

A 3CL PROTEÁZ SZEREPE A KORONAVÍRUS FERTŐZÉSBEN

Szilágyi László
ELTE TTK, Biokémiai Tanszék

Összefoglalás

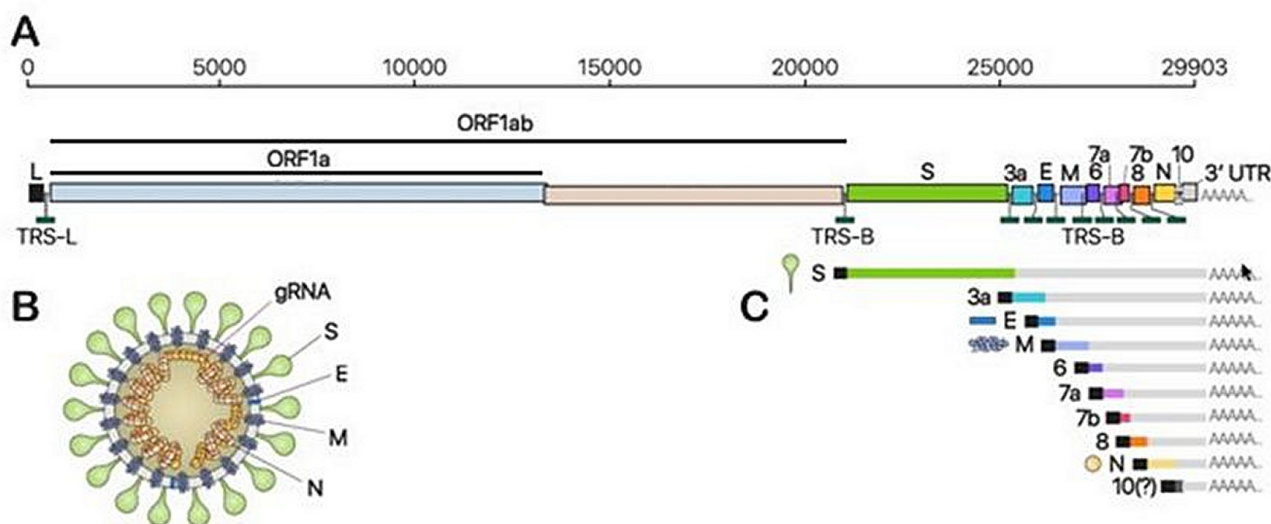
A koronavírus életciklusának a fertőzés szempontjából legkritikusabb lépéseiben – a sejtbe történő bejutásban, valamint a poliprotein feldarabolásában – döntő szerepet játszanak fehérje bontó enzimek, proteázok. Ebből következik, hogy a proteázok kiemelt jelentőségű célpontok a vírusellenes gyógyszerek kifejlesztése során. A poliprotein feldarabolásában kiemelkedő szerepe van a 3CL proteáznak.

Bevezetés

A koronavírusok genomja pozitív egyszálú RNS. Ebbe a csoportba tartozik a WHO által COVID-19 pandémiának nevezett világjárványt okozó SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) is. 2002 óta két, állatról emberre terjedő, humán patogén koronavírus azonosítottak: SARS-CoV (2002) és MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus, 2012). Mindkét megelőző járványt szerencsére gyorsan lokalizálták; a SARS-CoV 2002 és 2003 között 8.098 embert fertőzött meg és 774 halálesetet okozott a világon (halálozási ráta: 9,6%). A MERS-CoV vírust 2012-ben, Szaúd-Arábiában azonosították (>2000 megbetegedés, becsült halálozási ráta 35%)[1]. A fentieken kívül négy humán koronavírus ismert (HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 és HCoV-OC43), melyek szintén légúti megbetegedéseket okoznak [2].

A SARS-CoV-2 genomja az RNS vírusok között a legnagyobbak közé tartozik (~29.700 bp). Rendelkezik az eukarióta mRNS-ek jellegzetes tulajdonságaival, az 5' sapkával és a 3' poliA farokkal. A genominális RNS egy vírusfehérjével komplexben helikális formában helyezkedik el az átlagosan 120 nm átmérőjű burookban, ami a gazdasejttől „kölcsonzott” foszfolipid membránból és az abban elhelyezkedő vírus fehérjékből áll (1.B ábra). A pozitív szálú RNS-ek a sejtbe jutva közvetlenül mRNS-ként funkcionálnak, és a gazdasejt fehérje szintetizáló mechanizmusát felhasználva biztosítják a vírus számára szükséges fehérjék termelését. Az eukarióta transzláció mechanizmusából következik, hogy egy mRNS csak egyféle fehérje szintézisének irányítására képes, a vírusoknak viszont több mint egy különféle fehérjére van szükségük reprodukciójuk biztosítására. Az ellentmondás feloldásának egyik gyakran alkalmazott módja

az, hogy a szükséges fehérjék kódoló szekvenciáit egyetlen folyamatos nyitott leolvasási keret formájában tartalmazza az RNS genom. Ennek lefordítása során ún. poliprotein keletkezik, melynek feldarabolását magában a poliproteinben található két proteáz végzi el [3]. A SARS-CoV-2 esetében két poliprotein keletkezik, a pp1a, ami az nsp1-nsp11 fehérjéket foglalja magában, és a pp1ab (nsp1-nsp16) (1.A ábra)



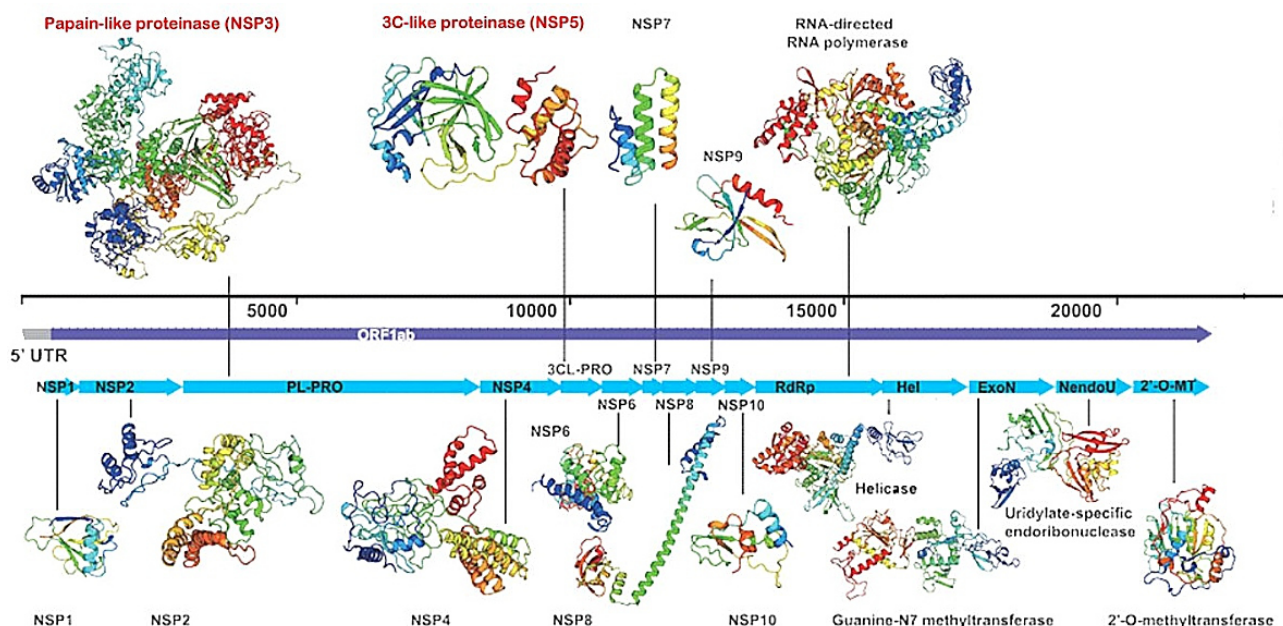
1. ábra. A SARS-CoV-2 genom és a vírus szerkezete. A) Az 5' helyzetű orf1a 4382 aminosavat kódol (pp1a), míg az orf1a 3' végéhez közel bekövetkező -1 riboszómális leolvasási keret eltolódás révén szintetizálódó pp1ab 7096 aminosavból áll. B) A SARS-CoV-2 vírus keresztmetszeti sémája. C) A strukturális és járulékos fehérjéket kódoló ún. szub-genominális RNS-ek elhelyezkedése. Az sgRNS-ek a negatív szál szintézise során keletkeznek ([4] szerint, módosítva.)

A proteolitikus processzálas eredményeként 16 nem-strukturális fehérje (nsp) keletkezik, a már említett két proteáz, az RNS replikációját végző RNS dependens RNS polimeráz (RdRp), és a replikáció, valamint a fertőző képesség szempontjából fontos enzimek és fehérjék. A további, strukturális vírusfehérjék szintézisét az RdRp különleges képessége teszi lehetővé, az RNS genom replikációja során különböző hosszúságú ún. szub-genominális RNS-eket szintetizál. Ezek egy-egy féle fehérje képződését biztosítják. A legfontosabb ezek közül az S (Spike) glikoprotein, ami a gazdasejt felszínén található receptorhoz képes kapcsolódni (1.C ábra).

A poliproteinek processzálása

A koronavírusok családjában a poliproteinek proteolízisét 2 proteáz végzi; az nsp3, más néven papain-szerű proteáz (PL^{pro}) és az nsp5 3C-szerű proteáz (3CL^{pro}, más néven M^{pro}). A PL proteáz a poliproteint 3 helyen, az nsp1, nsp2 és nsp3, vagyis saját C-terminálisán hasítja. A további 11 hasítást a 3CL proteáz

végzi. Mindkét enzim cisztein proteáz, katalitikus centrumuk a papainra jellemző His-Cys diád, a proteáz domén feltekeredése viszont a kimotripszin családra hasonlít. A továbbiakban csak a 3CL proteázok ismertetésére térünk ki.



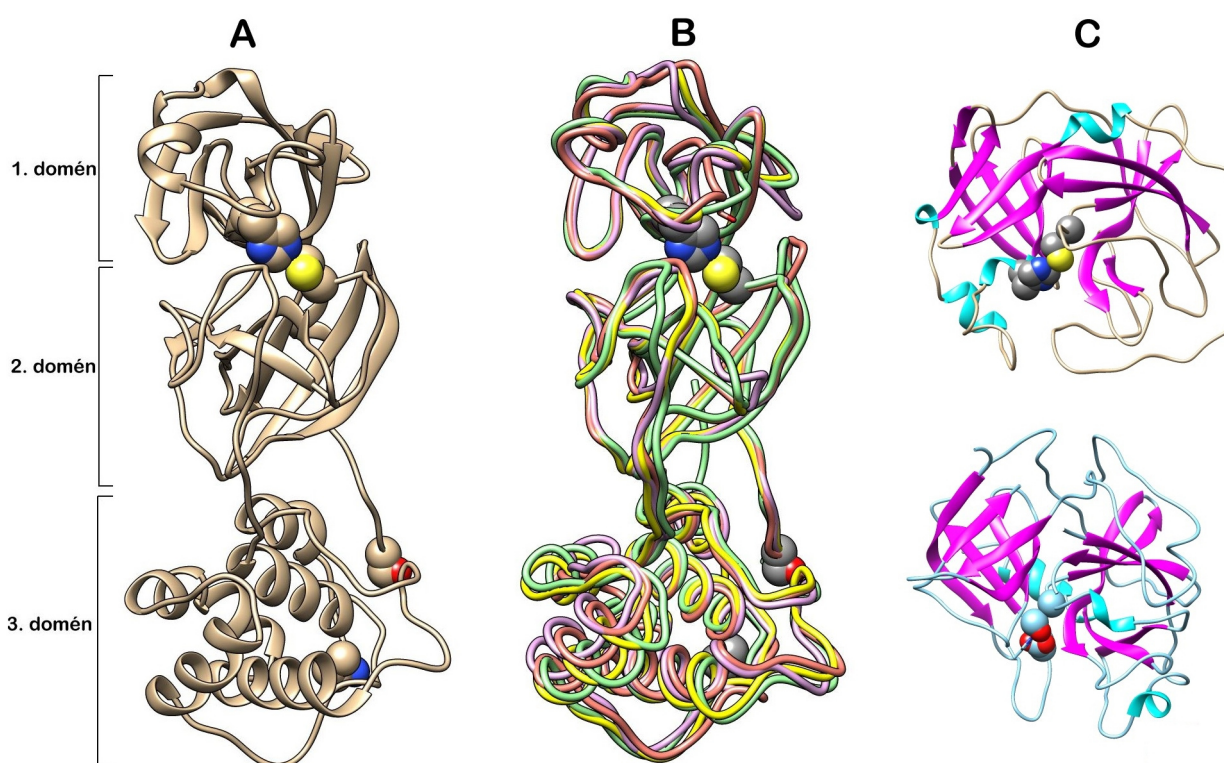
2. ábra. A SARS-CoV-2 által kódolt pp1ab feldarabolása révén keletkező fehérjék annotációja és 3D modellje. (Forrás: <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/COVID-19/>).

A 3CL^{pro} térszerkezete

A pikornavírusok körében általánosan előfordul egy kimotripszin-szerű feltekeredéssel rendelkező cisztein proteáz, melyet 3C-nek neveztek. A koronavírusokban ez a proteáz (3CL^{pro}) egy C-terminális helikális doménnel egészült ki. A vizsgálatokhoz az enzimeket klónozást követően *E. coli* expressziós rendszerekben fejezik ki. Az alkalmazott expressziós vektoroktól függően nem minden esetben felelt meg a vad típusnak az N- és C-terminális. Amennyiben az enzim terminális szekvenciái nem „autentikusak”, az enzim tulajdonságai jelentősen megváltozhatnak [5].

Számos humán és állati koronavírus enzim térszerkezete ismert. Érdekes módon elsőként a sertés fertőző gastroenteritisz vírus (TGEV, újabban PEDV) nsp5 proteázának térszerkezetét határozták meg 2002-ben [6], majd ezt követte 2003-ban a SARS-CoV hasonló proteáza [7]. A kristályszerkezetek alapján a molekula dimer. A 3. ábrán a jobb áttekinthetőség kedvéért csak az egyik protomert mutatjuk. A térszerkezet 3 doménból áll [7]. A 1. domén (8.-99. aminosav) és a 2. domén (100.-183.) fő szerkezeti motívuma antiparallel β -redő, a kimotripszin családra jellemző elrendeződésben. A katalitikus

aminosavak (His41 és Cys145) a két domén között kialakuló szubsztrát kötő árok felé néznek. Az 5 α hélixet tartalmazó 3. domént (201.-306.) egy hosszú hurok (184-200) köti össze a kimotripszin-szerű doménnel. A monomer egység N- és C-terminálisa közel van egymáshoz [8]. A különböző eredetű koronavírus 3CL^{pro} enzimeinek térszerkezete megegyezik, még akkor is, ha viszonylag csekély közöttük a szekvencia azonosság (3. ábra, 1. táblázat).



3. ábra. A 3CL^{pro} térszerkezeti modellje. A) A térszerkezeti domének elhelyezkedése (az egyszerűség kedvéért csak az egyik protomert mutatjuk). B) Az 1. táblázatban szereplő hat 3CL^{pro} szerkezet egymásra helyezve. C) Az N-terminális domén és a kimotripszin összehasonlítása. A molekula grafikai ábrák (3, 4, 5, 6) az UCSF Chimera [9] segítségével készültek.

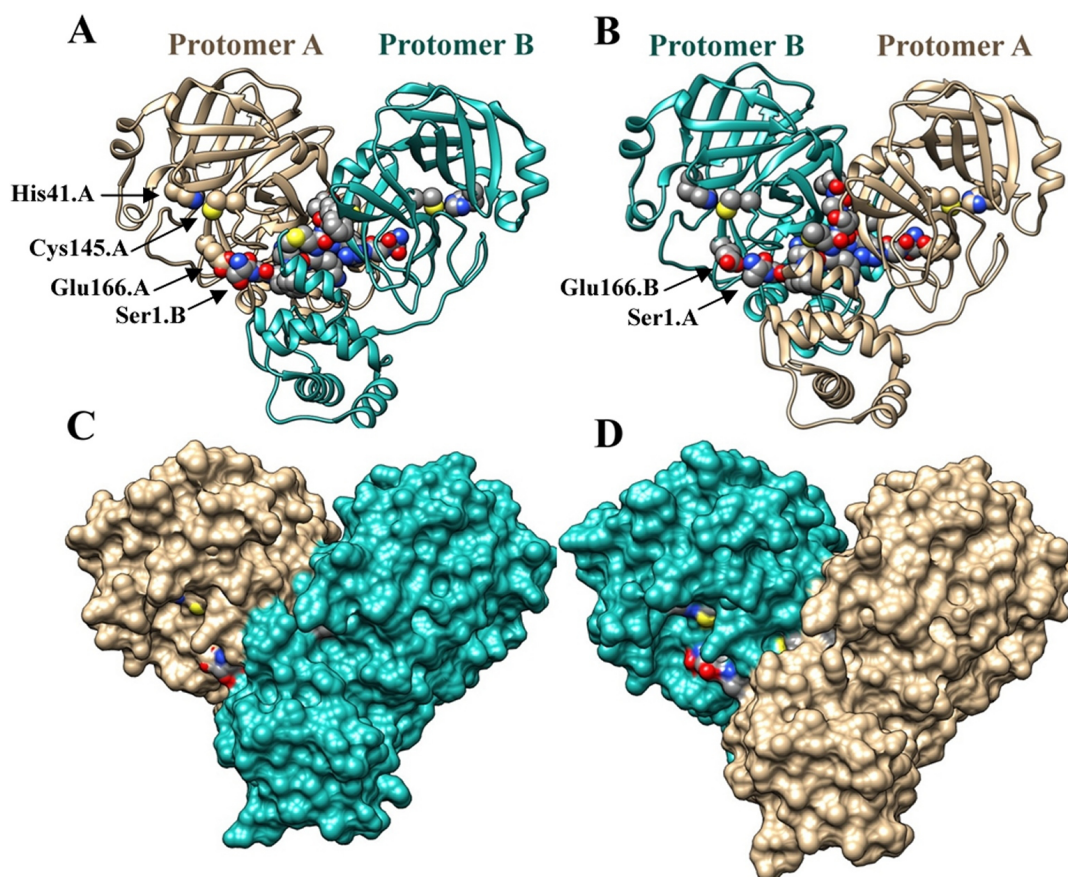
1. táblázat. A 3. ábrán bemutatott enzimek szekvenciájának és térszerkezetének összehasonlítása

A 3CL ^{pro} forrása	szekvencia azonosság	összes C α RMSD*
SARS-CoV-2 vs SARS-CoV	96,07%	0,542 Å
SARS-CoV-2 vs MERS	49,35 %	0,839 Å
SARS-CoV-2 vs HCoV-229E	39,67 %	0,813 Å
SARS-CoV-2 vs Bat-HKU4	48,69 %	1,007 Å
SARS-CoV-2 vs TGEV	38,08 %	0,866 Å

A 3. ábrához és az 1. táblázathoz felhasznált koordináták: SARS-CoV-2: 6Y2G; SARS-CoV: 2BX3; MERS: 4YLU; HCoV-229: 1P9S; Bat-HKU4: 4YOI; TGEV: 1LVO.*RMSD: négyzetes középérték eltérés.

Dimerizáció

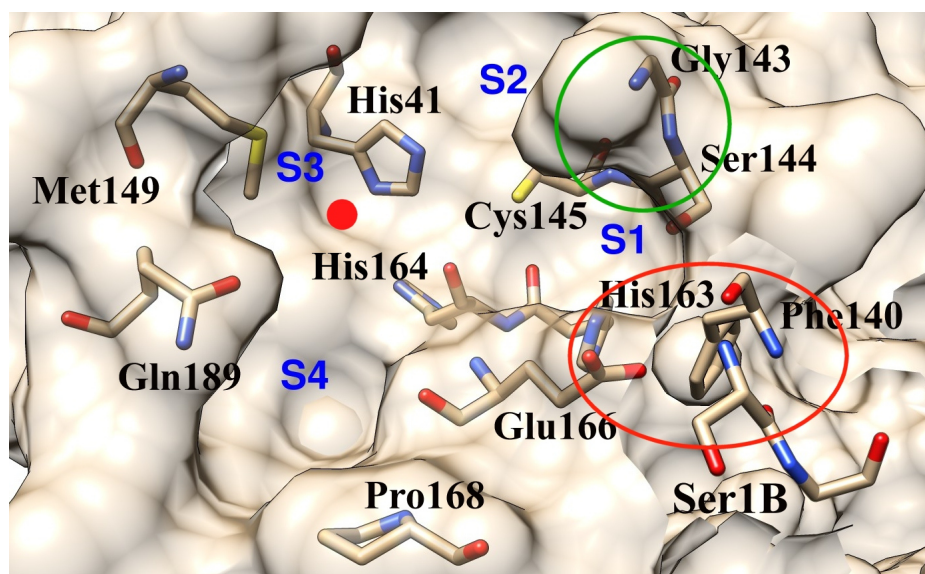
A kristály szerkezetekben a vad típusú 3CL^{pro} mindig dimer. A két protomer egymásra merőlegesen helyezkedik el. A kontakt felszín $\sim 2300 \text{ \AA}^2$, ebből $\sim 1250 \text{ \AA}^2$ apoláros, $950 \text{ \AA}^2$ poláros felszín. A fehérje méretéhez (68 kDa homodimer) az apoláros kontakt felszín csekély, ami jelzi azt, a dimer nem túl stabil, oldatban monomer-dimer egyensúly áll fent. A dimer szerkezet különlegessége, hogy mindkét protomer N-terminális első 7 aminosava, az „N-finger” beékelődik a saját protomer harmadik, helikális doménje és a partner protomer második doménje közé, annak katalitikus centruma közelében [7, 8]. A 4.A és B ábrán láthatjuk a protomerek, kiemelve az N-terminális szekvenciák elhelyezkedését a dimerben. A 4.C és D ábra alapján megállapítható, hogy az N-terminális szekvenciák a dimerek illeszkedési felszínén, gyakorlatilag teljesen eltemetve helyezkednek el. Az aktív centrum kialakításában betöltött szerepükre visszatérünk. A dimer stabilizálásában a C-terminális domén is fontos szerepet játszik.



4. ábra. Az N-finger elhelyezkedése a SARS-CoV-2 3CL^{pro} szerkezetében. A) A dimer molekula szalagszerkezetében mindkét alegység N-terminális 7 aminosava térkitöltő modellként látszik. Szintén kiemelve a katalitikus diád (His41-Cys145) és a Glu166.A-Ser1.B sóhíd. B) A molekula „hátoldala” az y tengely mentén történt 180-os elforgatás után. C) és D) A fenti nézetek a VdW felszínek feltüntetésére. (PDB ID: 6Y2G)

Az oldat fázisú dimerizáció egyensúlyi állandójának meghatározására leggyakrabban analitikai ultracentrifugát, gélszűrési kromatográfiát (SEC), kis szögű röntgen szórást, valamint a specifikus aktivitás koncentráció függését használták. A kapott K_d értékek széles tartományban (nM és néhány 100 μ M) szórtak [10–15]. A szokatlanul nagy szórás hátterében nemcsak az alkalmazott technikák különbözősége, hanem az enzim nagymértékű szerkezeti flexibilitása, illetve a nem autentikus terminális szekvenciák is állhatnak.

A 5. ábra a katalitikus centrum legfontosabb elemeit mutatja be. A szerkezetben a His41 közelében lévő piros korong egy víz molekulát reprezentál („water@His41”). Ez a víz molekula foglalja el azt a helyet, ahol a kimotripszinben az Asp102 található [7]. A peptid oldalláncok kötését biztosító S1-S4 helyek is fel vannak tüntetve. Látható az ábrán, hogy az N-finger terminális aminosava (Ser1B) kettős H-híddal kapcsolódik a Phe140-hez (Ser1B CO-Phe140 NH 3,149 Å; Ser1B N-Phe140 O 2,776 Å) és ezen kívül a protonált alfa amino csoportja ionpárt képez a Glu166-tal. Az ábrán fel nem tüntetett további kölcsönhatások (Arg4B-Glu290 ionpár, Ala7B-Val125 kettős H-híd, és számos hidrofób kontakt) biztosítják a stabil kapcsolatot az N-finger és a molekula többi része között. Amennyiben ez a kapcsolat létrejön, a Phe140 és az azzal fedésbe kerülő His163 pozíciójának rögzítésével biztosítja az S1 kötő zseb kialakulását. A Ser1B és Glu166 ionpár rögzíti a Glu166 oldalláncának helyzetét, és megakadályozza, hogy az lefedje az S1 szubsztrát kötő zsebet.



5. ábra. A SARS-CoV aktív centruma a katalitikus Cys145-His41 diáddal és az aktív centrum stabilitását biztosító legfontosabb aminosavakkal. Zölddel bekeretezve az oxianion hurok (Gly143, Ser144), pirossal bekeretezve a B protomer (Ser1B) kölcsönhatásai. A piros korong egy víz molekula. (PDB ID: 6Y2G)

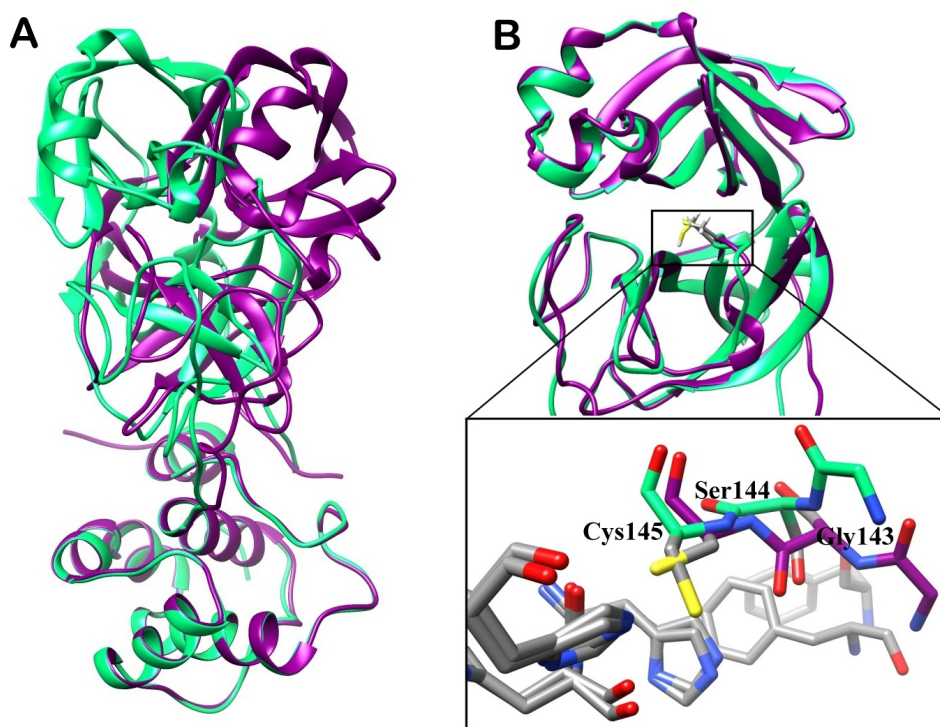
Az oxianion átmeneti termék stabilizálását a Gly143, Ser144 és Cys145 peptid amidok által alkotott oxianion hurok látja el. Ennek a huroknak megfelelő pozícióját szintén az N-finger inzerció által kiváltott szerkezeti átrendeződés biztosítja.

A korai vizsgálatok során a molekula harmadik, C-terminális helikális doménjét dimerizációs doménnek nevezték [7]. Az N-terminális 7 aminosav, vagyis az N-finger delécíója után is megfigyelték a dimer kialakulását, ugyanakkor az enzim inaktív volt [11]. A 3. doménnek a dimerizációban betöltött fontos szerepét megerősítette Shi és mtsai [10] vizsgálata is. Külön-külön kifejezték az N-terminális és a C-terminális domént. Az N-terminális stabilan monomer volt és enzimatikusan inaktív, míg a C-terminális monomer és dimer formában is előfordult, de a két forma egymásba nem tudott átalakulni. A jelenség okára Zhong és mtsai oldat fázisú NMR vizsgálatai derítettek fényt [14]. A dimer stabilitását az eredményezi, hogy az öt α hélix közül az első ($\alpha 1$) kölcsönösen helyet cserél a két protomerben, szorosan illeszkedve a másik alegység szerkezetébe. A jelenség megfigyelhető volt a teljes 3CL^{pro} molekula esetében is, és szuperaktív oktamerek kialakulásához vezetett [16]. Arra nincs adat, hogy ilyen szerkezetek fiziológiásan is előfordulnának.

Enzimkinetikai vizsgálatokból kiderült, hogy a 3CL^{pro} specifikus aktivitása növekszik, ha a mérést töményebb enzimmal végzik, ami arra utal, hogy a dimer a funkcióképes, aktív forma [17, 18]. Ez indokolta, hogy intenzív kutatás irányult a dimerizációt stabilizáló oldalláncok felderítésére. A dimerizáció megakadályozása az enzim aktivitás gátlásának egyik módja lehet. Három pontmutáció – R298A, S139A és G11A – a dimerizáció teljes vagy részleges elvesztését eredményezte [19-21].

A vad típusú (wt) 3CL^{pro} és az R298A mutáns szerkezete látható a 6. ábrán. Ennek a két enzimnek az összehasonlításával analizálhatók a dimerizáció és az N-terminális inzerció hatására bekövetkező térszerkezeti változások. Amennyiben a C-terminális doménre korlátozzuk az átfedést, szinte tökéletes az illeszkedés ($C\alpha$ atomokra RMDS = 0,416 Å). Ugyanakkor a teljes N-terminális domén mintegy 40°-kal elfordul a C-terminálishoz képest (6.A ábra). Az N-terminálisban bekövetkezett változásokat akkor láthatjuk részletesebben, ha ezt a két domént illesztjük egymásra. Itt is még meglehetősen jó az illeszkedés ($C\alpha$ atomokra RMDS = 0,665 Å), de az aktív centrum környékét kiemelve jelentős különbséget láthatunk. A Cys145 oldallánca elfordul a szubsztrát kötő zsebtől,

és a 143-144-es hurok lefutása teljesen megváltozik, nem alakulhat ki az amido hidrogének oxianion stabilizálást biztosító elrendeződése, az enzim elveszti aktivitását. A megfigyelt változások a fent vázoltnál jóval kiterjedtebbek, részletes elemzésük megtalálható a [19] és [22] hivatkozásban.



6. ábra. A dimerizáció hatására bekövetkező konformáció változások. A) Vad típusú 3CL^{pro} (zöld, PDB ID: 6Y2G) és az R298A dimerizációra képtelen mutáns (bíbor, PDB ID: 2QCY) C-terminális doménjei egymásra illesztve. B) Az N-terminálisok egymásra illesztve, kiemelve az oxianion hurok.

A folyamat analóg a tripszinogén-tripszin átalakulással. Az inaktív tripszinogén amino terminálisán egy 8 tagú extra peptid szakasz található. Az enterokináz ebben a peptidben a Lys|IleVal kötésnél elhasítja a peptid láncot. Az új N-terminális sóhidat képez az Asp194 oldallánccal, és hidrofób kölcsönhatásokkal is stabilizál egy olyan konformáció változást, ami az oxianion hurok kialakulásához vezet [23]. Nem elhanyagolható különbség azonban, hogy a tripszin esetében ez a változás intramolekuláris, míg a 3CL^{pro} esetében ez a változás dimerizációt követően, vagy azzal egy időben játszódik le. Azt is meg kell említeni, hogy a tripszin és a hasonló szerin proteázok esetében az N-terminális csak egy helyre kötődhet, a 3CL^{pro} N-terminálisa azonban része a felismerési szekvenciának, ezért a szubsztrát kötő felszín P' helyeihez is kapcsolódhat.

Több esetben is megfigyelték, hogy a dimer kristályszerkezetben a két protomer szerkezete nem azonos. Az egyik protomer az aktív konformációban van, a

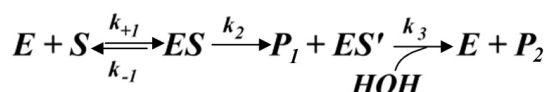
másikban az oxianion hurok torzult. Ilyen például a PDB ID 1UK2 szerkezet; SARS CoV 3CL^{pro} pH 8,0 [24]. A két szerkezet molekuláris dinamikai vizsgálata szerint a különbség oldat fázisban is fennáll. A szerzők ebből arra következtettek, hogy a dimerben csak az egyik protomer aktív. Amennyiben azonban a baktériumban termelt fehérje terminálisai pontosan azonosak a természetes szekvenciával, vagyis „autentikusak”, mindkét alegység a katalitikusan kompetens konformációt veszi fel [5]. Ez a jelenség is azt mutatja, hogy mind az N-, mind a C-terminális fontos szerepet játszik az enzim aktivitásában.

Katalitikus mechanizmus

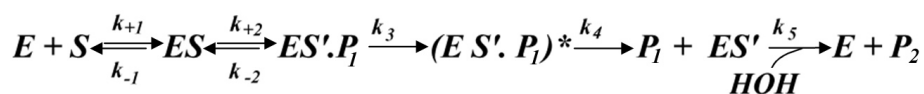
A cisztein proteázok katalitikus mechanizmusát a prototípusnak tekintett papain vizsgálata alapján ismerjük [25]. A papain aktív centrumát a Cys25-His 159 ionpár alkotja, melynek orientálását az Asn175 végzi. A papainra jellemző hidrolitikus reakció első lépésében, az acilezésben a negatív töltésű tiolát anion intéz nukleofil támadást a szubsztrát csoport ellen.

A peptid hidrolízis másik mechanizmusa az általános bázis katalízis. Ennek tipikus példája a kimotripszin katalitikus triádja: Asp102-His57-Ser195. A His57 hidrogén hidas kapcsolatban fokozza a Ser195 nukleofilicitását. Ezt az aszimmetrikus töltés eloszlást stabilizálja az Asp102 negatív töltése.

1. séma



2. séma



7. ábra. A szerin/cisztein proteázok hidrolitikus reakciójának modellje. Az 1. séma a minimális modell 3 lépésű reakció; Michaelis komplex (ES) képződik reverzibilis reakcióban, majd a k_2 sebességi állandóval acilenzim (ES') keletkezik és felszabadul a P_1 termék (amin komponens). Az acil-enzim hidrolízise a szabad enzim (E) és a P_2 termék megjelenését eredményezi. A 2. séma szerint a P_1 termék gyorsított leadását elősegítő konformáció változás történik az $(ES' \cdot P_1)^*$ komplexben [26].

Huang és mtsai folyamatos kolorimetriás mérésekkel tanulmányozták a SARS 3CL^{pro} több mutánsának aktivitását. Megállapították, hogy a 2 katalitikus oldallánc alaninra cserélése az aktivitás teljes elvesztését eredményezi, míg a C145S (kimotripszin-szerű) mutáns megtartja aktivitásának 2,5%-át. Az aktivitás pH függéséből meghatározott pKa értékek a következők: vad típus

His41 – 6,38, Cys145 – 8,43; szerin mutáns His41 – 6,15, Ser,145 – 9,09. Ebből és a kinetikus izotóp effektus mérések eredményéből arra a következtetésre jutottak, hogy annak ellenére, hogy papain-szerű katalitikus diádja van az enzimnek, a hidrolízis az általános bázis mechanizmus szerint zajlik le, és nem keletkezik tiolát-imidazolinium ion pár [27].

Amid és észter szubsztrátokon végrehajtott vizsgálatok [28] finomították a mechanizmusról alkotott képet. A kísérletek során egyrészt a teljes hasítási szekvenciát tartalmazó peptid szubsztrátot, másrészt a P1 Gln-hoz kapcsolódó kromofór *p*-nitroanilid és *p*-nitrofenil észter szubsztrátokat használtak. Megállapították, hogy a teljes peptiden mért k_{cat}/K_M nagyobb, mint az alapvetően jobb távozó csoportokat tartalmazó kromofór szubsztrátokon, vagyis a távozó C-terminális peptid szakasz jelenléte fokozza a katalitikus hatékonyságot. Hasonló jelenséget mutatott ki Polgár a papain kinetikáját vizsgálva [29]. Különböző pH-kon végzett steady-state és pre-steady-state mérések, valamint a kinetikus izotóp effektus alapján meghatározott proton leltár és a jódcetamiddal történő inaktiválás eredményeit értékelve a következő képet alakították ki: (1) a reakció első lépésében (acilezés) ionpár alakul ki, (2) az első termék (P_1) leadása gyorsított az enzim konformáció változásával, (3) a dezacilálás az általános bázis mechanizmussal történik.

Az inhibitor tervezés szempontjából is fontos a katalízis során lejátszódó proton transzfer lépések ismerete. Paasche és mtsai [30] összehasonlító molekuladinamikai módszerrel vizsgálták a szubsztrát és inhibitor kötése során bekövetkező töltés állapot változásokat. Azt találták, hogy alapállapotban a Cys145-His41 diád semleges, szubsztrát kötéskor viszont Cys145(–)-His41(+) ionpár indukálódik. Ugyanez a változás nem következik be akkor, ha egy inhibitor kötődik az aktív centrumhoz. Azt gondolják, hogy ez a magyarázata annak, miért sokkal lassabb egy elektrofil támadó csoportot (epoxid, α,β -telítetlen észter, benzotriazol észter) tartalmazó inhibitor bekötése ($k_i \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) mint egy ugyanolyan szekvenciájú peptid hasítása ($k_{\text{cat}} \sim 3 \text{ s}^{-1}$) [31].

Szubsztrát specifitás

A 3CL^{pro} szubsztrát specifitásának ismerete alapvető fontosságú hatásos inhibitorok kifejlesztéséhez. Lai és mtsai. [32] meghatározták 3CL^{pro} relatív hatékonyságát a SARS-CoV poliproteinben elhasítandó szekvenciát hordozó 11 peptid szubsztáton (2. táblázat) A hasítást HPLC-vel követték.

Valamennyi peptid a P1 helynek megfelelő glutamin után hasadt. Egyértelmű, hogy a leggyorsabban a 3CL^{pro}-1 N-terminális hasad el, ezt követi a 3CL^{pro}-1 C-terminálisán történő hasítás. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a proteáz először saját magát hasítja ki. Nehéz azt megítélni, hogy a további hasítások sorrendje követi-e a kinetikai adatokat, de feltűnő, hogy az RdRp N-terminálisán a leglassabb a hasítás.

2. táblázat. A SARS-CoV 3CL^{pro} relatív hatékonysága a poliprotein hasító helyeit reprezentáló 11 polipeptiden [32]

Cterm/Nterm	hasító hely szekvenciája	(k_{cat}/K_M) _{rel}
nsp4/3CL ^{pro}	TSAVLQ/SGFRK-NH ₂	1,00
3CL ^{pro} /nsp6	SGVTFQ/ GK FKK-NH ₂	0,41
nsp6/nsp7	KVATVQ/SKMDS-NH ₂	0,03
nsp7/nsp8	NRATLQ/AIASE-NH ₂	0,05
nsp8/nsp9	SAVKLQ/NNELS-NH ₂	0,02
nsp9/nsp10	ATVRLQ/AGNAT-NH ₂	0,22
nsp10/RdRp	REPMLQ/SADAQ-NH ₂	0,002
RdRp/Hel	PHTVLQ/AVGAC-NH ₂	0,08
Hel/ExoN	NVATLQ/AENVN-NH ₂	0,09
ExoN/NendoU	TFTRLQ/SLENN-NH ₂	0,28
NendoU/nsp16	FYPKLQ/SSGAW-NH ₂	0,27

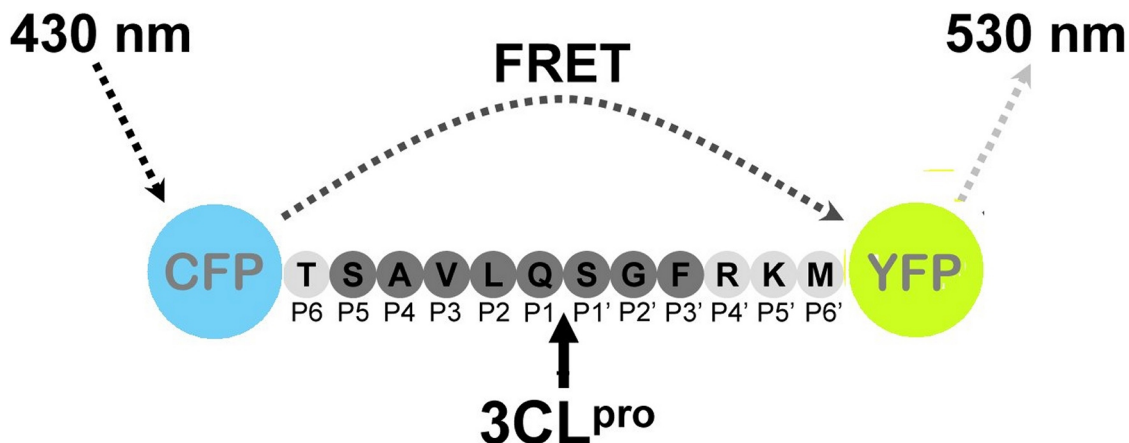
Az egyes fehérjék elhelyezkedése, illetve a rövidítések magyarázata leolvasható a 2. ábráról.

A különböző koronavírusokban a hasító helyek általában konzerváltak. Érdekes viszont, hogy a SARS-CoV-2 poliproteinben a 3CL^{pro} C-terminálisán a szekvencia a következő: sgvtfq/**sav**kr. A 9. ábra adatai alapján azonban ezekben a pozíciókban a hatékonyság kevéssé függ a szekvenciától. A SARS-CoV-1 3CL^{pro} szekvenciája csak 12 pozícióban különbözik a SARS CoV-étól. Az aminosav cserék általában nem okoznak polaritást, illetve hidrofobicitás változásokat, kivéve a Thr285→Ala szubsztitúciót. Ez a mutáció növeli az enzim aktivitását, és esetleg hozzájárulhat a SARS CoV-2 fokozott fertőző képességéhez [33].

Chuck és mtsai [34] a SARS CoV 3CL^{pro} szubsztrát specifitását a 8. ábrán látható molekulával tesztelték. A 3CL^{pro} N-terminális hasítási szekvenciát reprezentáló 12 tagú polipeptid kapcsolja össze a cián és sárga fluoreszcens fehérjét. A P5-P3' szakaszon valamennyi pozícióban egyenként 19 mutációt hajtottak végre. A peptid hasítása a FRET szignál csökkenésével detektálható, és meghatározható az enzim specifikus aktivitása ($k_{obs}/[3CL^{pro}]$).

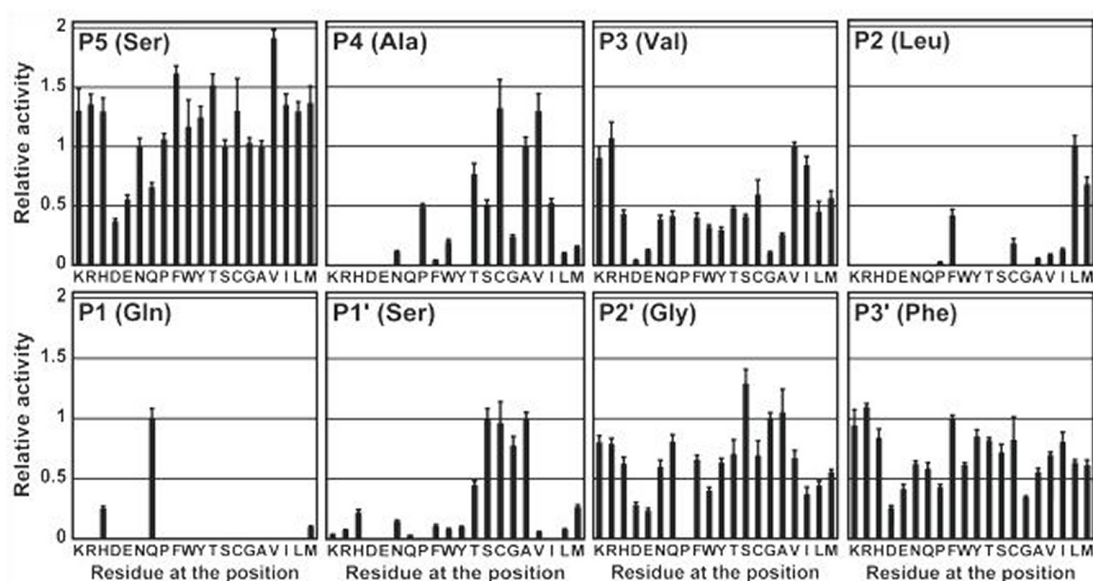
Az eredmények azt mutatják, hogy a P1 és P2 pozíció kivételével a többi helyen

előfordulhat olyan aminosav, amely a konszenzus aminosavval azonos vagy annál valamivel jobb szubsztrát. A P5 hely tolerálta a legtöbb aminosavat, és többségük jobb volt, mint a vad típus.



8. ábra. FRET (Förster resonance energy transfer) szubsztrát a SARS-CoV specifitásának meghatározására. Az árnyékolt 8 helyen egyenként 19 mutációt végeztek, így egy 8x19 tagú peptid könyvárat kaptak. ([34] alapján, módosítva).

A szubsztrát azon pontjain, ahol az oldallánc az oldószer felé fordul (P5, P3, P3') pozitív töltésű oldalláncok (K, R) nagymértékben preferáltak a negatív töltésekkel szemben. A szerzők szerint a jelenség magyarázata az lehet, hogy a pozitív töltés közelsége elektrosztatikusan stabilizálhatja a katalízis során átmenetileg kialakuló oxianion intermediert. A P4 oldallánc egy kis méretű hidrofób zsebbe illeszkedik, a relatív aktivitás korrelál az oldallánc hidrofobicitásával.



9. ábra. A SARS-CoV 3CL^{pro} specifikus aktivitása a P5-P3' pozíciókban. Az értékeket a vad típusú szekvenciában előforduló aminosavára normálták [34].

Töltött aminosavak itt nem találhatók, a kedvezőtlen deszolvatációs energia miatt. A P3 helyen a β lemezt kedvelő oldalláncok részesülnek előnyben, míg a P2 helyen a nagy méretű, de β elágazást nem tartalmazó hidrofób oldalláncok szerepelnek. A várakozásnak megfelelően a P1 pozícióban a legjobb szubsztrát a glutamint tartalmazó volt, de hisztidin és metionin után is történt hasítás. Természetes hasító helyeken ezek az aminosavak nem fordulnak elő. A P1' helyen csak 50 Å³ térfogatnál kisebb oldalláncú aminosavak lehetnek. A P2' és P3' pozícióban, a már említett pozitív töltés preferencián kívül más korlátozás nem figyelhető meg. Hasonló átfogó analízis a SARS CoV-2 3CL^{pro} enzimmel nem készült, de a nagyfokú szekvencia azonosság alapján jelentős különbségek nem várhatók.

Az érési folyamat

Az izolált enzimen végzett aktivitás mérések alapján nem lehet egyértelműen következtetni a poliprotein érési folyamatának mechanizmusára. A poliproteinben a 3CL^{pro} az nsp4 és az nsp6 között helyezkedik el. A tapasztalat azt mutatta, hogy ha a rekombináns vad típusú 3CL^{pro} szekvenciája mind az N-, mind a C-terminálison tartalmazta a teljes felismerő szekvenciát, vagyis az N-terminálison az nsp4 utolsó öt, a C-terminálison az nsp6 első öt aminosavát, az autoprocesszálas már a sejt lizátum készítése során bekövetkezik. Elő lehet viszont állítani az inaktív C145A mutáns következő változatát: Trx-10aa-C145A3CL^{pro}-10aa-GST (Trx-tioredoxin, GST-glutation S-transzferáz). A molekulát a vad típusú 3CL^{pro} elhasítja. A folyamatot SDS-PAGE segítségével követve megállapították, hogy az N-terminális kb. 50-szer gyorsabban hasad, mint a C-terminális [35]. Bár nagyságrendi az eltérés, ez kvalitatíve megegyezik a peptideken mért aránnyal.

A poliprotein processzálas mechanizmusának felderítésében rendkívül jelentős a Hilgenfeld csoport hozzájárulása. Több, oldat fázisban dimer kialakítására képtelen és ezért inaktív mutáns (R298E, E290R és R4E) esetében megfigyelték, hogy amennyiben a konstrukciók tartalmazták a teljes felismerő szekvenciát, szintén bekövetkezett az autoprocesszálas a lizátum készítés során. Nem történt autoprocesszálas a C145A/E290R kettős mutánsnál, bizonyítva, hogy a terminálisok módosítását nem valamelyik baktérium proteáz végzi. Ha az így előállított „éretlen” proteázt összekeverték az E290R, processzált, de önmagában dimerizálásra képtelen, és ezért az „éretlen” állapotra jellemző konfigurációjú mutánssal, bekövetkezett az N-terminális felismerő szekvencia hasítása [36]. Ebből következik, hogy a natív poliprotein processzálasának

kezdeti lépéseként elegendő két „éretlen” monomer kapcsolata egy intermedier dimer formájában. Ebben az állapotban az egyik inaktív protomer N-terminálisa kapcsolódik a másik szintén inaktív protomer szubsztrát kötő árkába és azt aktiválja. Bekövetkezik a hasítás, és a felszabaduló N-terminális beilleszkedik a 2. és 3. domén közé és stabilizálja az aktív konformációt. Az aktivált alegység elhasítja a másik protomer N-terminálisát, és az intermedier dimer aktív állapotba kerül. Ezt a folyamatot egyes szerzők, az intermedier dimert egy egységnek tekintve, *cisz* hasításnak nevezik. Az elnevezés nem korrekt, mivel a hasítandó peptid szakasz és a hasítást katalizáló aktív centrum nem azonos polipeptid szálon van. Az „éretlen” protomerek találkozását valószínűleg elősegíti, hogy a folyamat membránhoz kötött állapotban játszódik le. A 3CL^{pro} a poliproteinben az nsp4 és az nsp6 között helyezkedik el. Mindkét szomszédos fehérje membrán fehérje, N- és C-terminálisuk az endoplazmatikus retikulum citoplazmatikus oldalán helyezkedik el [37].

Inhibitorok keresése

A PubMed adatbázisban a ((3clpro) OR (Mpro)) AND (inhibitor) kombinációval szűrve 2020. május végén 191 közlemény található. A közlemények időbeli eloszlása három maximumot mutat, a három koronavírus-járványnak megfelelően, de messze a legtöbb közlemény idén jelent meg.

Az inhibitor kutatás alapfeltétele a molekula térszerkezetének ismerete. A térszerkezetet leíró első közlemény [7] címe megjelölte a kutatások célját: „...3CL^{pro} Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs”. Ennek az elvnek megfelelően számos olyan térszerkezetet oldottak meg, melyekben a 3CL^{pro} kovalensen kötött inhibitort tartalmazott. Az inhibitor elektrofil támadó csoportja klórmetil keton (CMK) [7, 8], α - β telítetlen észter [38, 39] vagy peptid aldehid [40] volt. Az ilyen reaktív csoportokat tartalmazó vegyületek nem alkalmasak gyógyszernek, toxikusak, számos kellemetlen mellékhatást váltanak ki. Az inhibitorral gátolt enzim térszerkezete azonban alkalmas arra, hogy abból az inhibitort eltávolítva virtuális szűréssel nem-kovalens, erősen kötő molekulákat keressenek. Az első nem-kovalens inhibitor, amely SARS-CoV által fertőzött Vero E6 sejteken hatásosnak bizonyult ($IC_{50}=1,5\pm0,3 \mu M$), az ML188 jelű vegyület ((*R*)-*N*-(4-(tert-butyl)phenyl)-*N*-(2-(tert-butylamino)-2-oxo-1-(pyridin-3-yl)ethyl)furan-2-carboxamide) volt [41]. Kombinatorikus kémiai szintézissel számos más hasonló vegyületet is szintetizáltak, jelentősen jobbat eddig nem találtak [42, 43].

A bioaktív, gyógyszer hatású molekulák ChEMBL adatbázisából kiválasztott

1.485.144 vegyület vizsgálatát végezte el M. Tsuji [44]. A SARS-CoV-2 3CL^{pro} szerkezetéhez (PDB ID: 6Y2G, [45]) rDoc és AutoDock Vina 1.1.2 szoftverekkel illesztette a vegyületeket. A szelekciót a kötési szabadenergia alapján végezte. A legjobb 29 vegyület között két, bizonyítottan proteáz gátló vegyület (sepimostat és curcumin) is szerepel.

A hatékony gyógyszer keresésének egyik gyors, és költséghatékony módja az „átirányítás” (repurposing). Ennek a közismert példái az eredetileg malária gyógyszerként alkalmazott hidroxiklorokvin, illetve a HIV gyógyszerként alkalmazott lopinavir/ritonavir kombináció. A hidroxiklorokvin hatásossága valószínűleg nem a 3CL^{pro} gátlásának köszönhető. A lopinavir/ritonavir kombináció viszont hatékonyan gátolja a HIV proteázt, de *in silico* analízis azt mutatja, hogy a 3CL^{pro} katalitikus helyére is képes bekötni [46]. További vizsgálatok azt mutatták, hogy további két HIV proteáz inhibitor (indinavir és darunavir) képes a 3CL^{pro} aktív centrumához kötődni [47]. Megjegyzendő hogy a HIV proteáz aszpartil proteáz, és a térszerkezete sem homológ a 3CL^{pro} enzimével. Funkciójuk azonban hasonló, a HIV proteáz is poliproteint hasító enzim, bár felismerő szekvenciái [48] különböznek a 3CL^{pro}-étől.

Az aktív centrum támadása mellett másik ígéretes lehetőség a dimerizáció blokkolása. Ezen a területen azonban érdemi előrehaladás eddig nem történt [49].

Irodalomjegyzék

- [1] Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G., Petersen, E. (2020) COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clinical Microbiology and Infection*, S1198743X20301713.
- [2] Gaunt, E.R., Hardie, A., Claas, E.C.J., Simmonds, P., Templeton, K.E. (2010) Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *J Clin Microbiol*, **48**: 2940–2947.
- [3] Spall VE, Shanks M, Lomonosoff GP (1997) Polyprotein Processing as a Strategy for Gene Expression in RNA Viruses. *Seminars in Virology*, **8**: 15–23.
- [4] Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H (2020) The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, **181**: 914-921.e10.

- [5] Xue X, Yang H, Shen W, Zhao Q, Li J, Yang K, Chen C, Jin Y, Bartlam M, Rao Z (2007) Production of authentic SARS-CoV M(pro) with enhanced activity: application as a novel tag-cleavage endopeptidase for protein overproduction. *J Mol Biol*, **366**: 965–975.
- [6] Anand K, Palm GJ, Mesters JR, Siddell SG, Ziebuhr J, Hilgenfeld R (2002) Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J*, **21**: 3213–3224.
- [7] Anand K (2003) Coronavirus Main Proteinase (3CL^{pro}) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science*, **300**: 1763–1767.
- [8] Yang H, Yang M, Ding Y, Liu Y, Lou Z, Zhou Z, Sun L, Mo L, Ye S, Pang H, Gao GF, Anand K, Bartlam M, Hilgenfeld R, Rao Z (2003) The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 13190–13195.
- [9] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**: 1605–1612.
- [10] Shi J, Wei Z, Song J (2004) Dissection study on the severe acute respiratory syndrome 3C-like protease reveals the critical role of the extra domain in dimerization of the enzyme: defining the extra domain as a new target for design of highly specific protease inhibitors. *J Biol Chem*, **279**: 24765–24773.
- [11] Chen S, Chen L, Tan J, Chen J, Du L, Sun T, Shen J, Chen K, Jiang H, Shen X (2005) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-like Proteinase N Terminus Is Indispensable for Proteolytic Activity but Not for Enzyme Dimerization: Biochemical and thermodynamic investigation in conjunction with molecular dynamics simulations. *J Biol Chem*, **280**: 164–173.
- [12] Barrila J, Bacha U, Freire E (2006) Long-range cooperative interactions modulate dimerization in SARS 3CL^{pro}. *Biochemistry*, **45**: 14908–14916.
- [13] Shi J, Song J (2006) The catalysis of the SARS 3C-like protease is under extensive regulation by its extra domain. *FEBS J*, **273**: 1035–1045.
- [14] Zhong N, Zhang S, Zou P, Chen J, Kang X, Li Z, Liang C, Jin C, Xia B (2008) Without its N-finger, the main protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus can form a novel dimer through its C-terminal domain. *J Virol*, **82**: 4227–4234.
- [15] Tomar S, Johnston ML, St. John SE, Osswald HL, Nyalapatla PR, Paul LN, Ghosh AK, Denison MR, Mesecar AD (2015) Ligand-induced Dimerization of

- Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 Protease (3CL^{pro}): Implications for nsp5 regulation and the development of antivirals. *J Biol Chem*, **290**: 19403–19422.
- [16] Zhang S, Zhong N, Xue F, Kang X, Ren X, Chen J, Jin C, Lou Z, Xia B (2010) Three-dimensional domain swapping as a mechanism to lock the active conformation in a super-active octamer of SARS-CoV main protease. *Protein Cell*, **1**: 371–383.
- [17] Fan K, Wei P, Feng Q, Chen S, Huang C, Ma L, Lai B, Pei J, Liu Y, Chen J, Lai L (2004) Biosynthesis, Purification, and Substrate Specificity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-like Proteinase. *J Biol Chem*, **279**: 1637–1642.
- [18] Kuo C-J, Chi Y-H, Hsu JT-A, Liang P-H (2004) Characterization of SARS main protease and inhibitor assay using a fluorogenic substrate. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**: 862–867.
- [19] Shi J, Sivaraman J, Song J (2008) Mechanism for Controlling the Dimer-Monomer Switch and Coupling Dimerization to Catalysis of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-Like Protease. *J Virol*, **82**: 4620–4629.
- [20] Hu T, Zhang Y, Li L, Wang K, Chen S, Chen J, Ding J, Jiang H, Shen X (2009) Two adjacent mutations on the dimer interface of SARS coronavirus 3C-like protease cause different conformational changes in crystal structure. *Virology*, **388**: 324–334.
- [21] Chen S, Hu T, Zhang J, Chen J, Chen K, Ding J, Jiang H, Shen X (2008) Mutation of Gly-11 on the dimer interface results in the complete crystallographic dimer dissociation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease: crystal structure with molecular dynamics simulations. *J Biol Chem*, **283**: 554–564.
- [22] Lim L, Gupta G, Roy A, Kang J, Srivastava S, Shi J, Song J (2019) Structurally- and dynamically-driven allostery of the chymotrypsin-like proteases of SARS, Dengue and Zika viruses. *Prog Biophys Mol Biol*, **143**: 52–66.
- [23] Hedstrom L, Lin TY, Fast W (1996) Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry*, **35**: 4515–4523.
- [24] Chen H, Wei P, Huang C, Tan L, Liu Y, Lai L (2006) Only One Protomer Is Active in the Dimer of SARS 3C-like Proteinase. *J Biol Chem*, **281**: 13894–13898.

- [25] Asbóth B, Polgár L (1977) Hydrolysis of alkyl ester and amide substrates by papain. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, **12**: 329–333.
- [26] Hegyi A, Ziebuhr J (2002) Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. *J Gen Virol*, **83**: 595–599.
- [27] Huang C, Wei P, Fan K, Liu Y, Lai L (2004) 3C-like proteinase from SARS coronavirus catalyzes substrate hydrolysis by a general base mechanism. *Biochemistry*, **43**: 4568–4574.
- [28] Solowiej J, Thomson JA, Ryan K, Luo C, He M, Lou J, Murray BW (2008) Steady-State and Pre-Steady-State Kinetic Evaluation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) 3CL^{pro} Cysteine Protease: Development of an Ion-Pair Model for Catalysis. *Biochemistry*, **47**: 2617–2630.
- [29] Polgár L (1979) Deuterium isotope effects on papain acylation. Evidence for lack of general base catalysis and for enzyme--leaving-group interaction. *Eur J Biochem*, **98**: 369–374.
- [30] Paasche A, Zipper A, Schäfer S, Ziebuhr J, Schirmeister T, Engels B (2014) Evidence for Substrate Binding-Induced Zwitterion Formation in the Catalytic Cys-His Dyad of the SARS-CoV Main Protease. *Biochemistry*, **53**: 5930–5946.
- [31] Okamoto DN, Oliveira LCG, Kondo MY, Cezari MHS, Szeltner Z, Juhász T, Juliano MA, Polgár L, Juliano L, Gouvea IE (2010) Increase of SARS-CoV 3CL peptidase activity due to macromolecular crowding effects in the milieu composition. *Biological Chemistry*, **391(12)**:
- [32] Lai L, Han X, Chen H, Wei P, Huang C, Liu S, Fan K, Zhou L, Liu Z, Pei J, Liu Y (2006) Quaternary Structure, Substrate Selectivity and Inhibitor Design for SARS 3C-Like Proteinase. *Curr Pharm Des*, **12**: 4555–4564.
- [33] Song J (2020) *2019-nCoV 3C-Like Protease carries an activity-enhancing T285/A variation which may contribute to its high infectivity*, Open Science Framework.
- [34] Chuck C-P, Chong L-T, Chen C, Chow H-F, Wan DC-C, Wong K-B (2010) Profiling of Substrate Specificity of SARS-CoV 3CL^{pro}. *PLoS ONE*, **5**: e13197.
- [35] Hsu M-F, Kuo C-J, Chang K-T, Chang H-C, Chou C-C, Ko T-P, Shr H-L, Chang G-G, Wang AH-J, Liang P-H (2005) Mechanism of the Maturation Process of SARS-CoV 3CL Protease. *J Biol Chem*, **280**: 31257–31266.
- [36] Chen S, Jonas F, Shen C, Hilgenfeld R, Higenfeld R (2010) Liberation of SARS-CoV main protease from the viral polyprotein: N-terminal autocleavage does not depend on the mature dimerization mode. *Protein Cell*, **1**: 59–74.

- [37] Oostra M, Hagemeijer MC, van Gent M, Bekker CPJ, te Lintelo EG, Rottier PJM, de Haan CAM (2008) Topology and Membrane Anchoring of the Coronavirus Replication Complex: Not All Hydrophobic Domains of nsp3 and nsp6 Are Membrane Spanning. *J Virol*, **82**: 12392–12405.
- [38] Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, Zhao Q, Zhou Z, Pei D, Ziebuhr J, Hilgenfeld R, Yuen KY, Wong L, Gao G, Chen S, Chen Z, Ma D, Bartlam M, Rao Z (2005) Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. *PLoS Biol*, **3**: e324.
- [39] Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, Zhang B, Li X, Zhang L, Peng C, Duan Y, Yu J, Wang L, Yang K, Liu F, Jiang R, Yang X, You T, Liu X, Yang X, Bai F, Liu H, Liu X, Guddat LW, Xu W, Xiao G, Qin C, Shi Z, Jiang H, Rao Z, Yang H (2020) Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, **582(7811)**: 289–293.
- [40] Zhu L, George S, Schmidt MF, Al-Gharabli SI, Rademann J, Hilgenfeld R (2011) Peptide aldehyde inhibitors challenge the substrate specificity of the SARS-coronavirus main protease. *Antiviral Research*, **92**: 204–212.
- [41] Jacobs J, Grum-Tokars V, Zhou Y, Turlington M, Saldanha SA, Chase P, Egger A, Dawson ES, Baez-Santos YM, Tomar S, Mielech AM, Baker SC, Lindsley CW, Hodder P, Mesecar A, Stauffer SR (2013) Discovery, synthesis, and structure-based optimization of a series of N-(tert-butyl)-2-(N-arylamido)-2-(pyridin-3-yl) acetamides (ML188) as potent noncovalent small molecule inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease. *J Med Chem*, **56**: 534–546.
- [42] Wang L, Bao B-B, Song G-Q, Chen C, Zhang X-M, Lu W, Wang Z, Cai Y, Li S, Fu S, Song F-H, Yang H, Wang J-G (2017) Discovery of unsymmetrical aromatic disulfides as novel inhibitors of SARS-CoV main protease: Chemical synthesis, biological evaluation, molecular docking and 3D-QSAR study. *Eur J Med Chem*, **137**: 450–461.
- [43] Karypidou K, Ribone SR, Quevedo MA, Persoons L, Pannecouque C, Helsen C, Claessens F, Dehaen W (2018) Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of a novel series of fused 1,2,3-triazoles as potential anti-coronavirus agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **28**: 3472–3476.
- [44] Tsuji M (2020) Potential anti-SARS-CoV-2 drug candidates identified through virtual screening of the ChEMBL database for compounds that target the main coronavirus protease. *FEBS Open Bio*, 2211-5463.12875.
- [45] Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, Becker S, Rox K, Hilgenfeld R (2020) Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease

provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, **368**: 409–412.

- [46] Nutho B, Mahalapbutr P, Hengphasatporn K, Pattarangoon NC, Simanon N, Shigeta Y, Hannongbua S, Rungrotmongkol T (2020) Why Are Lopinavir and Ritonavir Effective against the Newly Emerged Coronavirus 2019? Atomistic Insights into the Inhibitory Mechanisms. *Biochemistry*, **59**: 1769–1779.
- [47] Sang P, Tian S-H, Meng Z-H, Yang L-Q (2020) Anti-HIV drug repurposing against SARS-CoV-2. *RSC Adv*, **10**: 15775–15783.
- [48] Eizert H, Bander P, Bagossi P, Sperka T, Miklóssy G, Boross P, Weber IT, Tözsér J (2008) Amino Acid Preferences of Retroviral Proteases for Amino-Terminal Positions in a Type 1 Cleavage Site. *J Virol*, **82**: 10111–10117.
- [49] Goyal B, Goyal D (2020) Targeting the dimerization of main protease of coronaviruses: A potential broad-spectrum therapeutic strategy. *ACS Comb. Sci.* 2020, 22, 6, 297–305.



Szilágyi László az Eötvös Loránd Tudományegyetemen végzett 1968-ban okleveles vegyészként. 1971-től 2010-ig az ELTE Biokémiai Tanszék oktatója volt, biokémiát, molekuláris biológiát és géntechnológiát oktatott. 1986-ig Dr. Bíró Endre munkatársaként a miozin limitált proteolízisével és a miozin és aktin nukleotid kötő centrumának vizsgálatával foglalkozott. 1986 és 2010 között Dr. Gráf László csoportjában rekombináns szerint proteázok mechanizmusát kutatta. 2007 és 2012 között részt vett az Sapiientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karán a Gén-sebészet szak megteremtésében.