TM) fehérjére hasadnak celluláris proteáz hatására. 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 sejtből. A vírus a poliproteineket meghatározott helyeken elhasító proteáz aktiválódása után válik „éretté”, fertőzőképessé. Ekkor a vírusrészecskének tömör, HIV-1 esetén kúp-alakú belső szerkezete van, míg MLV esetén ikozaéderes. Mivel csak az „érett” vírusrészecskék fertőzőképesek, a PR működése nélkülözhetetlen a vírus replikáció során.

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

A retrovirális proteázok 99-138 aminosavrésszből álló, 11-15 kDa molekulatömegű fehérjék. A retrovirális proteázok két azonos alhelyből felépülő, dimer formában működő enzimek. A retrovirális proteázok elsődleges és másodlagos szerkezete a celluláris aszpartil proteázok egyik doménjével analóg, számos  $\beta$ -redőt és enzimtől függően alhelyenként egy vagy két rövid  $\alpha$ -hélixet tartalmaznak. A két alhely N- és C-terminális láncai összefonódva alkotnak egy négyrétegű antiparallel  $\beta$ -redőt. A HIV-1 proteázt három jellegzetes régióval jellemezhetjük: az aktív centrum, az ún. lebeny és a C-terminális közelében elhelyezkedő konzervált régió. Az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (Asp-Thr-Gly) az N-terminális közelében helyezkedik el. Az alhelyek katalitikus triádjai hurkot alkotnak. A katalitikus tripletek hidrogénkötések hálózatán keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A flexibilis lebeny régió többé-kevésbé konzervatív, mely a szubsztrát, illetve az inhibitor kötődésekor elmozdul és ráhajlik a ligandra, ezáltal stabilizálva a

komplexet. A harmadik konzervált régió (Gly-Arg-Asn) a C-terminális közelében helyezkedik el és ion-párok kialakításával a dimerizációban játszik fontos szerepet.

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

A xenotróp egér leukémia vírussal rokon vírus (XMRV) egy humán mintákból azonosított gammaretrovírus, melyet kapcsolatba hoztak a prosztatata carcinomával (PC), valamint a krónikus fáradtság szindrómával (CFS) is. Az izolált teljes XMRV virális genom nagy hasonlóságot mutat a xenotróp egér leukémia vírus genommal, így kapta az XMRV nevet. Ez volt az első potenciálisan humán patogén gammaretrovírus. Azonban az azonosított XMRV egy műtermék volt. Feltételezik azonban, hogy a vírus relatív nagy arányban cirkulál a humán populációban. Az XMRV tehát egy rekombináns laboratóriumban keletkezett egér leukémia vírus, ami a provírus rekombinációja által fertőzőképesé válhat humán prosztatarák sejtek esetén egér gazda szervezetben.

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. CÉLKITŰZÉS**

Doktori munkám során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

Az *E.coli* sejtekben expresszált XMRV proteáz karakterizálását, az enzim kinetikai paramétereinek meghatározását folyadékromatográfiás 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 folyadékkromatográfiás 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 röntgenkristallográfiás 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 proteáz és az MLV Gag fragmentum szubsztrát tisztítása

A tisztított XMRV proteázt Alexander Wlodawer és munkatársai bocsátották rendelkezésünkre, az enzim szerkezetét röntgenkristallográfiával vizsgálták.

A HIV-1 proteázt *E.coli* BL21(DE3) sejtekben állítottuk elő. A sejteket 37 °C-on ampicillin-tartalmú Luria-Bertani tápoldatban addig növesztettük, majd IPTG-vel indukáltuk az expressziót 3,5 órán keresztül. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a pelletet jégen történő szonikálással tártuk fel. A lizátumot centrifugáltuk, majd 3 M urea-tartalmú pufferrel szuszpendáltuk és újra szonikáltuk. Ezt a mosási lépést még háromszor ismételtük meg. Az utolsó mosási lépés után kapott pelletet denaturációs pufferben oldottuk fel és 0,22 µm pórusméretű szűrőn átszűrtük. A fehérjéket reverz fázisú kromatográfiás oszlopon HPLC-vel tisztítottuk TFA jelenlétében lineáris víz-acetonitril gradiens (0-100%) alkalmazásával. A proteáz tartalmú frakciók tisztaságát 16%-os poliakriamid géleken ellenőriztük. A tiszta fehérjéket tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és koncentrátor segítségével beszárítottuk. A proteáz tartalmú száraz pelletet 6 M guanidin-hidroklorid oldatban vettük fel.

Az MLV Gag Δ2 fragmentum szubsztrátot a munkacsoportunk által publikált expressziós rendszerben, valamint tisztítási protokolnak megfelelően állítottuk elő. Az MLV Gag Δ2 fragmenst a teljes MLV cDNS-t tartalmazó klónból PCR reakció segítségével szaporították fel. A pET23b vektorba klónozott és a C-terminális végen His<sub>6</sub>-vel ellátott MLV Gag Δ2 konstrukciót *E.coli* BL21(DE3) kompetens sejtekbe transzformáltuk hősokk segítségével. A sejteket 37 °C-on növesztettük 100 µg/ml ampicillin-tartalmú Luria-Bertani tápoldatban, majd IPTG-vel indukáltuk az expressziót 2 órán keresztül. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a pelletet jégen történő

szonikálással tártuk fel. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszót szűrőn átszűrtük, és nikkel kelát affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A fehérjéket gélszűrővel választottuk el.

### 3.2. Aktivitásvizsgálat

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.

Az XMRV proteáz aktivitás méréséhez 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 szubsztrátokat alkalmaztuk. A reakcióelegyeket 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd TFA oldattal leállítottuk, az enzimreakciót reverz fázisú kromatográfiás oszlopra vittük fel. A szubsztrátot lineáris víz-acetonitril gradiens alkalmazásával (0-100 v/v%) 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. 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 alkalmaztuk a szintetikus oligopeptid szubsztrátot (RSLLY↓PALTP), hat különböző koncentráció esetén, a reakció körülményei megegyeztek az előzőekben ismertetett körülményekkel. A párhuzamos mérésekből származó reakciósebesség és szubsztrát koncentráció adatokból Michaelis-Menten egyenlethez való illesztéssel meghatároztuk a reakció maximális reakciósebességét és az 50%-os reakciósebességhez tartozó szubsztrát koncentráció értékét ( $K_M$ ). Az értékelés során nemlineáris regressziós módszert valamint SigmaPlot 8.0 programot használtunk (SigmaPlot Software Corp.) A kinetikai állandók standard deviációi 20% alatt voltak. Aktívcentrum titrálással határoztuk meg az aktív enzim mennyiségét. Ezekben a kísérletekben különböző végkoncentrációjú amprenavir DMSO-val hígított oldatát mértünk a reakcióelegybe. A párhuzamos mérésekből származó aktivitások értékeit ábrázoltuk az inhibitor koncentráció függvényében, az illesztés nemlineáris regressziós módszerrel SigmaPlot 8.0 program segítségével, 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 ( $K_{dapp}$ ). 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>) szubsztrátot alkalmaztunk. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk 20 percig, majd 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 relatív specifikus aktivitást a proteáz koncentráció függvényében, majd nem lineáris illesztést alkalmaztunk. Az 50%-os enzimkoncentrációhoz tartozó enzimaktivitás a látszólagos dimerizációs állandó ( $K_{dapp}$ ).

Az aktív dimer proteázok stabilitásvizsgálatát urea denaturálás segítségével végeztük. Az urea disszociációs állandó  $UC_{50}$  értékét HPLC módszer segítségével mértük, KARVnL↓F(NO<sub>2</sub>)EAnL-NH<sub>2</sub> 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. A termékek HPLC analízisét követően a relatív specifikus aktivitásokat ábrázoltuk az ureakoncentráció függvényében, nemlineáris illesztést alkalmaztunk.

### 3.4. Gátlási vizsgálatok

#### 3.4.1. Gátlási vizsgálatok HPLC módszerrel

Az XMRV proteáz esetén a reakcióelegy RSLLY↓PALTP szintetikus oligopeptid szubsztrátot tartalmazott. A gátlási kísérletek során acetil-pepszatin, pepszatin A, amprenavir, TL-3 vagy atanazavir inhibitorok DMSO-val hígított oldatát alkalmaztunk, valamint kontrollként az inhibitor helyett DMSO-t használtunk. A reakcióelegyeket rázatás alkalmazása mellett 37 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd TFA hozzáadásával állítottuk le. Az enzim koncentrációját úgy változtattuk, hogy a szubsztrát átalakulása 20% alatt legyen. A  $K_i$  értékeket az  $IC_{50}$  értékek segítségével határoztuk meg. Az aktivitások értékeit ábrázoltuk az inhibitor koncentráció függvényében, az illesztés nemlineáris regressziós módszerrel történt.

### **3.4.2. Gátlási 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. A szubsztrátot 1 óráig 37°C vízfürdőben inkubáltuk, a hasítási elegy XMRV proteázt valamint DMSO-ban oldott amprenavirt vagy TL-3-at, pepsztatint és acetil-pepszatint tartalmazott. Az enzimreakciókat nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) mintafelvivő puffer hozzáadásával állítottuk le és a fehérjéket 95 °C-on denaturáltuk, majd a termékeket SDS-PAGE segítségével elválasztottuk és Coomassie Brilliant Blue festést követően Protein ladder fehérje molekula standard segítségével azonosítottuk.

### **3.5. Röntgenkristallográfia**

Az XMRV PR röntgenkristallográfiás vizsgálatát Alexander Wlodawer és munkatársai végezték el. 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-pepszatatin 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), míg az XMRV PR/pepszatatin A komplex kristályai pH 7,0-n nőttek (PBD kód: 3SM1, az amprenavir komplex (PBD kód: 3SM2) kristályai pedig pH 4,75-n.

### **3.5. Molekuláris modellezés**

A HIV-1, az MLV és az XMRV PR szekvenciák szerkezetalapú többszörös szekvenciaillesztését hajtottuk végre. A HIV-1 PR acetil-pepsztatinnal képzett komplexének (PBD kód: 5HVP) és az XMRV PR pepsztatin A-val alkotott komplexének (PBD kód: 3SM1) a kristályszerkezeti adatait használtuk fel, hogy a HIV-1 és az XMRV proteázok egy vagy két pepsztatin A vagy acetil-pepszatatin 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 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 számítások és a modellek megjelenítése Silicon Graphics Fuel munkaállomáson történt, az ábrák készítéséhez a Sybyl szoftvert használtuk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Enzimkinetikai és stabilitási vizsgálatok

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

Az XMRV proteáz és MLV MA/p12 P3-Leu módosított szintetikus decapeptid 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.

#### 4.1.2. XMRV és HIV-1 proteáz 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 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).

Az aktív dimer proteázok stabilitás vizsgálatát urea denaturálás segítségével végeztük, növekvő koncentrációjú urea (0-4 M) segítségével, HPLC analízist alkalmazva. A HIV-1 PR urea-disszociációs állandó (UD<sub>50</sub>) értékét hasonlóan találtuk a korábban az irodalomban fotometriásan meghatározott értékhez, az XMRV PR azonban jóval érzékenyebbnek bizonyult az urea koncentrációra, 0,2 M UD<sub>50</sub> értéket határoztunk meg, ami összhangban van a nagyobb  $K_{dapp}$  értékkel. A XMRV PR látszólagos dimerizációs állandó ( $K_d$ ) értékét 115 nM-nak határoztuk meg KARVnL↓NphEAnL-NH<sub>2</sub> szubsztrát alkalmazásával, összehasonlítottuk a HIV-1 proteáz HPLC módszerrel meghatározott értékével és azt találtuk, hogy a HIV-1 proteáz esetében drámaian lecsökkent 1,0 nM értékre, ami összhangban van a korábban az irodalomban más módszerrel meghatározott értékkel.

### 4.2. Gátlásvizsgálatok

#### 4.2.1. Gátlásvizsgálatok HPLC módszerrel

A  $K_i$  értékek alapján az amprenavir bizonyult a leghatékonyabb inhibitornak az XMRV PR esetén a tesztelt inhibitorok közül, 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.

Az acetil-pepszatin méréseink alapján alkalmasabb inhibitornak bizonyult a HIV-1 proteáz esetén mint a pepsztatin A. Az acetil-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. A HIV-1 proteázt mindkét inhibitor nanomoláris koncentrációban gátolta.

#### **4.2.2. Gátolhatósági vizsgálatok SDS-PAGE módszerrel**

Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát a p12/CA, CA/NC és NC/PR hasítási helyeket tartalmazza. A rekombináns szubsztrát XMRV proteázzal való hasításakor az MLV CA (31 kDa) és az MLV  $\Delta p12$ -CA (34 kDa) fragmensek megjelenését tapasztaltuk. Eredményeink alapján feltételzhető, hogy a CA/NC hasítási hely valóban kitüntetett és az itt történő gyors processzálas 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. 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.

Az MLV Gag  $\Delta 2$  fragmentum szubsztrát XMRV proteázzal történő hasítását leghatékonyabban az amprenavir gátolta, már 3,3  $\mu$ 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. Nagy ionerősségű közegben, HPLC módszer alkalmazása esetén alacsonyabb TL-3 koncentráció is hatékonyabb gátlást eredményezett. Az acetil-pepszatin viszonylag erősen gátolja az XMRV proteáz hasítást a pepsztatin A-hoz képest. Magas ionerősségű közegben (4 M NaCl tartalmú) HPLC módszerrel mért gátlást összehasonlítottuk az alacsony ionerősségű közegben meghatározott (SDS-PAGE analízissel vizsgált) gátlási koncentrációval és úgy találtuk, hogy 3  $\mu$ M acetil-pepszatin elég volt az XMRV enzim protein hasításának gátlásához, míg a pepsztatin A esetén a hasonló, közel 50% gátlás eléréséhez szükséges inhibitor koncentráció 28  $\mu$ M-nak adódott.

### **4.3. Röntgenkristallográfia és molekuláris modellezés**

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

Az XMRV PR aszpartil proteáz inhibitorokkal (pepszatin A, acetil-pepszatin, TL-3) alkotott komplexeinek kristályszerkezetét Alexander Wlodawer és munkatársai vizsgálták korábban. Az XMRV proteáznak a C2 szimmetrikus TL-3 inhibitorral alkotott komplexében 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.

A pepszatin A enzimhez való kötődési módja nagyon szokatlannak adódott. Egyetlen pepszatin A molekula helyett két molekula kötődik az enzimhez, az N-terminális izovaleril csoportok a katalitikus hely felé orientálódnak.

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

A kölcsönhatási energia-számításokat azzal a céllal hajtottuk végre, hogy vizsgáljuk az enzim–inhibitor kölcsönhatásokat és magyarázzuk a pepszatin A és az acetil-pepszatin inhibitoroknak a HIV-1 PR-hoz és az XMRV PR-hoz eltérő módon való kötődését. Kétféle kötődési módot tanulmányoztunk az elsőben egyetlen inhibitor kötődését modelleztük úgy, ahogy azt a HIV-1 PR/acetil-pepszatin kristályszerkezetében találták, míg a második kötődési módban két molekula egyszerre kötődik az enzimhez, egymással szemben elhelyezkedve úgy, ahogy az XMRV PR/pepszatin A kristályszerkezetében látható. Az inhibitorok közötti gátlási hatékonyság különbségek azonban nem értelmezhetőek kizárólag a számított kölcsönhatási energiák alapján. Az MLV és XMRV enzimek nagy szekvencia azonosságot mutatnak, ezért az egyes szubsztrátkötő helyeket felépítő aminosavak is megegyeznek. Így a munkacsoportunk korábbi aminosav-preferencia-vizsgálatok eredményeivel együtt értelmeztük eredményeinket.

A HIV-1 proteáznak mind acetil-pepszatinnal, mind pepszatin A-val alkotott komplexének kristályszerkezete ismert. A HIV-1 PR esetében egyetlen acetil-pepszatin molekula kötődik az enzimhez átmeneti állapot analóggént, melynek következtében a központi sztatin (Sta) származék hidroxil csoportja a katalitikus aszpartát oldalláncai között helyezkedik el, a katalitikus vízmolekulát helyettesítve. A HIV-1 enzim pepszatin A-hoz való kötődése egyedi módon történik, eltér az XMRV proteáz más inhibitorainak kötődési módjától.

Az acetil-pepszatin XMRV proteázhoz való kötődése esetén két molekula egymással szemben elhelyezkedve található a komplexben. 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 a kötődő inhibitor molekula nem átmeneti állapot analójként működik. Az eredményeink azt mutatják, hogy a pepsztatin A nagyobb Iva csoportjának a megkötése az összes vizsgált kötődési módban nagyobb kölcsönhatási energiát eredményezett, mint az acetyl-pepsztatin kisebb Ace csoportjának a bekötődése. Ezzel ellentétben az enzimkinetikai vizsgálatok alapján az acetyl-pepsztatin mindkét proteáz esetén hatékonyabbnak bizonyult a pepsztatin A-hoz képest, ami nem magyarázható kizárólag csak a vizsgálatunkban alkalmazott kölcsönhatási energia számítási eljárás segítségével kapott értékek figyelembevételével. A két pepsztatin 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. Az XMRV PR esetén a két pepsztatin A kötődése tűnt kedvezőbbnek, míg az acetyl-pepsztatin kötődésének szimulálása közel  $-105$  kcal/mol kölcsönhatási energia értéket eredményezett.

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

Az XMRV és az MLV proteázok nagyfokú szekvencia hasonlósága és a szubsztrátkötő alhely azonos összetétele miatt feltételezhető a két enzim specificitásának nagyfokú hasonlósága. Az MLV/XMRV PR jórészt hidrofób S4/S4' kötőhelye jobban köt meg nagyméretű hidrofób aminosavrészeket és az MLV/XMRV PR S4/S4' kötőhelyeinek átlagos üregtérfogata is alapvetően nagyobb a HIV-1 proteáznál, ami lehetővé teszi, hogy a Sta4 csoportok kitöltsék az S4/S4' helyeket két pepsztatin A vagy acetyl-pepsztatin 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.

Tehát a számított kölcsönhatási energiák alapján elmondható, hogy az S4/S4' kölcsönhatás lényegesen hozzájárul az acetyl-pepsztatin és pepsztatin inhibitoroknak a HIV-1 és az XMRV proteázokhoz történő kötődéséhez. A pepsztatin A-XMRV való kötődése két inhibitoros kötőmód

esetén energetikailag kedvezőbb, míg az acetil-pepszatinnal való kölcsönhatás esetében mindkét kötődési mód kölcsönhatása hasonló kölcsönhatási energiákat adott. Tehát a pepszatinnal való kötődés A szubsztrát analógként 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. ASt6-S3' kölcsönhatás sokkal kedvezőbb a HIV-1 PR esetében, mint az XMRV PR-nál, így a HIV-1 az egyszeres kötési módot részesíti előnyben. 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.

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

## 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-pepszatinnal és pepszatinnal) 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 leukémia 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-pepszatinnal és pepszatinnal A inhibitorokkal alkotott komplexeit, a számított kölcsönhatási energiák segítségével vizsgáltuk az inhibitorok lehetséges kötőmódjait. Kollaborációs partnereink az enzim-inhibitor komplexeket (amprenavir, TL-3, acetil-pepszatinnal és pepszatinnal A) röntgenkristallográfias elemzésnek vetették alá, ezzel magyarázatot adva a gátlás lehetséges módjára.

Az XMRV proteáz 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 pepsztatin A a legkevésbé hatékony inhibitornak.

A korábbi és jelenlegi molekuláris modellezésen alapuló vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az S4/S4' kölcsönhatás is lényegesen hozzájárul az acetil-pepszatin és pepsztatin 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 röntgenkrisztallográfiai 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.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Tőzsér 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 tanárségéd Úrnak a gyakorlati munkában nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönetet mondok *Dr. Sperka Tamásnak*, *Dr. Kádas Jánosnak*, *Dr. Miklóssy Gabriellának*, †*Dr. Bagossi Péternek* és *Dr. Mótyán Jánosnak* 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 PhD értekezésem elkészítéséhez.

Köszönöm *Alexander Wlodawernek* és munkacsoportjának, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az XMRV enzimet valamint, röntgenkrisztalográfias 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.

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



## 8. 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., Tózsér J. Deltaretrovírus proteázok szerkezetjósítása mutagenézis-vizsgálatok segítségével. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése*, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 02.

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

Miklóssy G., Kádas J., **Matúz K.**, Tózsér 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.**, Tózsér, 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.