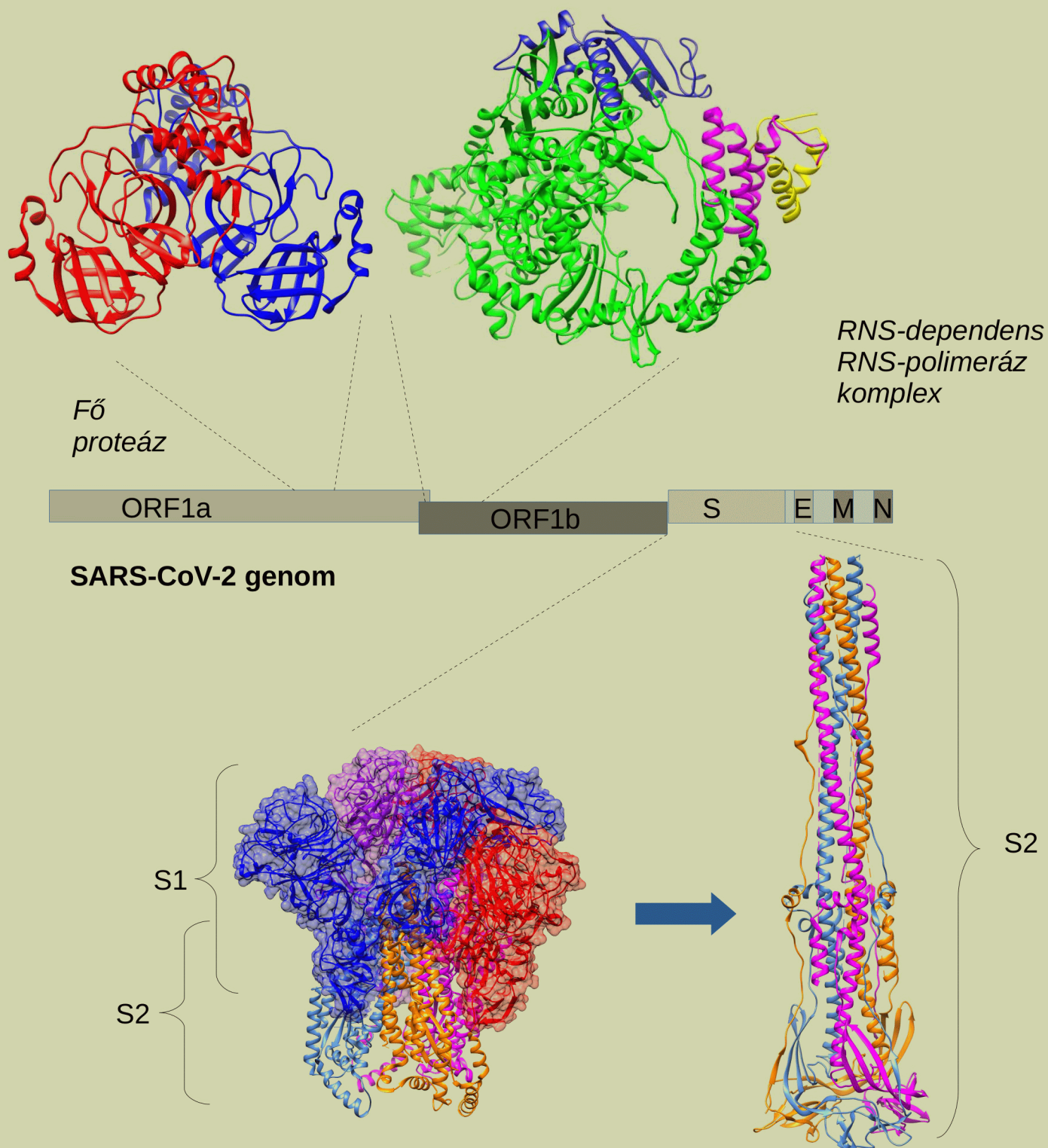


# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLIV. évfolyam 2. szám

2020. június



Spike („tüske”) fehérje pre- és posztfúziós állapota

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Geiszt Miklós,  
Kiricsi Mónika (titkár), Maksay Gábor, Nyitray László, Sarkadi Balázs,  
Székács András, Szondy Zsuzsa

Főszerkesztő:

**Szűcs Mária**

szucs.maria@brc.hu

Technikai szerkesztő:

**Bérdi Péter**

info@remekdesign.hu

**XLIV. ÉVFOLYAM 2. SZÁM**

**2020. június**

## TARTALOMJEGYZÉK Covid-19 tematikus szám

*Címlapkép: A koronavírusok genomjának általános vázlata és három kiválasztott fehérje térszerkezete. Fent: a SARS-CoV-2 vírus fő proteázának és RNS-függő RNS-polimerázának szerkezete. Lent: a SARS-CoV tüskefehérjéjének pre- és posztfúziós állapota. Az egyes fehérjéket kódoló gének hozzávetőleges helyzetét vonalak jelölik (a polimeráz esetében ez a katalitikus alegységre vonatkozik). Készítette Gáspári Zoltán, lásd 18. oldal.*

<i>Prológus</i> .....	4.
<b>TUDOMÁNYOS CIKKEK</b>	
Sarkadi Balázs: Koronavírusról a karanténból .....	5.
Gáspári Zoltán: Fejezetek a 2019-nCoV/SARS-CoV-2/Covid-19 vírus szerkezeti biológiájából .....	16.
Szilágyi László: A 3CL proteáz szerepe a koronavírus fertőzésben .....	27.
Tóth Gábor Endre, Kemenesi Gábor, Jakab Ferenc: Harmadik generációs, nanopórus-alapú szekvenálási technológia szerepe a modernkori járványokban .....	47.
Keserű György Miklós: Újrapozicionált gyógyszerek alkalmazási lehetőségei Covid-19 fertőzésben .....	53.
<b>FELHIVÁS</b>	
Ovádi Judit: Egy Covid-19 project születése .....	62.
<b>TUDÓS MOZAIK KARANTÉN IDEJÉN</b>	
Gráf László: A tojás-virtustól a tojásvírusig .....	65.
Bay Péter: Lockdown, avagy hogyan lettem háztartásbeli .....	66.
Benyhe Sándor: A home office közös/megosztott magánya .....	69.
Lukács András: Fotoaktív fehérjék karantén idején .....	72.
Sarkadi Balázs: Karanténban .....	76.
Szűts Dávid: Kutatás koronavírus-járvány idején .....	77.
Villányi Zoltán: Egyetemi élet a koronavírus árnyékában .....	81.
Bernáth Sándor: Karantén Rómában .....	85.
<b>KONFERENCIA HIRDETÉS</b>	
Elmarad az MBKE 2020. évi vándorgyűlése, Pécs .....	92.

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület  
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.  
<http://www.mbkegy.hu>  
Felelős kiadó Dr. Buday László  
Az engedély száma III/SZI/397/1977  
HU ISSN 2060 8152 (Online) | HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

*Kedves Olvasó!*

A 2020-as év elején nagyon rövid idő alatt kialakuló, a SARS-CoV-2 vírus okozta világméretű pandémia következtében napjainkig több mint 8,9 millió ember igazoltan megfertőződött és a halálos áldozatok száma közel 470 ezer. A Covid-19 világjárvány drámaian megváltoztatta az életünket, lezárták az ország határokát, ideiglenesen bezártak a munkahelyek, iskolák, egyik napról a másikra áttértünk a távmunkára (home office) és a távoktatásra. Elkezdtünk távolságot tartani, a korábbinál többször és alaposabban kezdet mosni, közterületen maszkot hordani. Megváltoztak a napi rutinjaink, más lett az oktatás, a kutatás, a családi és közösségi élet, a kapcsolattartás módja, beszűkültek a társas viszonyaink. Több hétig voltak kijárási korlátozások. Hirtelen tömegek kényszerültek arra, hogy néhány lépcsőfokot átugorjanak a jövőbe, már ami a digitális technológia használatát illeti.

A SARS-CoV-2 elleni küzdelem részeként soha nem látott ütemű tudományos kutatás indult meg, napjainkig már tízezernél is több új tudományos közlemény jelent meg. Gőzerővel zajlanak a kutatások a lehetséges gyógymódok és a fertőzés megelőzését célzó védőoltások fejlesztésére. Új preprint szerverek és a közösségi média kínálta lehetőségek kihasználásával az új tudományos eredmények korábban nem látott sebességgel válnak széles körben hozzáférhetővé.

A pandémia 2020 júniusára a visszahúzódás szakaszába ért a világ legtöbb országában. A világjárvány hosszú távú hatásait még nem lehet tudni, de valószínűsíthető, hogy sok minden megváltozik az életünkben.

A Biokémia júniusi Covid-19 tematikus lapszámával kettős célt valósítunk meg: egyrészt a téma hazai prominens kutatói segítségével bemutatjuk az új típusú koronavírusról eddig szerzett tudományos ismeretek egy-egy területét. Másrészt személyes beszámolókat olvashatunk, hogyan változott meg a tudományos kutatók/oktatók élete a világjárvány következtében, hogyan dolgoztak és éltek ebben a nehéz időszakban.

Köszönet szerzőinknek!

2020. június 22.

*Szűcs Mária*  
*főszerkesztő*



## KORONAVÍRUSRÓL A KARANTÉNBÓL

**Sarkadi Balázs**  
**Természettudományi Kutatóközpont**  
**Enzimológiai Intézet, Budapest**

Sokan jóslták, hogy az emberiségre az igazi veszélyt egy gyorsan terjedő és súlyos megbetegedést okozó vírus jelenti majd, de hogy egy egyszerű koronavírus ilyen nagy balhét eredményezhet, azt talán senki nem gondolta volna. A koronavírusok jól ismertek itt élnek velünk, nevüket a lipid kettősrétegű burokba ágyazott fehérjetüskékről, a nap koronájához hasonlóan kitüremkedő glükoproteinekről kapták. Egyszálú RNS az örökítő anyaguk, gyorsan terjednek, az emberben általában egy kis náthát, hasmenést, és a háziállatokban is főként enyhe betegségeket okoznak, bár, ha a malacok, a borjak vagy a csirkék fertőződnek meg, néha jelentősebb gazdasági károk is jelentkezhetnek. Igaz, az elmúlt években a SARS (*Severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV*) és a MERS (*Middle East respiratory syndrome, MERS-CoV*) betegség már jól mutatta, hogy ezek a korábban nem ismert, az emberre is fertőző koronavírusok súlyos légúti panaszokat, tüdőgyulladást okozhatnak, és képesek a gyomrot és a bélrendszert is megtámadni. Viszont a magas halálozási arány ellenére ezeknek a koronavírusoknak a fertőzőképessége viszonylag alacsony volt, így néhány hónap vagy év alatt gyakorlatilag kipusztultak, a fertőzések visszaszorultak.

### *Az új koronavírus*

A Covid-19 járványt okozó SARS-CoV-2 vírus valószínűleg csak néhány éve fejlődött ki, a SARS-CoV vírus közeli rokonaként, eredetileg a denevérekben elszaporodva, majd folyamatosan alkalmazkodva az emberben való terjedéshez (persze nem a kínai tudósok, hanem a vírusevolúció rettenetes sebességű folyamata termelte ki őket). De hát mit tudnak ezek a vírusok, hogy ilyen gyorsan és hatékonyan terjednek és fertőznek, ilyen súlyos károkat, akár halált okozhatnak? A különböző vírusok változatos technikákkal használják fel a megtámadott gazdasejtek alkotórészeit a saját szaporodásuk elősegítésére - hiszen minden ilyen munkát a gazdasejttel kell elvégeztetniük. Úgy tűnik, hogy a CoV-2 vírus egy rendkívül hatékony kombinációját alkalmazza ezeknek a „trükköknek”.

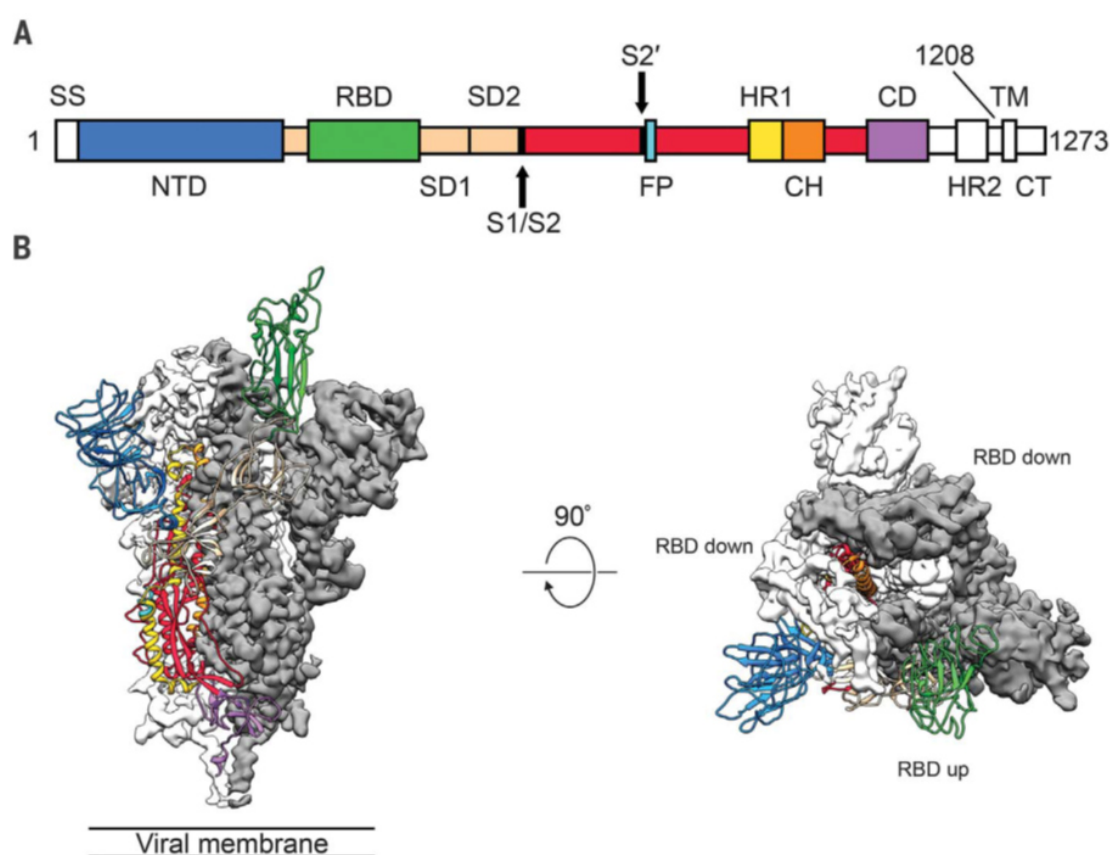
A vírusoknak valahogy be kell jutniuk a gazdasejtekbe, ahhoz, hogy szaporodni tudjanak. Ehhez a sejtek membránján lévő receptorokat használják, nagy változatossággal. A sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódnak, és mindjárt ezt a kap-

csolódást használják a sejtekbe történő bejutáshoz – ún. receptor-függő endocitózissal vagy fúzióval hatolnak át a sejtmembránon. Ebben a lépésben a CoV-2 vírus különlegesen ügyes támadó. A vírus felszínén, a tüskéket alkotó „Spike” fehérje egy olyan szerkezeti elemet, receptorkötő domént, RBD-t tartalmaz, amely nagy affinitással képes az elsősorban a légutak és a tüdő sejteinek a felszínén található ACE2 (angiotenzin konvertáló enzim) nevű receptorhoz kapcsolódni. Az ACE2 hozza létre az angiotenzin II nevű peptidet, amely jelentős szereplő a vérnyomás és a veseműködés szabályozásában - az ACE2 gátlószerek ezért a vérnyomáscsökkentés fontos gyógyszerei. A vírus kötődése ehhez az élettanilag igen fontos ACE2 receptorhoz kiváltja a sejtekben az endocitózist és megtörténik a vírus bekebelezése. Érdekes, hogy a vírus bejutásához még egy másik sejtfelszíni fehérjebontó enzim (a TMPRSS2 nevű proteáz) is szükséges, amely a vírus Spike fehérjéjét elhasítva segíti elő a bejutást. Mérnöki pontosságú akció, a szervezet számára nélkülözhetetlen membránfehérjék felhasználásával!

A következő lépés a vírus sejtben belüli felszaporodása. Ehhez a vírus belsejében található hosszú, több ezer bázist tartalmazó egyszálú RNS hordozza a genetikai információt. Ez az információhordozó számos vírus (pl. az influenza, a HIV, vagy a polio) esetében szintén RNS, de a CoV-2 ebben is különleges ügyes. A vírus RNS-e itt pontosan olyan, mintha a sejt saját örökítő anyagáról, a DNS-ről készült messenger RNS lenne, azaz a sejt saját fehérjeszintetizáló rendszere, a riboszómák számára azonnal leolvasható (pozitív irányú szál), és minden olyan molekuláris jelzővel fel van szerelve (az ún. 5' végén metilált sapka, a másik, a 3' végén egy poliadenil farok található) amelyek azt üzenik a riboszómáknak, hogy erről az RNS-ről fehérje készülhet. A sejt szorgalmasan el is készíti a vírusfehérjék tömegét, már csak az RNS szál újraképzése van hátra. A vírus RNS sokszorozásához is egy olyan fehérjét használ a CoV vírus, amelyet a magával hozott láncról a sejtrel készítettett el – ez a vírus RNS függő RNS polimeráza, vagy másnéven replikáz enzime. Ez teszi lehetővé, hogy maga a vírus RNS is tömegesen felszaporodjék, majd ezt követően a sejt számos alapvető mechanizmusának felhasználásával a teljes vírus összeszerelje magát.

Végül az összeszerelt új vírusok tömegének ki kell jutnia a gazdasejtéből. Ehhez ismét a sejt saját kiürítő, szekréciós mechanizmusát veszi igénybe – a sejtmembrán lipidjeit „elozva” készül el és távozik a membránba burkolt, újra fertőzőképes vírus. A megtámadott sejt a tömeges vírustermelésbe és saját működéseinek elvesztésébe „belehal”, és a pusztuló sejtek körüli gyulladáso

reakció súlyos szöveti károsodást okozhat. A CoV-2 vírust megkötő ACE2 receptorok helyzetének megfelelően, a szövetkárosodás elsősorban a légutakban és a tüdőben jelenik meg, de a receptor a bélben és még számos szervünkben is megtalálható, így a vírus ott is szaporodhat és károkat okozhat. A járvány szempontjából fontos, hogy a CoV-2-nek az influenzavírushoz hasonló, az emberi sejtektől „rabolt” kettős lipidmembrán burka van, ámde úgy tűnik, hogy ez ellenállóbb, mint az influenzavírusé, mert akár több méter távolságba is eljuthat a fertőzött tüszőszentésével, köhögésével, de akár az egyszerű kilégzéssel is távozó micropartikelben. Éppen ezért a CoV-2 még az influenzánál is hatékonyabban terjed cseppfertőzés révén.



**1. ábra. A) A CoV-2 vírus RNS-ének régiói. B) A Spike fehérje, illetve a receptorkötő domén (RBD) krio-elektronmikroszkopos szerkezete.**

### Hogyan reagál az immunrendszerünk?

Mindez a különlegesen egyedi és „ravasz” fertőzési, szaporodási mechanizmus okozhatja, hogy a CoV-2 ilyen világméretű járványt, pandémiát okozhat. De mi a helyzet az emberi immunrendszerrel, amely azért a legtöbb vírusfertőzés esetében hatásos védelmet biztosít. A CoV-2 ebben a tekintetben is különlegesnek mondható. Először is, mivel ez a vírus viszonylag új megjelenésű,

az emberi szervezet még nem találkozott vele, és így nincs kialakult, előzetes immunológiai memória vele szemben. Ráadásul, éppen a gyors és hatékony felsokszorozási módszere alapján a CoV-2 nagyrészt képes elkerülni az ember elsődleges, veleszületett immunvédelmét.

Az elsődleges, azonnali vírusellenes immunválaszunk főként az interferonokon (IFN), a komplementrendszer aktiválódásán és a természetes ölüsejtek (NK sejtek) akcióján alapul. Az interferon fehérjék (elsősorban az IFN $\alpha$  és IFN $\beta$ ) a vírussal fertőződött sejtekben termelődnek, és a környező sejtekben leállítják a fehérjeszintézist, evvel a vírus szaporodását. A vírusok hatására aktiválódó, a vérben keringő, önmagát felsokszorozni képes komplementrendszer fehérjei közvetlenül is pusztíthatják a kórokozókat, de egyben opszonizáló hatásúak, így elősegítik a járőröző fagocita sejtek számára a vírusok bekebelezését, megemésztését. A fehérvérsejtek egy kis hányadát jelentő, de állandóan őrzőjáratot végző limfociták, a természetes ölü (NK) sejtek felismerik a vírussal fertőzött sejteket, ekkor kikapcsolódik a saját sejtek elleni támadást lefékező receptoruk, és megkezdik a haldokló, vírustermelő sejtek elpusztítását.

Úgy tűnik, hogy a CoV típusú vírusok esetében ezek az azonnali, veleszületett immunreakciók gyakran nem elég hatásosan működnek, ezért a fő szerep az ún. adaptív, az adott vírus támadására célzottan reagáló immunválasznak jut. Ez az összetett, időt (napokat, akár heteket) igénylő válasz elősegíti a gyógyulást, ugyanakkor előidézheti a vírusbetegség súlyosbodását is.

Egy egész immunológia tankönyvet könnyen megtöltő részletek helyett itt csak röviden foglalom össze ezt a folyamatot. Az adaptív immunválasz első lépéseit az antigénprezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek) jelentik, amelyek járőrözésük során a vírust megemésztik, fehérjeit feldarabolják, majd a sejtfelszínükön prezentálják az apróra hasított kis peptideket. Ezt a sejtfelszíni testidegen anyagot felismerik a limfociták, amelyek egymást is folyamatosan aktiválva két fontos úton eredményezik a vírusfertőzés leállítását. Egyrészt sejtölő (citotoxikus) T limfociták jönnek létre, amelyek a fertőzött sejteket most már pontos célzással kezdik elpusztítani, másrészt az aktiválódó B limfociták a vírusfehérjéket megcélzó ellenanyagokat termelnek.

A vírusfehérjék ellen termelődő ellenanyagok először IgM típusúak, majd néhány héten belül kialakulnak a hatékonyabb, tartósabb jelenlétet biztosító IgG típusú ellenanyagok. Ezek egy része vírus semlegesítő (neutralizáló) hatású, azaz

megkötődik a vírus felszínén és megakadályozza a vírus kötődését a receptorhoz és a behatolást a gazdasejtekbe. A termelődő ellenanyagok ugyancsak részt vehetnek a már említett komplementrendszer aktiválódásában és vírusölő hatásában. Ilyen módon az adaptív immunválasz a vírusfertőzés leállítását, a kórokozók eltávolítását eredményezi, majd a memóriasejtek kialakulásával hosszútávon is megtartja az adott vírus elleni hatékony védekezés lehetőségét. Mi a gond akkor evvel a válasszal a CoV-2 vírus esetében? Úgy tűnik, hogy a kialakuló immunválasz néha túl gyenge vagy túl erős reakciót ad a fertőzésre, így vagy nem tudja a vírust hatékonyan elpusztítani, vagy éppen még nagyobb bajt okoz, mint maga a fertőzés. A gyenge, esetleg megkéső immunválasz fő oka valószínűleg a nem jól működő elsődleges, veleszületett immunreakciók (így az interferon termelés) gyengesége, lassúsága, míg a túlzott immunreakció pontos oka egyelőre nem igazán ismert. Ez a túlzott reakció az ölüsejtek által kiürített gyulladáscitokinek és interleukinek tömeges megjelenését és az azok által kiváltott súlyos, általános gyulladáscsökkentő folyamatot jelenti. Ez a CoV-2 esetében, a vírus támadási helyének megfelelően, elsősorban a tüdőgyulladás formájában jelentkezik. A „citokin vihar”-nak nevezett folyamat során az immunrendszer szinte valamennyi tagja aktiválódik, mintegy megrohmozza a vírusokat tartalmazó szöveteket, lázat, rosszullétet, a tüdőben gyulladáscsökkentő viznyőt (ödémát) vált ki, ami a légúti csatornában a levegő és a vér közötti oxigénátadást megzavarja, súlyos légzési nehézséget, kezelés nélkül fulladást okozhat. A többszörös alapbetegségekben szenvedő, idős emberek különösen érzékenyek erre a gyulladáscsökkentő reakcióra, ezért szedi az áldozatait elsősorban közülük a CoV-2 vírus. Érdekes, statisztikákkal is alátámasztott, bár egyelőre erősen vitatott gondolat, hogy azokban az országokban (pl. Magyarországon is), ahol a tuberkulózis elleni védőoltás kötelező, a már gyakorlottabb immunrendszer fokozottabb védelmet adhat a CoV-2 vírus ellen is. A napokban megjelent tudományos közlemények arra is utalnak, hogy a korábbi, viszonylag ártalmatlan koronavírus fertőzések is hagyhatnak védekező emlékezetet az immunrendszerünkben.

### *Tesztelés*

A vírus hatásainak és a szervezet ellenhatásainak ismeretében most már áttekinthetjük, hogy milyen megelőzési vagy gyógyítási lehetőségek állhatnak rendelkezésre. A legfontosabb, hogy ehhez pontosan ismerni kell a vírusfertőzés megjelenését és a kialakuló immunválasz állapotát. Ezért hangoztatta a WHO elnöke a vírus elleni küzdelem fő szabályaként, hogy „tesztelni, tesztelni, tesztelni!”. De hát mit is kell tesztelnünk?

A vírus megjelenését, támadását leghatékonyabban és legspecifikusabban a vírus RNS kimutatásával tesztelhetjük. A légúti sejteket is tartalmazó orr- vagy szájnyálkahártya kenet, nyálminta, esetleg székletminta már lehetőséget ad a vírus nukleinsav érzékeny kimutatására – ilyen nukleinsav lánc normálisan nem fordul elő az emberi szervezetben. A módszer alapja az 1980-as években felfedezett és mára már általános módszerré vált nukleinsav lánc-sokszorozó reakció (polymerase chain reaction, PCR). A technika alapja a DNS specifikus szakaszának több lépésből álló felsokszorozása, úgy, hogy percek alatt egyetlen DNS szakaszból akár néhány milliárd azonos DNS szakasz nyerhető. Fluoreszcens jelzőmolekulák révén ez a folyamat megfelelő műszerekkel jól követhető, az eredeti DNS szakaszok (templátok), így a jelenlévő vírusok száma is pontosan meghatározható. A módszer érzékenységét jól mutatja, hogy akár egy (!) vírus is, de 10 körüli vírus jelenléte már biztonsággal kimutatható. A CoV-2 vírus esetében a PCR reakciót meg kell előznie egy visszaírás (reverse transcription, RT) lépésnek, amelyben a vírus RNS-t a felsokszorozható DNS-é kell átírni. Kutatási szinten már más érzékeny vírus-kimutatási módszerek is megjelentek, de a gyakorlati CoV-2 diagnosztikában ez az RT-PCR módszer a legszélesebb körben alkalmazható eljárás.

A másik fő tesztelési lehetőség a vírusfertőzés hatására megjelenő antitestek megjelenésének követése, az ún. szerológiai vizsgálat. Erre a leggyakrabban alkalmazott, mennyiségi meghatározást is lehetővé tevő módszer az immunesszé, pl. az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), amely specifikusan, gyorsan és hatékonyan mutatja ki a vérben jelenlévő antitesteket. Lényege, hogy a vírus immunreakciót kiváltó specifikus fehérjéit egy soklyukú műanyag tálca (plate) lyukaiban megkötik, majd a vérplazma vagy szérum hozzáadása után egy érzékenyítő enzimreakció segíti a kimutatást. A CoV-2 vírus terjedése során korán megjelentek az általában kínai vagy dél-koreai cégektől származó szerológiai gyors tesztek, amelyek papírcsíkokra felvitt, jelzőmolekulákkal ellátott vírusfehérjék alkalmazásával a vérben megjelenő vírusellenes IgM és IgG típusú antitestek kimutatását ígérik. Sajnos ezek jelentős része vagy egyáltalán nem működik, vagy túl alacsony az érzékenységük az antitest-szintek kimutatásához. Megjegyezhető, hogy a megjelenő antitestek kimutatása sem jelent egyértelmű védettséget, igazolni kellene az antitestek CoV-2 vírus semlegesítő (neutralizáló) hatását is, de ehhez különösen védett, vírus-tenyésztő laboratóriumra van szükség, ezért rutinszerűen nem végezhető.



A „tesztelni” felszólítás tehát arra vonatkozik, hogy a veszélyeztetett egyéneknél (többszörös alapbetegségben szenvedő idős emberek, egészségügyi személyzet, szociális ellátók stb.) elsősorban a vírus megjelenését kell figyelni, a vírus kimutatására alkalmas RT-PCR tesztet alkalmazni. Ezen az alapon javasolható a karanténba helyezés, elkülönítés vagy a fokozott orvosi figyelem, de egy kezdődő tüdőgyulladás esetén is nagyon fontos eldönteni, hogy azt a CoV-2 vírus okozza, vagy attól teljesen független, például bakteriális eredetű. Ugyanakkor elsősorban a már vélhetően fertőzött vagy a fertőzésen átesett egyéneknél érdemes a szerológiai vizsgálatot alkalmazni, annak eldöntésére, hogy kialakult-e a korai (IgM) vagy már folyamatosan működő (IgG) immunválasz, rendelkezik-e az illető védettséget biztosító ellenanyag-szinttel. Ez is nagyon fontos teszt, hiszen mintegy „védettségi igazolást” adhat a fertőzésből már kigyógyult egyének számára, vagy elősegítheti a kezeléseknél alkalmazható ellenanyag dús vérplazma alkalmazását (lásd alább).

### *Megelőzés, gyógyítás*

A CoV-2 vírusfertőzés gyógyítására jelenleg nem rendelkezünk igazán eredményes módszerekkel, és a megelőzés hatékony eszköze is csak a karantén, a szociális (valójában fizikai) távolságtartás vagy a cseppfertőzést akadályozó személyes védőfelszerelés. Természetesen, mind a megelőzésre, mind a gyógyításra vonatkozóan óriási erővel indultak el a kutatások és fejlesztések, ezek remélhetőleg hamarosan széles körben alkalmazhatókká válnak.

A megelőzés és a gyógyítás leghatékonyabb eszköze - a vírusokkal kapcsolatos minden előzetes ismeretünk alapján - az aktív védettséget adó védőoltás, vakcina lehet (a név az emberi himlőt meggátló, tehénhimlő vírust tartalmazó védőoltásból származik). Lényege, hogy valamilyen vírus-alkotóval, esetleg az elölt vagy legyengített vírussal hatékony vírusellenes immunválaszt hozunk létre, anélkül, hogy ez a szervezetet károsítaná. Eredményesen sikerül így gyakorlatilag kiirtani a polio vagy a himlő vírusát, kordában tartani a változatos gyermekbetegségeket okozó vírusokat.

Mi a gond a CoV-2 elleni védőoltással? Először is az, hogy egy hatékony és biztonságos vakcina kifejlesztése általában évekig tart, részletes állatkísérletes, majd a humán klinikai kipróbálás fázisainak kell megelőznie a hatósági engedélyezést. A Covid-19 járvány esetében erre nem igazán van idő, hiszen az egészségügy és a gazdaság egyaránt romokban hever már az eddigi, 2-3

hónapnyi járvány után is. Ezért a legnagyobb gyógyszergyártók és kutatóhelyek változatos taktikákkal igyekeznek minél gyorsabban eredményre jutni, és a hatóságok is nyitottak a gyors engedélyezésre. Itt most nem sorolom fel a CoV-2 elleni vakcinakészítés már hírként is megjelent változatos irányait, de ezek között az előtt CoV-2 vírusok mellett a biotechnológia legváltozatosabb módszerei jelennek meg. Készülnek olyan betegséget nem okozó vírus hordozók, amelyek vagy a CoV-2 sejtfelszíni fehérjéit fejezik ki, vagy akár a CoV-2 RNS egyes szakaszait tartalmazzák, és amelyekből az emberi sejtekben egy fertőzni már nem képes, de immunizációt kiváltó vírusburok alakul ki. Az immunrendszer célzott aktiválását talán legegyszerűbben az ACE2 receptort felismerő Spike fehérje vagy a receptor-kötő domén beadásával lehetne elérni, bár ez nem biztos, hogy elég hatékony módszer lesz. Az így kialakuló antitestek viszont közvetlenül erre a régióra hatva, várhatóan megakadályozzák a vírus sejtbe jutását.

A CoV-2 vírust közvetlenül semlegesítő antitestek vagy fehérjék alkalmazása lehet a leggyorsabb, mégis hatékony védekezés alapja. Ennek máris megkezdett formája a Covid-19 betegségen átesettek vérplazmájának gyűjtése, majd megfelelő előkezelés után a vírusellenes ellenanyagokat magas titerben tartalmazó plazma beadása a súlyos állapotú betegeknek. Ez a passzív immunizálás (erre példa a tetanuszban alkalmazott, magas antitest-titerű „lószérum”) az első eredmények szerint azonnali jótékony CoV-2 vírusellenes hatást vált ki. De a modern biotechnológia módszereivel *in vitro* is legyárthatók olyan antitestek, amelyek pl. a betegségen átesett emberek limfocitáinak felszaporításával és kiválogatásával termelhetők és eredményes vírusellenes hatást gyakorolnak. A humanizált monoklonális CoV-2 neutralizáló ellenanyagok jelentős fegyvert eredményezhetnek a vírusfertőzés legyőzéséhez. Valamennyi antitest-alapú kezelésnél komoly veszélyt jelent viszont az ún. antitest-függő fokozott immunreakció (antibody-dependent enhancement, ADE), amely a vírus elleni védelem helyett – eddig nem pontosan ismert mechanizmussal - éppen súlyos citokin vihart, általános gyulladási reakciót eredményez. Ennek elkerülése igen fontos szempont egy ilyen kezelés fejlesztése és engedélyezése során.

Talán a CoV-2 vírus ellen alkalmazható lehetséges gyógyszerek tekintetében a legnagyobb a zűrzavar, a félrebeszélés, de nagyon intenzív a szakmai munka is. Hatékony vírusellenes gyógyszerekkel egyelőre alig rendelkezünk, általában kombinált kezelések tudnak csak legalább részleges, a betegeket életben tartó

eredményt elérni (lásd a HIV vírust). Egyes antibiotikumok vagy malária elleni gyógyszerek (pl. a klorokin vagy a hidroxiklorokin) rendelkeznek mérsékelt vírusellenes hatással is, de a szükséges magas dózis és a gyakran súlyos mellékhatások miatt ezek klinikai alkalmazása csak kétségbeesett próbálkozásnak látszik. Számos klinikai kísérlet folyik más betegségben már valamennyire hatékony vírusellenes szerekkel, bár egyelőre átütő eredmények nélkül. Izgalmas új hír a Remdesivir nevű (eredetileg az Ebola vírus ellen fejlesztett, ott hatástalannak talált) gyógyszer pozitív klinikai hatása. Ez a molekula célzottan a vírus RNS sokszorozó enzimét gátolja, így megakadályozhatja a vírus gyors szaporodását. Érdekes adalék, hogy a Remdesivir feloldásához és beadásához szükséges ciklodextrin származék egy magyar találmány alapján Magyarországon készül, és máris tonnaszám kerül felhasználásra a klinikai kipróbálásoknál. Természetesen, a CoV-2 ellenes kismolekulájú vagy fehérjealapú új gyógyszerek fejlesztése hatalmas lendülettel folyik az egész világon – biztosan remélhetjük, hogy ezek között lesz olyan, amely hatékonyan gyógyítja ezt a betegséget. Ugyanakkor az új gyógyszerek kipróbálása és bevezetése még a vakcináknál is lassúbb és bonyolultabb folyamat, így gyors eredményre ezen a téren sem számíthatunk.

### *A járvány és kezelése*

Az elmondottak segíthetnek annak megértésében, hogy a CoV-2 miért is okozhatott világjárványt, s hogy a vírus és az emberi szervezet harcában mit is tehetünk a járvány megakadályozása, a súlyos következmények csökkentése érdekében. A járvány pontos követése, a lehetőségek matematikai modellezése sokat segíthet ebben a megértésben és a teendők kialakításában is. A vírus természetéből fakad, hogy a testnedvek cseppjeiben vagy a fertőzött felületeken túlél, és a szájba, szembe vagy egyéb nyálkahártyára kerülve fertőzőképes marad. Könnyen terjed, viszont érzékeny az alkohol vagy a detergens hatására (ez utóbbiak természetesen mérgezők, így semmiképpen nem szabad meginni!), már 60-70 fokon elpusztul (így pl. az újságok egy 70 fokos sütőben néhány perc alatt vírusmentesíthetők), és az UV sugárzás (így a szabadban a napsütés) is rövid idő alatt megöli a vírust. Semmelweis nyomán pedig, tessék mindig alaposan, szappannal kezét mosni!

Jelenleg a járványban a kulcsfeladat a célzott, de széleskörű kétirányú tesztelés (vírus és antitest kimutatás), a személyes védőfelszerelések használata, a személyes távolságtartás, a megfelelő, szintén célzott karantén intézkedések kialakítása, valamint a vírusfertőzöttek gondos klinikai kezelése és ellátása. A

klinikai lélegeztetőgépek hatalmas száma terén elhangzó politikusi nyilatkozatok a gyakorlatban alig értelmezhetők. Először is, az ilyen beavatkozáshoz megfelelő géppark és rutinos egészségügyi személyzet szükséges, hiszen a betegek altatásban kell a légcsövébe vezetni a lélegeztetőgéppel összekapcsoló csövet (tubust), majd hosszasan kell ápolni a tartósan szinte mozdulatlanul fekvő beteget. Másrészt úgy tűnik, hogy kiegészítő oxigén adása a tüdőgyulladásban szenvedő Covid-19 betegeknek talán hatékonyabb és veszélytelenebb, mint a túlnyomással működő gépi lélegeztetés.

A Covid-19 betegség gyógyszeres kezelésénél fontos felismerés, hogy azt a lehető legkorábban kell elkezdni a fertőzés, illetve a tünetek megjelenése után, mert a legtöbb vírusellenes szer csak ilyenkor képes érdemben hatni. Ugyanakkor, a később jelentkező citokin vihar egészen más, az immunrendszer felpörgetett reakcióját csendesítő, leállító kezelést igényel. Bár ez a vírus újraéledésének veszélyével járhat, ilyen téren is számos klinikai próbálkozás indult már el.

Az igazi, tartós megoldás a járvánnyal szemben a védőhatású vakcina és/vagy a hatékony CoV-2 ellenes gyógyszerek megjelenése lesz. Csak remélhetjük, hogy a járványban intézkedő vezető politikusok figyelnek a szakmai érvekre, kapkodó intézkedések helyett ellátják a közvéleményt és a kutatókat is minél pontosabb epidemiológiai információkkal, s a stratégia kialakításakor figyelembe veszik a vírus tulajdonságait és az emberek adottságait egyaránt.

#### *A járványhoz kapcsolódó kutatási-fejlesztési projektünk*

Intézetünkben, a volt MTA, most ELKH TTK-ban működő kis kutatócsoportom a CoV-2 vírus S1 nevű, az ACE2 receptorkötő régiót tartalmazó fehérjéjének termelésén és tisztításán dolgozik. Amerikai partnerkutatóktól megkaptuk és ellenőriztük a szükséges kiindulási reagenseket. Elindítottuk a fehérjetermelést tenyésztett emberi, aranyhőrcsög- és rovarsejtekben, készítjük az újabb molekuláris biológiai reagenseket stabil és nagy mennyiségű fehérjekinyerés érdekében. Együttműködve az ELTE-TTK Immunológia és Biokémia Tanszékével, elkezdtek előállítani, tisztítani és jellemezni a vírusfehérjét, elindítjuk egy hatékony és érzékeny, mennyiségi meghatározásra is alkalmas szerológiai, antitest-tesztelő rendszer elkészítését. A tisztított fehérje felhasználásával, klinikusokkal karöltve, megpróbálunk további tesztrendszereket kialakítani és a vakcinafejlesztésbe is bekapcsolódni. Az ugyan nem reális, hogy a most kialakult hatalmas nemzetközi CoV-2 kutatási versenybe magas szinten bekapcsolód-

hassunk, de reményeink szerint a létrehozott anyagok és módszerek jelentősen támogatják elsősorban a hazai diagnosztikát és gyógyszerfejlesztést.

-----  
*A járványról az utóbbi két hónapban több mint 7.000 szakcikk jelent meg, ezek megfelelő hivatkozása nem fér bele most ebbe az írásba.*



**Sarkadi Balázs** orvos, biológus, az MTA rendes tagja. Több évet töltött posztdoktorként, majd kutatóként az USA és Kanada vezető egyetemén és kutatóintézetében. Jelenleg a Természettudományi Kutatóközpont emeritusz professzora, a Semmelweis Egyetem kutatóprofesszora. Számos nemzetközi tudományos társaságnak tagja, a FEBS volt elnöke, az Academia Europaea tagja. Kutatási területe elsősorban a biológiai membránok szerkezete és működése, kiemelten az ABC típusú transzporterek szerepének vizsgálata a daganatokban, az őssejtekben és a gyógyszer-metabolizmusban. Több mint 250 közleménye jelent meg nemzetközi folyóiratokban, amelyekre mintegy 15.500 hivatkozás érkezett (h-indexe 66). Témavezetésével végzett PhD hallgatóinak száma 21, számos nemzetközi oltalommal védett szabadalma került gyakorlati alkalmazásra is.

## FEJEZETEK A 2019-NCOV/SARS-COV-2/COVID-19 VÍRUS SZERKEZETI BIOLÓGIÁJÁBÓL<sup>1</sup>

**Gáspári Zoltán**  
**Pázmány Péter Katolikus Egyetem**  
**Információs Technológiai és Bionikai Kar**

### *Összefoglalás*

Fehérjekutatóként nagy érdeklődéssel követem az új koronavírussal kapcsolatos szerkezeti biológiai fejleményeket, melyek egészen elképesztő iramban történnek a vírus kutatásának minden aspektusában. Az írás már csak emiatt sem törekedhet a teljességre, hanem a talán leginkább reflektorfényben álló három fehérje rövid bemutatására szorítkozik.

### *Egy néhány hónapos kutatási terület*

2020 elején, a Covid-19 járvány kitörésekor számos kutató váltott hirtelen kutatási témát az új koronavírus egyes jellegzetességeire fókuszálva. Nem történt ez másként a szerkezeti biológusok körében sem. Különösen a korábban a vírus közeli ismert rokonaival, mint a SARS-CoV vagy a MERS-CoV kórokozók foglalkozó szerkezetkutatók fordultak az új vírus vizsgálata felé. A Nature folyóirat május 21-én megjelent számában megjelent kommentár [1] érzékletes módon írja le a területen dolgozó néhány tudós személyes történetét az elmúlt hónapokból, hogyan fordították erőforrásaikat gyakorlatilag egyik napról a másikra az új vírus fehérjeszerkezeteinek kutatására.

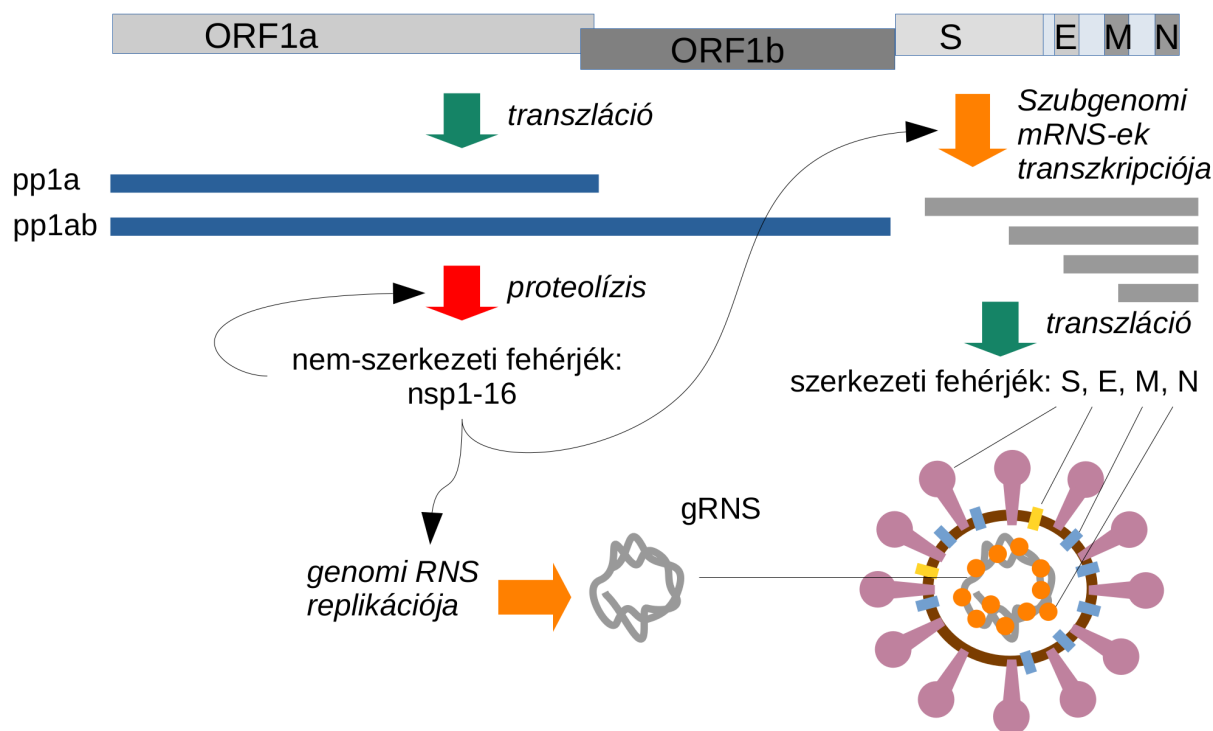
A SARS-CoV-2 szerkezeteinek vizsgálatakor kulcsfontosságúnak bizonyultak a korábbi hasonló vírusok fehérjéiről megismert információk. Mind a konstrukciók előállítására, mint a szerkezetmeghatározáshoz használt körülmények kapcsán felhalmozott korábbi tudás elengedhetetlen volt ahhoz, hogy szinte hihetetlen sebességgel sikerült számos térszerkezet megoldása. A PDB adatbázis ([rcsb.org](http://rcsb.org)) külön aloldalt szentel a koronavírusnak, és e sorok írásakor, 2020. május 27-én már 214(!) szerkezetet tartalmaz egy olyan organizmusból, melynek létezéséről több mint fél éve hallottunk először. A 214 szerkezet természetesen nem ennyi különböző fehérjét jelent, hanem egyes fehérjék több kutatócsoport által és/vagy eltérő körülmények között, sokszor számos különböző ligandummal komplexben lévő szerkezetének felel meg. A szerkezetek közül 196-ot röntgendiffrakcióval, 17-et krio-elektronmikroszkópiával és

---

<sup>1</sup>Jelen áttekintés a 2020. május 21-én megtartott online Szint+ konferencián elhangzott előadás rövid összefoglalása.



egyét NMR-spektroszkópiával határoztak meg. A krio-elektronmikroszkópiát jellemzően a nagyobb méretű komplexek, mint a tüskefehérje (S) és az RNS-dependens RNS-polimeráz meghatározására használják.

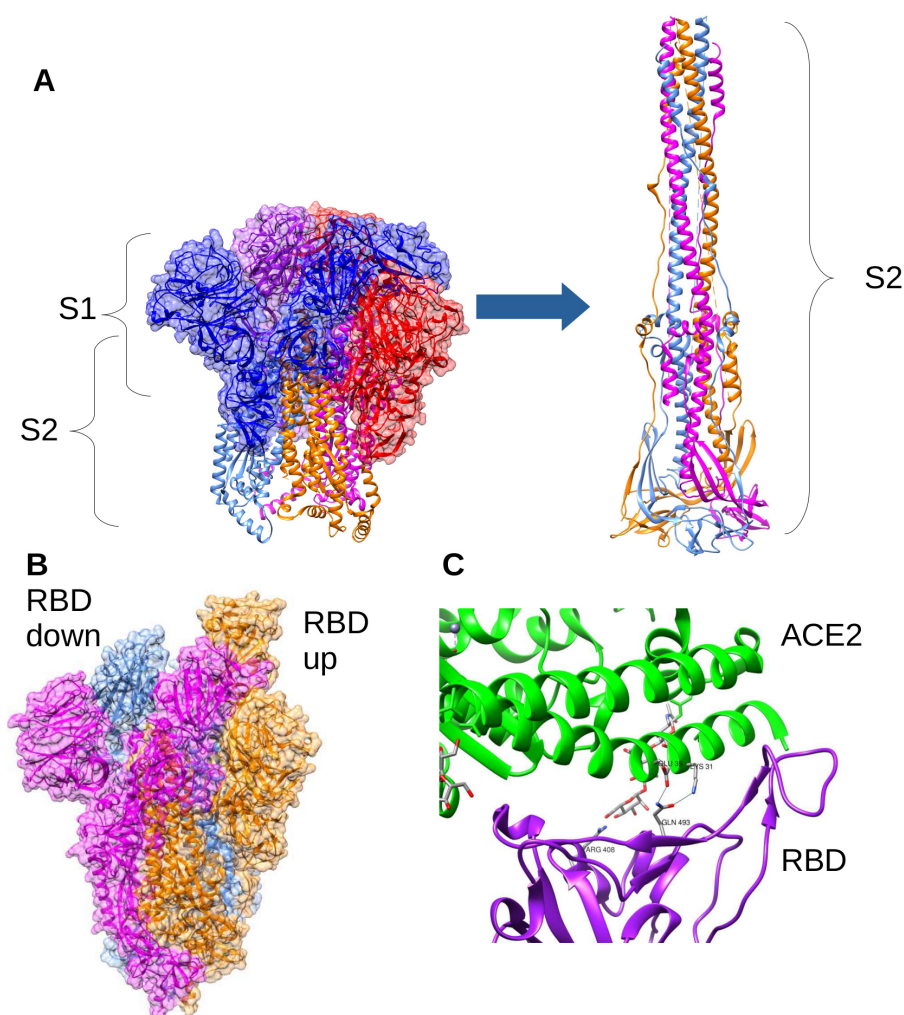


**1. ábra. A koronavírusok genomjának és szaporodásának egyszerűsített vázlatja.** A genom RNS első szakasza azonnal lefordítódik, a frameshift megtörtentétől függően a pp1a és pp1ab poliproteinekre. Ezek feldarabolódnak az ún. nem-szerkezeti fehérjékre. Az ide tartozó proteáz részt vesz önmaga és a többi fehérje kivágásában, az RNS-polimeráz komplex pedig a teljes genom RNS és a szubgenomikus mRNS-ek képződéséért felelős. Utóbbiakról fordítódnak le a szerkezeti fehérjék, melyek a genom RNS-sel együtt részt vesznek az új vírusrészecskék kialakításában.

### A koronavírusok főbb jellemzői

A koronavírusok ún. pozitív-szálú RNS-vírusok, meglepően nagy, mintegy 30.000 nukleotid hosszúságú genommal rendelkeznek, a legnagyobbal az ismert RNS-vírusok között: genomjuk a HIV vírusénak több mint háromszorosa, az influenzavírusénak több mint kétszerese [2]. A vírus sejtbe jutásakor a pozitív szálú RNS első szakasza lefordítódik, és a pp1a, illetve a hosszabb pp1ab poliprotein keletkezik, melyek aztán proteolitikus hasítások által darabolódnak fel az ún. nem-szerkezeti fehérjékre (non-structural proteins). A pp1a polipeptidet kódoló ORF1a végén, a STOP kodon előtti „csúszós” (slippery) UUUAAC heptamer szekvenciánál bizonyos (*in vitro* ~30%-os) valószínűséggel frameshift történik a transzláció során, ez vezet az ORF1b folytatódáshoz és a hosszabb pp1ab poliprotein keletkezéséhez. A pp1a az ún. „immediate early”, a pp1ab pedig ezen felül az „early” fehérjéket tartalmazza

[3]. A genom nagyjából utolsó harmadának megfelelő szakaszáról számos rövidebb, ún. szubgenomikus mRNS másolódik le egy e helyütt nem részletezett komplex mechanizmus révén [4], és ezekről fordítódnak le a szerkezeti fehérjék (structural proteins), melyek a genomi RNS-sel és az endoplazmás reticulum-Golgi köztes kompartmentumból (ERGIC) származó lipid membránnal együtt a vírusrészecskék felépítésében vesznek részt (1. ábra). A továbbiakban az új vírus három talán legintenzívebben kutatott fehérjéjét mutatom be röviden, a Spike („tüske”) szerkezeti fehérje mellett a fő proteáz és az RNS-dependens RNS-polimeráz egyes szerkezeti vonásait tárgyalom.



**2. ábra. A tüskefehérje (Spike protein, S) szerkezete és működése.** A) A prefúziós és a posztfúziós állapot. A receptorkötés során a homotrimer fehérje S1 alegysége távozik, az S2 alegység pedig egy nagyléptékű szerkezeti átalakuláson megy keresztül, ami után képes a membránok fúzióját elősegíteni. PDB kódok: 3JCL (prefúziós állapot) és 6B30 (posztfúziós állapot). B) A SARS-CoV-2 spike szerkezete, melyben az egyik protomer S1 receptorkötő doménje (RBD) „up” konformációban van. PDB kód: 6VSB. C) A SARS-CoV-2 spike RBD:ACE2 interfész szerkezete. A kiemelés olyan hidrogénhidkötéseket mutat, melyeket a SARS-CoV megfelelő komplexében nem észleltek. A „háttérben” az RBD Arg402 aminosava és az ACE2 Asn90 aminosaván lévő glikán kölcsönhatása látszik. PDB kód: 6VW1. A térszerkezeti ábrák az UCSF Chimera programmal készültek.

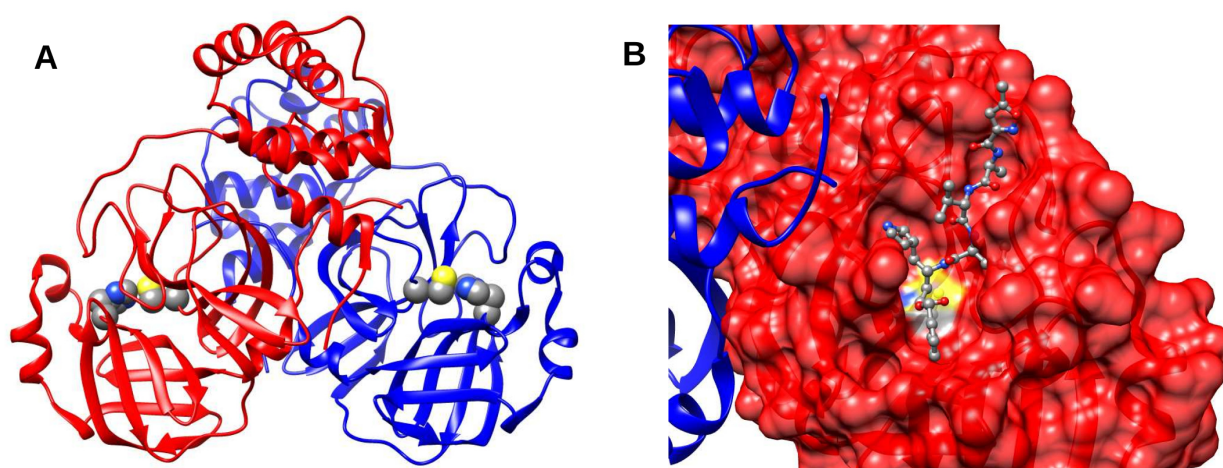
### *A Spike fehérje szerkezete és működése*

A Spike vagy „tüske” fehérje a vírus lipid membránrétegében található, sajátos alakú fehérje, a koronavírusok ezen fehérjék vírusrészecskén való jellegzetes megjelenésükről kapták a nevüket. Szerepük a megtámadott sejteken való receptorfehérje felismerése, majd azután a vírus és a sejt membránja összeolvadásának elősegítése. A homotrimer tüskefehérje mintegy 1300 aminosav hosszú alegységekből áll, melyek legnagyobb része a vírus membránjából „kifelé” mutat, csupán egy kicsi C-terminális szakasz néz a virion belseje felé. A fehérje két ismert proteolitikus hasítóhelyet tartalmaz, melyek közül az ún. S1/S2 határon lévő az, amely mentén a fehérje érése során annak S1 és S2 alegységekre hasad ketté. Az S1 alegység köt a sejtfelszíni receptorhoz, mely a SARS-CoV-2 esetében az ACE2 (angiotenzin konvertáló enzim 2) fehérje, csakúgy, mint a SARS-CoV vírusnál. A receptorkötés feltétele, hogy az S1 alegység receptorkötő doménje (RBD) ún. „up” helyzetben legyen. Érdekesség, hogy a nagy virulenciát mutató SARS és MERS kórokozók, valamint az új vírus esetén a homotrimer szerkezet egyik alegységében ez a domén apo állapotban is nagy valószínűséggel „up” helyzetben van, míg a csak enyhe náthát okozó rokon vírusok esetében ez nem jellemző, csak a receptorral komplexben észlelhető ez a téralkat [5-7]. A receptorkötés után az S1 és az S2 alegységek disszociálnak, melynek természetesen feltétele az S1/S2 helyen történő proteolitikus hasítás. Az új vírus egyik fontos jellemzője, hogy közeli rokonaitól eltérően ezen a helyen egy 4 aminosavas betoldást tartalmaz, mely által egy argininban gazdag ún. polibázikus hely jön létre, mely a furin nevű emberi enzim felismerőhelye [8]. A furin sejteken belül és kívül is jelen van, és a tüskefehérje érése és transzportja során számos alkalommal képes lehet azzal érintkezésbe kerülni. Így a feltételezések szerint az új vírus esetében a hasítás és ezáltal a vírusrészecskék fúziót eredményező receptorkötésének valószínűsége igen nagy. Érdekes, hogy számos egyéb, nem feltétlenül közeli rokon, de analóg mechanizmust használó, nagy virulenciájú vírus – EBV, egyes influenza törzsek stb. - esetében is kimutatható a furin hasítóhely megjelenése [9]. Mindazonáltal igaz az is, hogy a SARS-CoV-2 esetében kísérleti adatok utalnak a TMPRSS membránkötött szerin-proteáz enzim szerepére a tüskefehérje hasításában [10].

Az S1 alegység „távozása” után az S2 egy igen jelentős – az ezt leíró közlemény szavaival élve: tektonikus – konformációváltozáson megy át. A szerkezetváltást talán egy – pontosabban három – bicska kinyílásával lehet legjobban szemléltetni. Az eddig a központi hélix mellé „hajtogatott” HR1 régió mintegy

„kiegyenesedik”, és a központi hélixszel folytonos, hosszú hélixet alkotnak, melyek mellé a C-terminális régióból származó plusz rövid hélix is kerül. Ez az elrendeződés az, amely a jelenlegi modellek szerint elősegíti a virális és a sejtmembrán fúzióját [11].

Ezen mechanizmus részleteit a SARS-CoV tüskefehérjéjének vizsgálatával tárták fel. A SARS-CoV-2 egyedi jellegzetességei nem itt, hanem a receptorkötésben és a glikozilációs mintázatban érhetőek tetten. Mint azt egészen korán kimutatták, a SARS-CoV-2 a SARS-CoV-hoz hasonlóan az ACE2 receptorral kapcsolódva jut be a sejtbe. A szekvenciák összevetéséből nyilvánvaló, hogy a SARS-CoV-2 ACE2-kötő régiója több aminosavcserét tartalmaz a SARS-CoV megfelelő régiójához képest, és fehérje-fehérje interakciós vizsgálatok alapján az új vírus a SARS-CoV-nál mintegy tízszer erősebben képes kötni az ACE2-t [6]. Ennek szerkezeti okait a receptorkötő domén és az ACE2 által alkotott komplexek vizsgálatával lehet feltárni, melyhez nagy segítséget jelentett a két vírusfehérje közeli rokonsága. Az első szerkezeteket kiméra fehérje használatával határozták meg, ahol a SARS-CoV konstrukció ACE2-kötő, a komplexben eltemetett részeit kicserélték az új vírus megfelelő szakaszára, és így a kapott komplex a SARS-CoV fehérje komplexével megegyező körülmények között volt kristályosítható. A komplex szerkezete alapján egyértelműen azonosíthatók azok a hidrogénhid-kötések, melyek a SARS-CoV-2 esetében jönnek csak létre a két fehérje között. A glikánok receptorfelismerésben játszott szerepére példa az ACE2 Asn90 aminosavára kerülő glikozid, mely a tüskefehérjék konzervált Arg408 aminosavával hoz létre hidrogénkötést mindkét említett vírus esetében [12].



**3. ábra. A koronavírus fő proteázának szerkezete.** A) A SARS-CoV-2  $M^{pro}$  dimer szerkezete az alegységek Cys-His katalitikus diádjának kiemelésével. PDB kód: 6Y2E. B) A SARS-CoV-2 proteáz és a vonatkozó közleményben [14] N3 néven említett inhibitor kovalens komplexe. PDB kód: 6LU7. A térszerkezeti ábrák az UCSF Chimera programmal készültek.



Az új vírus tüskefehérjének glikozilációs mintázatát is vizsgálták, a 22 N-glikozilációs helyből 16 azonosítható a krio-EM szerkezetekben, és összesen 20 közös a SARS-CoV tüskefehérjéjével [7] (2. ábra).

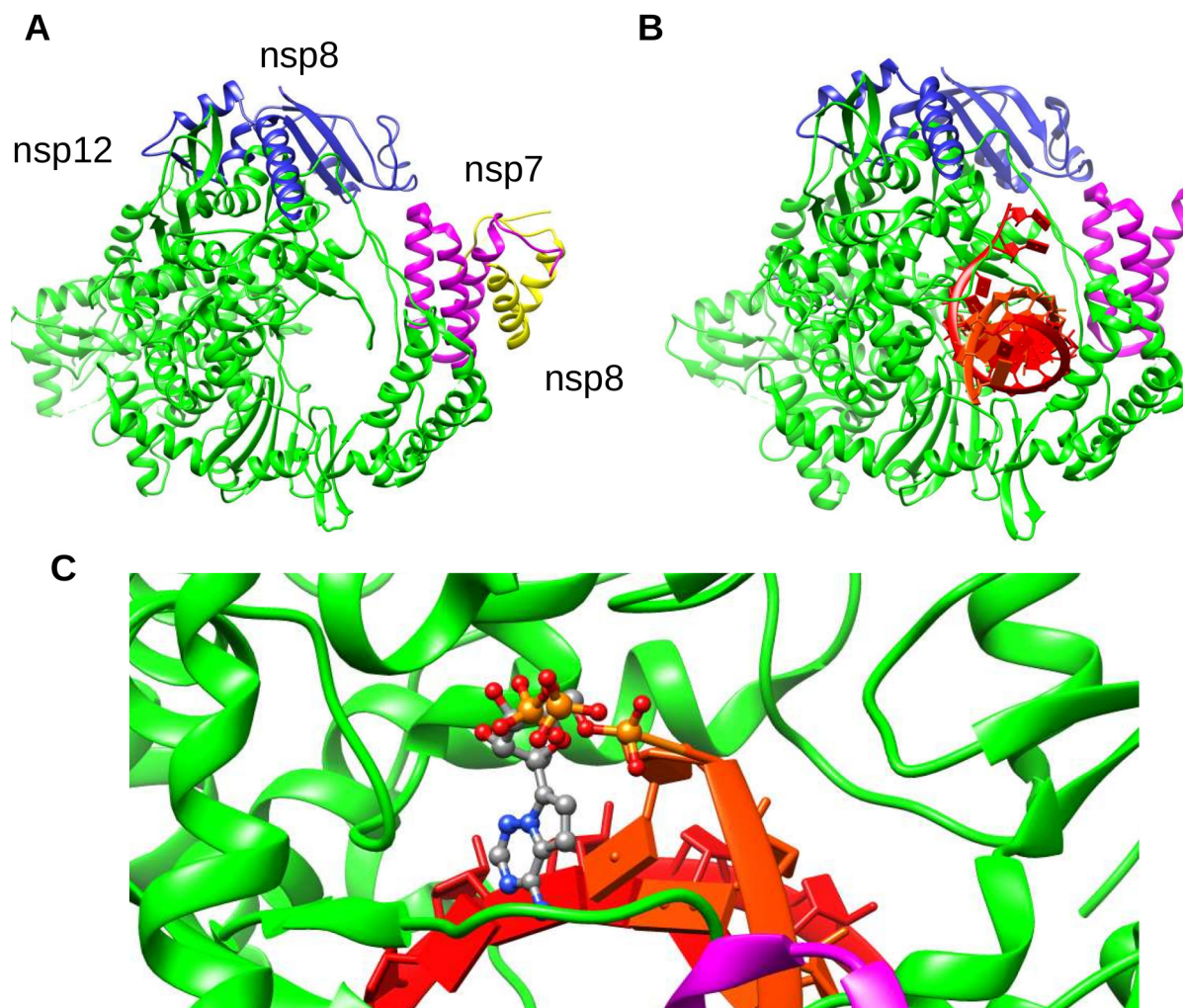
### *A vírus fő proteáza*

A fő proteáz (main protease, M<sup>pro</sup>, más néven 3C-like protease, 3CL<sup>pro</sup>) 11 helyen képes a pp1ab poliproteint hasítani, sőt, képes saját magát is kivágni a polipeptidláncból [13], a vírus replikációjának beindításában így kulcsszerepe van. A 3CL<sup>pro</sup> egy homodimer cisztein-proteáz, melynek katalitikus doménje a tripszinszerű szerinproteázok családjába tartozik, aktív helyén Cys-His katalitikus diáddal. A dimerizáció a katalitikus aktivitás feltétele, az S1 szubsztrát-kötőhely csak a dimerben nyeri el a szükséges szerkezetét. Az enzim(család) nem rendelkezik ismert emberi homológgal, így antivirális szerek specifikus célpontja lehet. Az M<sup>pro</sup> a szubsztrát P1 helyén Gln aminosavra specifikus, jellemző hasítóhelyei LQ[SAG] szekvenciák. Az ellene fejlesztett inhibitorok jelentős része ún. „öngyilkos”, a katalitikus ciszteinnel kovalens kötést létesítő peptidanalóg, melynek P1 pozíciójában a szubsztrát Gln oldallánc amidcsoportját egy azzal analóg laktám gyűrű helyettesíti [14, 15] (3. ábra). A SARS-CoV-2 fehérjéinek PDB-ben május 27-én elérhető 214 szerkezetéből mintegy 140-et tesznek ki a fő proteáz és annak különböző inhibitorokkal meghatározott komplexei. Természetesen az inhibitorok tervezéséhez jó kiindulási alapot adnak a SARS-CoV fő proteáza ellen már vizsgált vegyületek. Érdekesség, hogy a SARS-CoV enzim esetében a dimerizációs interfészben lévő Thr285 aminosav alaninra történő mutációja a monomerek egymáshoz közelebb kerülését és a katalitikus aktivitás ( $k_{cat}/k_M$ ) több mint háromszoros növekedését eredményezi, ugyanakkor az ebben a pozícióban alanint tartalmazó SARS-CoV-2 enzim csak minimálisan, a mérési hibahatáron belül aktívabb a SARS-CoV proteáznál nagyobb aktivitást, és a két proteáz dimer disszociációs állandója is megegyezik [15].

### *Az RNS-dependens RNS-polimeráz és a replikáció*

A koronavírusok RNS-genomja közvetlenül működik mRNS-ként, további mRNS-ek templátjaként és másolódik le teljes hosszában az új vírusrészecskébe való csomagolódáshoz. Míg a transzlációhoz a vírus a sejt riboszómáit használja, a másik két folyamatot a saját maga által kódolt RNS-dependens RNS-polimeráz, pontosabban az ezt tartalmazó replikáz-transzkriptáz komplex végzi. Maga a polimeráz az nsp12 (non-structural protein 12) fehérje, de a minimálisan aktív enzim az ennek nsp7 és nsp8 fehérjékkel alkotott komplexe. Maga az nsp12 egy

ún. „jobbkezes” RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase) domént es egy N-terminális, a nidovírusok csoportjára jellemző, nukleotidiltranszferáz aktivitással rendelkező – de nem teljesen tisztázott szerepű – NiRAN domént tartalmaz, melyeket egy 115 aminosav hosszú „interfész domén” köt össze.



**4. ábra. Az RNS-dependens RNS-polimeráz komplex szerkezete.** A) A SARS-CoV-2 vírus aktív komplexének szerkezete. A komplex egy nsp12, egy nsp7 és két nsp8 molekulát tartalmaz, melyek közül az nsp7 és az egyik nsp8 egymással is kapcsolatban van. PDB kód: 6M71. B) A polimeráz komplex kétszálú (templát + szintetizálódó szál) RNS-t és a remdesivir nevű inhibitor is tartalmazó komplexe. PDB kód: 7BV2. C) a remdesivir a polimeráz aktív helyén, az épülő RNS-lánchoz utolsó nukleotidjaként kovalensen kötve. A térszerkezeti ábrák az UCSF Chimera programmal készültek.

Érdekes módon a SARS-CoV-2 polimeráz komplex jobb feloldású szerkezetet eredményezett, mint a SARS-CoV megfelelő komplexe, előbbiben a NiRAN domén korábban nem látott szerkezeti részletei is megfigyelhetők, ezen belül egy olyan hajtússzerkezettel, mely az RdRp „Palm” doménjével a már ismerteknél további stabilizáló kölcsönhatást biztosít [16]. A SARS-CoV polimerázban két, korábban nem megjósolt, de konzervált aminosavak által alkotott cinkion-kötő helyet sikerült azonosítani [17]. A szerkezet legfontosabb aspektusa a polimeráz



szubsztrátkötő helye, mely nukleotid analóg antivirális szerek tervezése szempontjából lényeges. A remdesivir nevű nukleotid analóg vírusellenes szerrel való komplex szerkezete, mely a templát szálat és az RNS primert is tartalmazza, szintén rendelkezésre áll [18].

A koronavírusok nagy genomja pontos replikációs mechanizmust igényel, ami első hallásra meglepő lehet egy olyan organizmus esetében, amelynél a gyors evolúciós adaptáció kifejezett előnyt jelenthet. A válasz abban rejlik, hogy a koronavírusok hatékonyan rekombinálódnak, egy sejten belül két különböző vírus is képes lehet erre, ilyen folyamatok szerepet játszhattak a SARS-CoV-2 létrejöttében is [19]. Érdekes módon az RNS-polimeráz proofreading mechanizmusaért felelős nsp14 exonukleáz egyidejűleg a rekombinációért is felelős lehet. Ugyanakkor maga az RNS-polimeráz is egy viszonylag nagy másolási pontosságot mutató enzim. A beépítendő szubsztrát nukleotid 2' és 3' hidroxilcsoportjai az enzim konzervált aminosavaival létesítenek hidrogénkötéseket. Az egyes antivirális szerek hatásának kiküszöbölésére létrejött, rokon vírusokban ismert mutációk pontos helyének és szerkezetre gyakorolt hatásának megismerése fontos eleme az új vírus ellen hatékony szerek kifejlesztésének.

### *Hogyan tovább?*

A SARS-CoV-2 vírus fehérjéi közül természetesen még továbbiak szerkezete is ismert, mint a már említett exonukleáz, vagy az nsp15 uridilát-specifikus endoribonukleáz, illetve a nukleokapszid fehérje stb. Nem ismert azonban az összes szerkezet és az összes fontos molekuláris mechanizmus sem, ide tartozik pl. egyebek mellett a koronavírusok ún. capping folyamata. A vírus által szintetizált mRNS-ek renedelkeznek a celluláris mRNS-ekre jellemző 5' guanozin „sapka” struktúrával, ami a hatékony transzlációhoz és az antivirális mechanizmusok kikerüléséhez is szükséges. Mivel a vírus RNS-ek a citoplazmában keletkeznek, a sejtmagi capping enzimekkel nem találkoznak, így a vírus nagyrészt saját fehérjéivel végzi el ezt a folyamatot. Ennek egyik lépéséről jelenleg még nem ismert, hogy melyik virális vagy esetleg gazdasejtbeli fehérje lehet felelős érte [20]. Természetesen a hasonló folyamatok jobb megismerése újabb terápiás támadáspontok azonosításához vezethet.

Végezetül a szerkezetekhez visszakanyarodva megemlíthető, hogy a koronavírus genom ismeretében a szerkezetpredikcióval foglalkozó kutatócsoportok is

aktívan foglalkoznak a vírusfehérjékkal. Az I-TASSER eljárást fejlesztő Yang Zhang csoportjának honlapján (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COVID-19/>) pl. teljes „galéria” található a legújabb, mélytanulós eljárásokat is integráló módszerükkel becsült vírusfehérje szerkezetekről.

Az új koronavírus kutatására összpontosított hatalmas erőfeszítések révén várhatóan már a közeljövőben számos további kérdésre választ kapunk, nem kis részben a fehérjeszerkezetkutatóknak köszönhetően.

### *Irodalomjegyzék*

- [1] Scudellari, M. (2020) Coronavirus piece by piece. *Nature*, **581**: 252-255.
- [2] Cyranoski, D. (2020) Profile of a killer virus. *Nature*, **581**: 22-25.
- [3] Dos Ramos, F., Carrasco, M., Doyle, T., Brierley, I. (2004) Programmed -1 ribosomal frameshifting in the SARS coronavirus. *Biochem Soc Trans*, **32**: 1081-1083.
- [4] Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu Rev Virol*, **2**: 265-288.
- [5] Song, W., Gui, M., Wang, X., Xiang, Y. (2018) Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PloS Pathog*, **14**: e1007236.
- [6] Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S., Goldsmith, J.A., Hsieh, C-L., Abiona, O., Graham, B.S., McLellan, J.S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, **367**: 1260-1263.
- [7] Walls, A.C., Park, Y-J., Tortorici, M.A., Wall, A., McGuire, A.T., Velesler, D. (2020) Structure, function and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, **181**: 281-292.
- [8] Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I., Holmes, E.C., Garry, R.F. (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*, **26**: 450-452.
- [9] Braun, E., Sauter, D. (2019) Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunol*, **8**: e1073.
- [10] Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, **181**: 271-280.
- [11] Walls, A.C., Tortorici, M.A., Snijder, J. Xiong, X., Bosch, B-J., Rey, F.A, Velesler, D. (2020) Tectonic conformational changes of a coronavirus spike

- glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **114**: 11157-11162.
- [12] Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Aurebach, A., Li, F. (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, **581**: 221-224.
- [13] Shu, M-F., Kuo, C-J., Chang, K-T., Chang, H-C., Chou, C-C., Ko, T-P., Shr, H-L., Chang, G-G., Wang, H-J., Liang, P-H. (2005) Mechanism of the maturation process of SARS-CoV 3CL protease. *J Biol Chem*, **280**: 31257-31266.
- [14] 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, L.W., Xu, W., Xiao, G., Qin, C., Shi, Z., Jiang, H., Rao, Z., Yang, H. (2020) Structure of M<sup>PRO</sup> from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2223-y.
- [15] 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  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science*, **368**: 409-412.
- [16] Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L.W., Wang, Q., Lou, Z., Rao, Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from OVID-19 virus. *Science*, **368**: 779-782.
- [17] Kirchdoerfer, R.N., Ward, A.B. (2019) Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun* **10**: 2342.
- [18] Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D-D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y-C., Tian, G., Jiang, H-W., Tao, S-C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Xu, H.E. (2020) Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, doi: 10.1126/science.abc1560.
- [19] Cagliani, R., Forni, D., Clerici, M., Sironi, M. (2020) Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, SARS-CoV-2. *J Virol*, **94**: e00411-20.
- [20] Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B., Imbert, I. (2014) Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res*, **194**: 90-99.



**Gáspári Zoltán** 1999-ben szerzett biológus diplomát az ELTE-n, majd ugyanott 2004-ben PhD fokozatot a Szerkezeti Biokémia program keretében Perczel András témavezetésével. 2011 óta a PPKE ITK munkatársa. Szakterülete a szerkezeti bioinformatika, különös tekintettel a fehérjék belső dinamikájának sokaság-alapú reprezentációjára. Az általa vezetett csoport jelenleg elsősorban a szinaptikus jelátvitelben résztvevő egyes fehérjék működésének kísérletes jellemzésével és modellezésével foglalkozik.

## A 3CL PROTEÁZ SZEREPE A KORONAVÍRUS FERTŐZÉSSEN

**Szilágyi László**  
**ELTE TTK, Biokémiai Tanszék**

### Összefoglalás

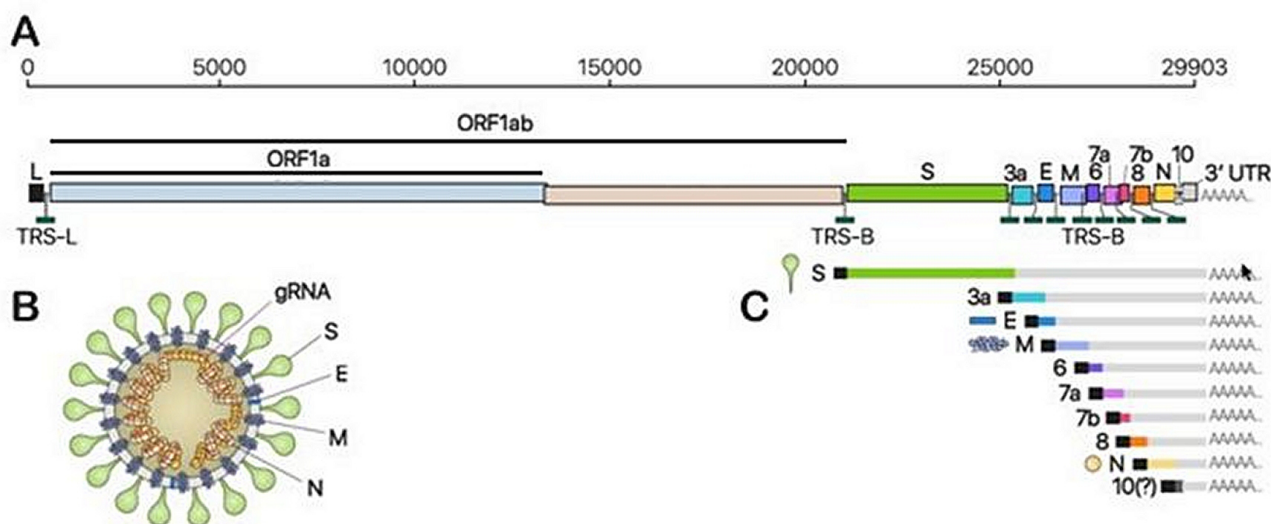
A koronavírus életciklusának a fertőzés szempontjából legkritikusabb lépéseiben – a sejtbe történő bejutásban, valamint a poliprotein feldarabolásában – döntő szerepet játszanak fehérje bontó enzimek, proteázok. Ebből következik, hogy a proteázok kiemelt jelentőségű célpontok a vírusellenes gyógyszerek 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 koronavírusot 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 fentiekén 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 genomális RNS egy vírusfehérjével komplexben helikális formában helyezkedik el az átlagosan 120 nm átmérőjű burookban, ami a gazdasejttől „kölcsonzött” 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.)

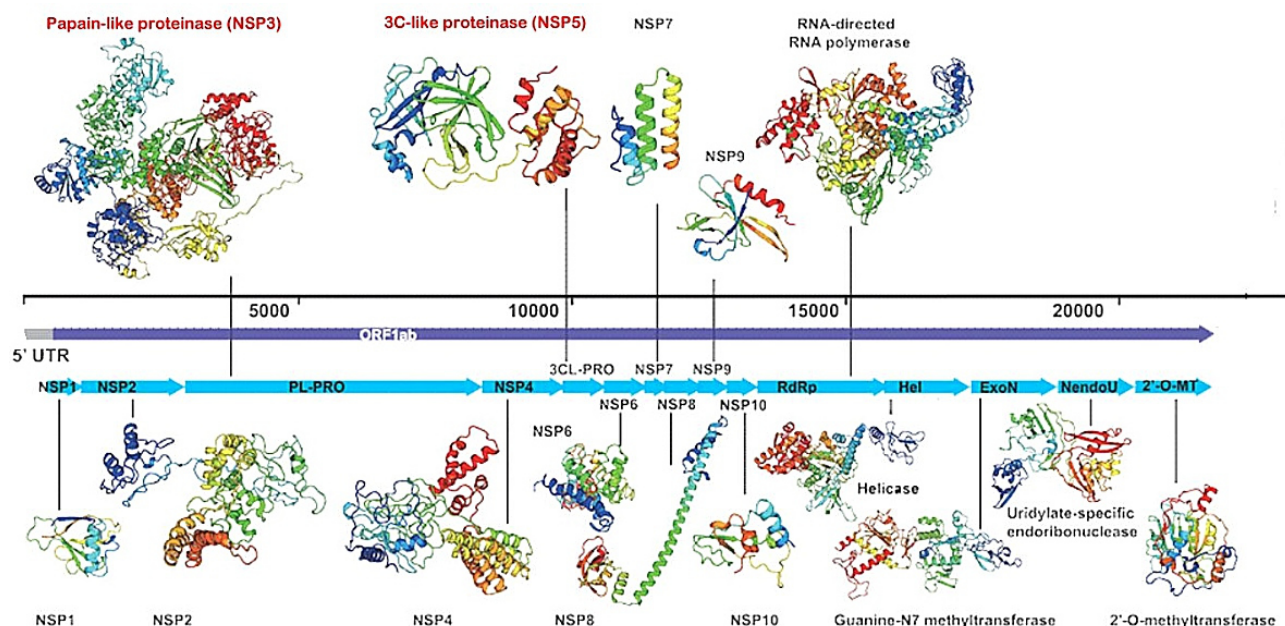
A proteolitikus processzálas eredményeként 16 nem-strukturális fehérje (*nsp*) keletkezik, a már említett két proteáz, az RNS replikációját végző RNS dependens RNS polimeráz (*RdRp*), és a replikáció, valamint a fertőző képesség szempontjából fontos enzimek és fehérjék. A további, strukturális vírusfehérjék 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<sup>pro</sup>*) és az *nsp5* 3C-szerű proteáz (*3CL<sup>pro</sup>*, más néven *M<sup>pro</sup>*). 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.



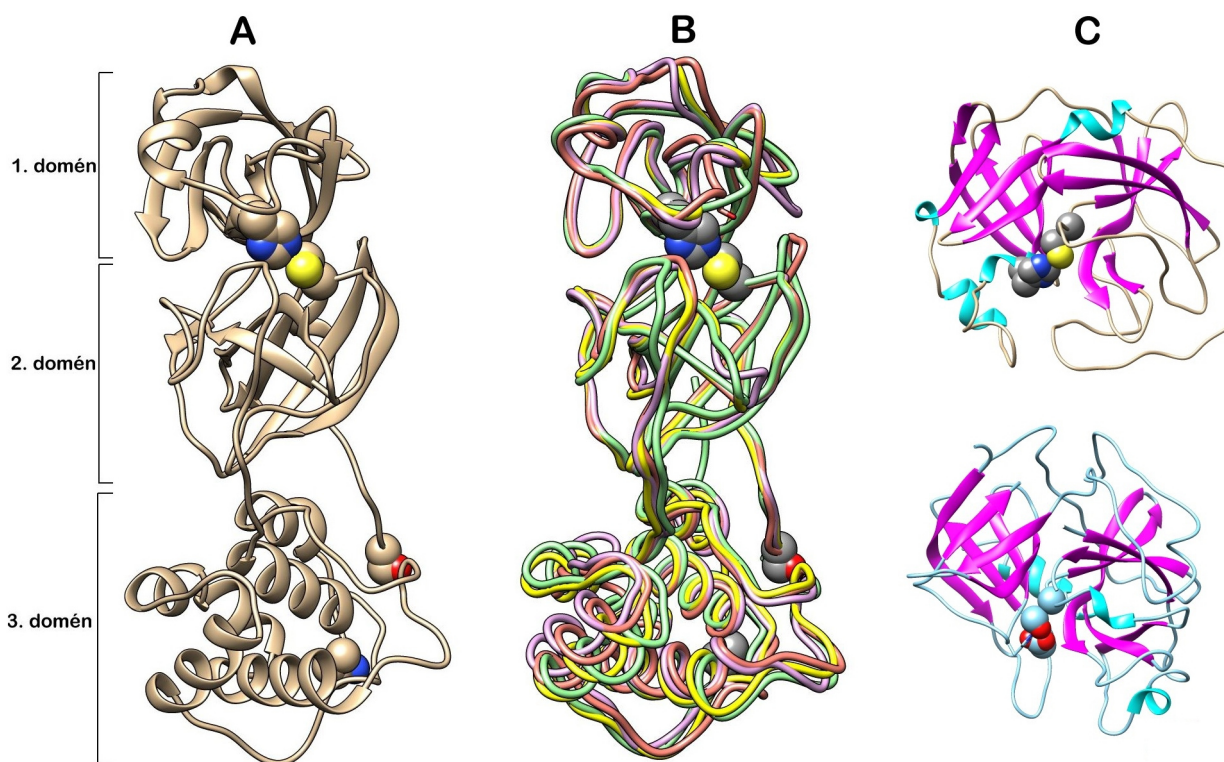
**2. ábra. A SARS-CoV-2 által kódolt pp1ab feldarabolása révén keletkező fehérjék annotációja és 3D modellje.** (Forrás: <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/COVID-19/>).

### A 3CL<sup>pro</sup> térszerkezete

A pikornavírusok körében általánosan előfordul egy kimotripszin-szerű feltekeredéssel rendelkező cisztein proteáz, melyet 3C-nek neveztek. A koronavírusokban ez a proteáz (3CL<sup>pro</sup>) 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 antiparalel  $\beta$ -redő, a kimotripszin családra jellemző elrendeződésben. A katalitikus

aminosavak (His41 és Cys145) a két domén között kialakuló szubsztrát kötő árok felé néznek. Az 5  $\alpha$  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<sup>pro</sup> enzimeinek térszerkezete megegyezik, még akkor is, ha viszonylag csekély közöttük a szekvencia azonosság (3. ábra, 1. táblázat).



**3. ábra. A 3CL<sup>pro</sup> térszerkezeti modellje.** A) A térszerkezeti domének elhelyezkedése (az egyszerűség kedvéért csak az egyik protomert mutatjuk). B) Az 1. táblázatban szereplő hat 3CL<sup>pro</sup> 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.

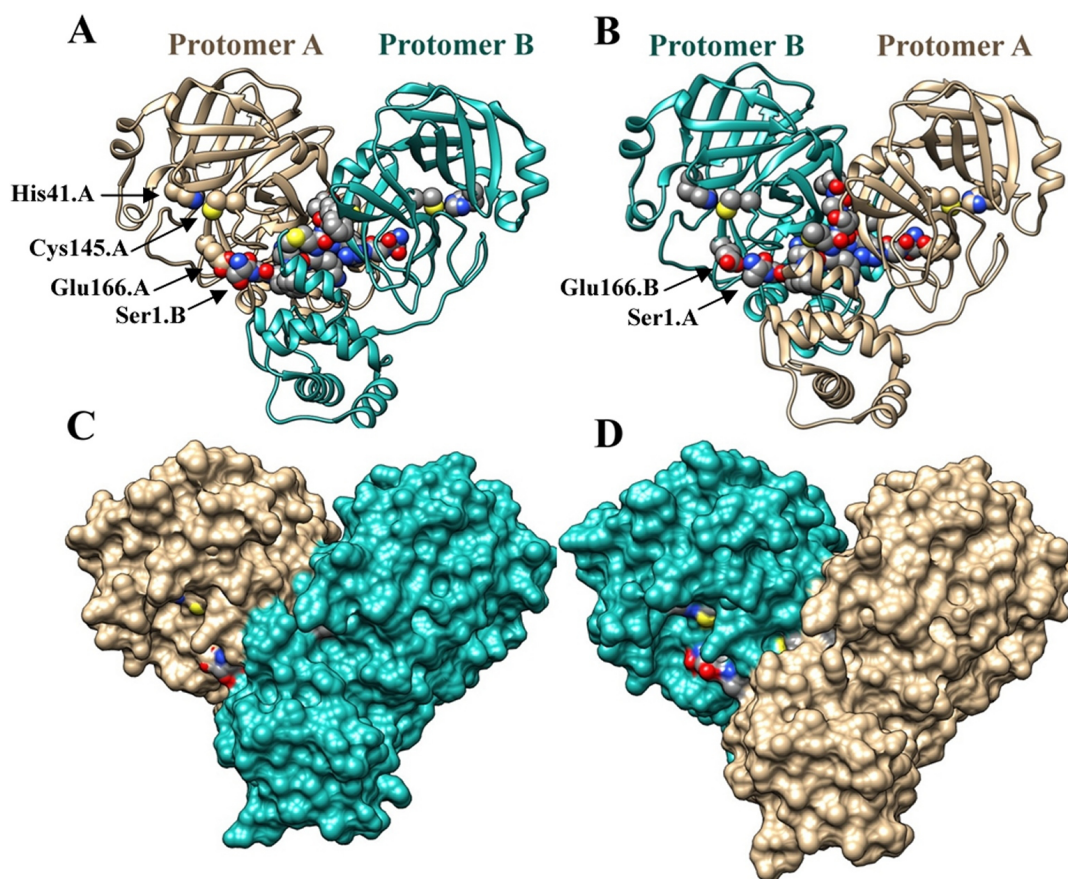
**1. táblázat. A 3. ábrán bemutatott enzimek szekvenciájának és térszerkezetének összehasonlítása**

A 3CL <sup>pro</sup> forrása	szekvencia azonosság	összes C $\alpha$ 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<sup>pro</sup> 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.

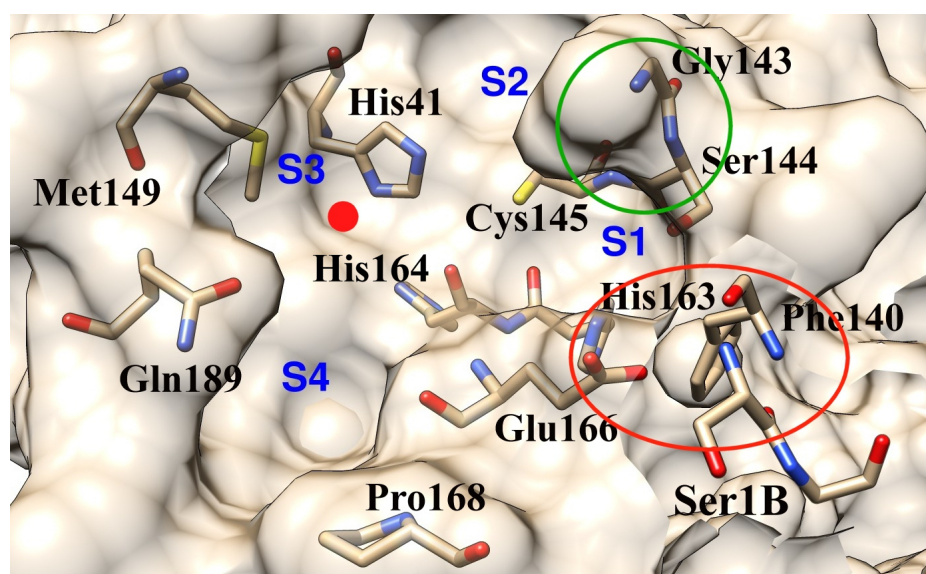


**4. ábra. Az N-finger elhelyezkedése a SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup> szerkezetében.** A) A dimer molekula szalagszerkezetében mindkét alegység N-terminális 7 aminosava térkitöltő modellként látszik. Szintén kiemelve a katalitikus diád (His41-Cys145) és a Glu166.A-Ser1.B sóhíd. B) A molekula „hátoldala” az y tengely mentén történt 180-os elforgatás után. C) és D) A fenti nézetek a VdW felszínek feltüntetését követően. (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  $\mu$ 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)

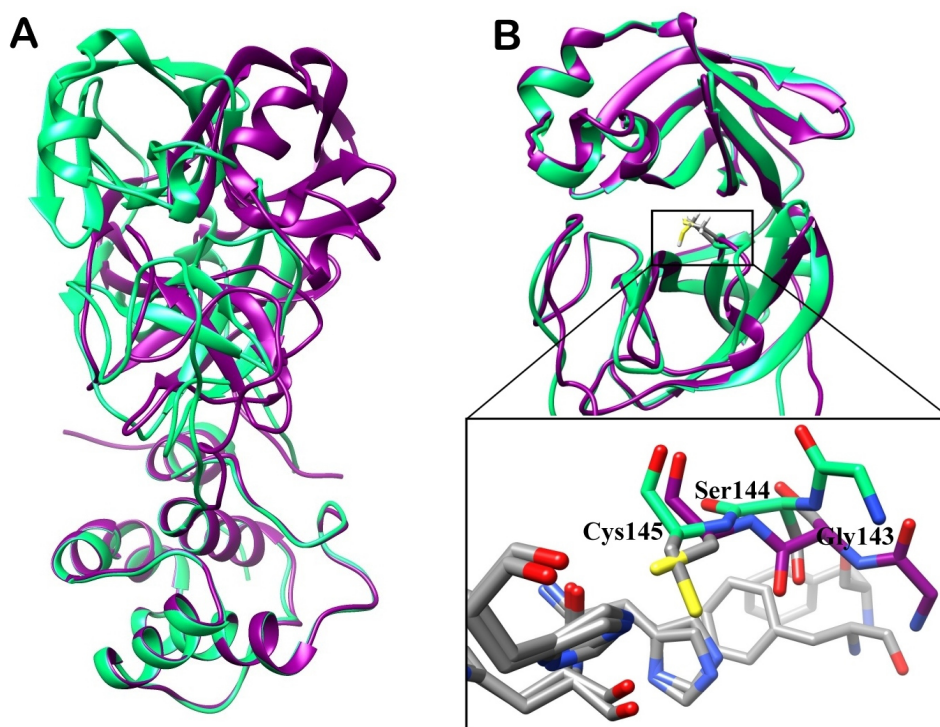
Az oxianion átmeneti termék stabilizálását a Gly143, Ser144 és Cys145 peptid amidok által alkotott oxianion hurok látja el. Ennek a huroknak megfelelő pozícióját szintén az N-finger inzerció által kiváltott szerkezeti átrendeződés biztosítja.

A korai vizsgálatok során a molekula harmadik, C-terminális helikális doménjét dimerizációs doménnek nevezték [7]. Az N-terminális 7 aminosav, vagyis az N-finger deléciónja 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  $\alpha$  hélix közül az első ( $\alpha 1$ ) kölcsönösen helyet cserél a két protomerben, szorosán illeszkedve a másik alegység szerkezetébe. A jelenség megfigyelhető volt a teljes 3CL<sup>pro</sup> molekula esetében is, és szuperaktív oktamerok kialakulásához vezetett [16]. Arra nincs adat, hogy ilyen szerkezetek fiziológiásan is előfordulnának.

Enzimkinetikai vizsgálatokból kiderült, hogy a 3CL<sup>pro</sup> specifikus aktivitása növekszik, ha a mérést töményebb enzimmel 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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> (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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> 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



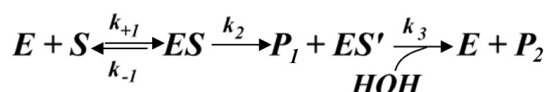
másikban az oxianion hurok torzult. Ilyen például a PDB ID 1UK2 szerkezet; SARS CoV 3CL<sup>pro</sup> pH 8,0 [24]. A két szerkezet molekuláris dinamikai vizsgálata szerint a különbség oldat fázisban is fennáll. A szerzők ebből arra következtettek, hogy a dimerben csak az egyik protomer aktív. Amennyiben 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

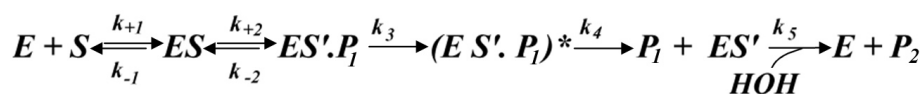
A cisztein proteázok katalitikus mechanizmusát a prototípusnak tekintett papain vizsgálata alapján ismerjük [25]. A papain aktív centrumát a Cys25-His 159 ionpár alkotja, melynek orientálását az Asn175 végzi. A papainra jellemző hidrolitikus reakció első lépésében, az acilezésben a negatív töltésű tiolát 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 reakójának modellje. Az 1. séma a minimális modell 3 lépéses 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<sup>pro</sup> 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 diádjá 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,  $\alpha,\beta$ -telítetlen észter, benzotriazol észter) tartalmazó inhibitor bekötése ( $k_i \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) mint egy ugyanolyan szekvenciájú peptid hasítása ( $k_{cat} \sim 3 \text{ s}^{-1}$ ) [31].

### *Szubsztrát specifitás*

A 3CL<sup>pro</sup> szubsztrát specifitásának ismerete alapvető fontosságú hatásos inhibitorok kifejlesztéséhez. Lai és mtsai. [32] meghatározták 3CL<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup>-1 N-terminális hasad el, ezt követi a 3CL<sup>pro</sup>-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<sup>pro</sup> relatív hatékonysága a poliprotein hasító helyeit reprezentáló 11 polipeptiden [32]**

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

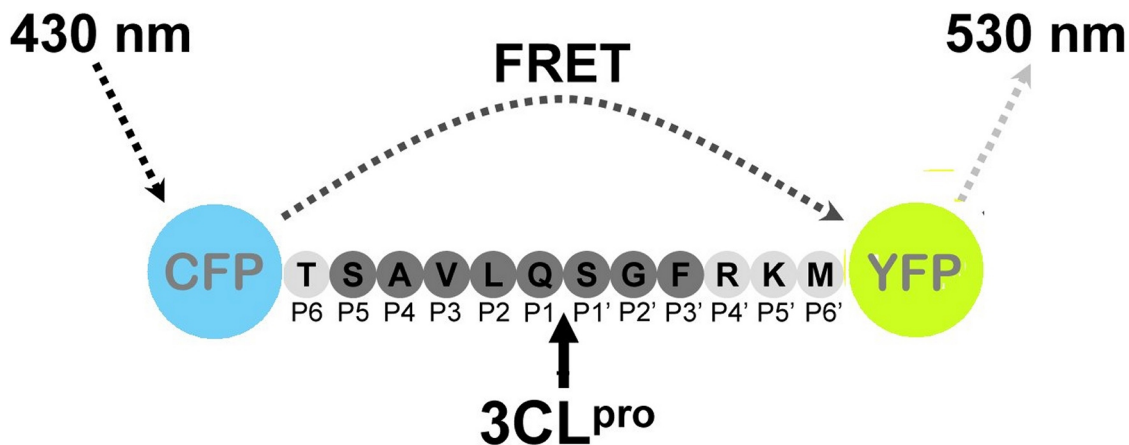
Az egyes fehérjék elhelyezkedése, illetve a rövidítések magyarázata leolvasható a 2. ábráról.

A különböző koronavírusokban a hasító helyek általában konzerváltak. Érdekes viszont, hogy a SARS-CoV-2 poliproteinben a 3CL<sup>pro</sup> C-terminálisán a szekvencia a következő: sgvtfq/**savkr**. A 9. ábra adatai alapján azonban ezekben a pozíciókban a hatékonyság kevéssé függ a szekvenciától. A SARS-CoV-1 3CL<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> szubsztrát specifitását a 8. ábrán látható molekulával tesztelték. A 3CL<sup>pro</sup> N-terminális hasítási szekvenciát reprezentáló 12 tagú polipeptid kapcsolja össze a cian 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 ( $k_{obs}/[3CL^{pro}]$ ).

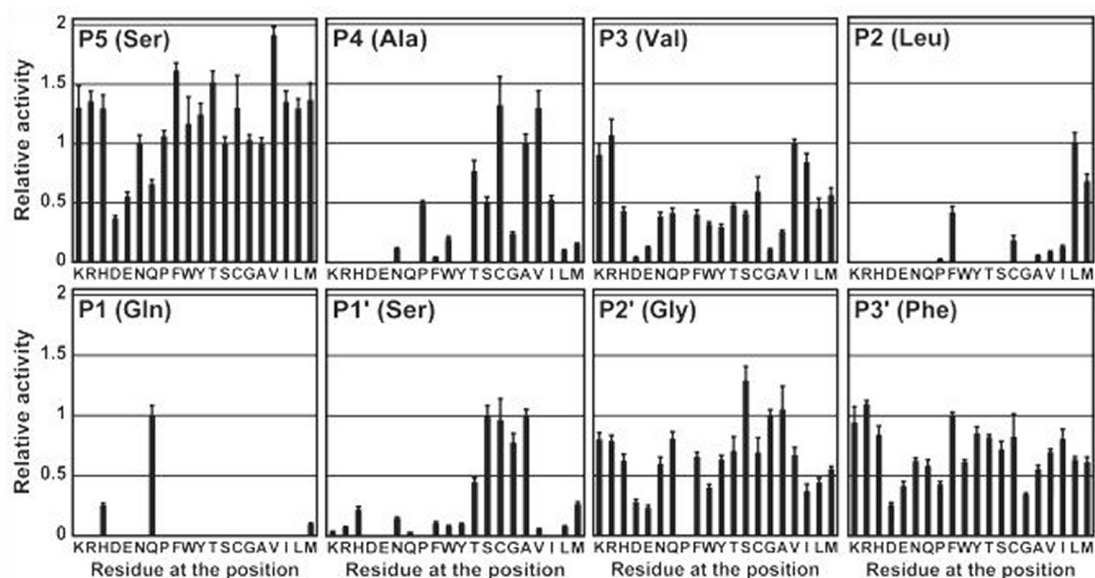
Az eredmények azt mutatják, hogy a P1 és P2 pozíció kivételével a többi helyen

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 könyvért 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 töltésűekkel 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<sup>pro</sup> specifikus aktivitása a P5-P3' pozíciókban.** Az értéket a vad típusú szekvenciában előforduló aminosavéra normálták [34].

Töltött aminosavak itt nem találhatóak, a kedvezőtlen deszolvatációs energia miatt. A P3 helyen a  $\beta$  lemezt kedvelő oldalláncok részesülnek előnyben, míg a P2 helyen a nagy méretű, de  $\beta$  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 Å<sup>3</sup> 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<sup>pro</sup> enzimmel nem készült, de a nagyfokú szekvencia azonosság alapján jelentős különbségek nem várhatóak.

### *Az érési folyamat*

Az izolált enzimen végzett aktivitás mérések alapján nem lehet egyértelműen következtetni a poliprotein érési folyamatának mechanizmusára. A poliproteinben a 3CL<sup>pro</sup> az nsp4 és az nsp6 között helyezkedik el. A tapasztalat azt mutatta, hogy ha a rekombináns vad típusú 3CL<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup>-10aa-GST (Trx-tioredoxin, GST-glutation S-transzferáz). A molekulát a vad típusú 3CL<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs”. Ennek az elvnek megfelelően számos olyan térszerkezetet oldottak meg, melyekben a 3CL<sup>pro</sup> kovalensen kötött inhibitorot tartalmazott. Az inhibitor elektrofil támadó csoportja klórmetil keton (CMK) [7, 8],  $\alpha$ - $\beta$  telitetlen 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 inhibitorot eltávolítva virtuális szűréssel nem-kovalens, erősen kötő molekulákat keressenek. Az első nem-kovalens inhibitor, amely SARS-CoV által fertőzött Vero E6 sejteken hatásosnak bizonyult ( $IC_{50}=1,5\pm 0,3 \mu M$ ), 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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> gátlásának köszönhető. A lopinavir/ritonavir kombináció viszont hatékonyan gátolja a HIV proteázt, de *in silico* analízis azt mutatja, hogy a 3CL<sup>pro</sup> katalitikus helyére is képes bekötni [46]. További vizsgálatok azt mutatták, hogy további két HIV proteáz inhibitor (indinavir és darunavir) képes a 3CL<sup>pro</sup> aktív centrumához kötődni [47]. Megjegyzendő hogy a HIV proteáz aszpartil proteáz, és a térszerkezete sem homológ a 3CL<sup>pro</sup> enzimével. Funkciójuk azonban hasonló, a HIV proteáz is poliproteint hasító enzim, bár felismerő szekvenciái [48] különböznek a 3CL<sup>pro</sup>-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<sup>pro</sup>) 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<sup>pro</sup>. *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<sup>pro</sup>): 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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup>. *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<sup>pro</sup> 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  $\alpha$ -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 szerin proteázok mechanizmusát kutatta. 2007 és 2012 között részt vett az Sapia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csikszeredai Karán a Génsebészet szak megteremtésében.



## HARMADIK GENERÁCIÓS, NANOPÓRUS-ALAPÚ SZEKVENÁLÁSI TECHNOLÓGIA SZEREPE A MODERNKORI JÁRVÁNYOKBAN

**Tóth Gábor Endre, Kemenesi Gábor és Jakab Ferenc**  
**Pécsi Tudományegyetem**  
**Szentágotthai János Kutatóközpont**

A felbukkanó és újra felbukkanó fertőző betegségek vitathatatlanul növekvő és jelentős kihívást támasztanak az emberiség elé. A leginkább aktuális példa a jelenleg zajló új koronavírus (SARS-CoV-2) járvány, de a közelmúlt számos másik példával is szolgált. A járványok megjelenésének intenzitása az emberiség térnyerésével párhuzamosan növekszik. Számos gazdasági, egészségügyi vagy utazást érintő mellékhatás mellett a tudományos fejlesztések és kutatási irányok adaptációja is megfigyelhető.

Az első elterjedt és széles körben alkalmazott szekvenálási technológiát Frederick Sanger találta fel 1977-ben [1]. Ez a technika a Sanger szekvenálás néven vált ismertté, amely közel 30 évig volt egyeduralgoló és a mai napig használatban van. Előnyei közé tartozik, hogy olcsó, illetve hosszabb, akár 1000 bázispár hosszúságú DNS láncok bázissorrendje is meghatározható vele. Azonban az alkalmazott technológia sajátossága, hogy csak a kapillárisok számának növelésével lehet paralellé tenni, ami a fizikálisan hatalmas helyigény miatt korlátozott mértékben valósítható meg. A legnagyobb kapacitású Sanger elven működő szekvenáló 386 kapillárist tartalmaz, amely így hipotetikusán 386.000 bázis meghatározást képes elvégezni egy 3 órás futás alatt [2].

A Nanopórus szekvenálás a szekvenálási technikák harmadik generációjához tartozik, amit szoktak más néven hosszú leolvasási kerettel rendelkező szekvenálásnak is nevezni. A Nanopórus szekvenálás elvi háttere, hogy egy impermeábilis membrán elválaszt egymástól két elektrolit oldatot tartalmazó kamrát, melyeket csak a membránba ágyazott csatorna fehérvék (nanopórusok) kötnek össze. Elektromos potenciált előállítva a töltéssel rendelkező molekulák, mint a DNS, képesek ezeken a pórusokon áthaladni, miközben a róluk történő elvezetéssel mintegy nanométeres nagyságrendű Coulter számlálóként funkcionálnak. Az áthaladó bázisok megváltoztatják a pórusban található folyadék elektromos ellenállását és ennek eltérő a mértéke a négy bázis esetén (Adenin, Guanin, Citozin, Timin) [3]. Az ebből kapott jelet egy bázishívó

algoritmus alakítja nukleotid szekvenciává. A szekvenáló eszköz azon részét, ahol a szekvenálás fizikálisan történik, flow cell-nek nevezik. Itt található az impermeabilis membrán, illetve a beágyazott 2048 pórus (a valóságban ezeknek a száma nagyjából 1700-1800 funkcionáló pórust jelent, ami a gyártástechnológia pontatlanságából adódik). Ezek a pórusok képesek szimultán működni, így a szekvenálás optimális körülmények között képes akár több mint ezer egyedi DNS szál meghatározására is párhuzamosan. A pórusokon a nukleinsav szál áthaladási sebessége 30-75 bázispár/másodperc, és ha egy adott szál teljes hosszában áthaladt a póruson, akkor egy rövid regenerációs idő után alkalmas az újabb szál fogadására [4].

Az eddigi egyik leghosszabb nukleotid szál, amely egyben meghatározásra került, 2.272.580 bázis hosszúságú volt [5]. Egy Nanopórus szekvenálás futása addig folytatható, ameddig van olyan pórus, amely még képes a rajta áthaladó nukleotid szálról jelet továbbítani. Ez általánosan 72-96 órát jelent, ami alatt 15-30 milliárd bázist képes meghatározni (ennek jelentős részét az első 24 órában).

A kutatási fejlesztések egyik irányvonalát az újonnan felbukkanó fertőző betegségek hozták létre, melyek sok esetben fejlődő országokat érintettek. Ilyen kihívások leküzdésére több nagynevű egyetem (University of Edinburg, University of Birmingham, University of Cambridge, University of Oxford, KU Leuven) összefogásával létrehoztak egy ARTIC Network nevű projektet, amelynek jelmondata: „Valós idejű molekuláris epidemiológia a járványok kezelésére” (Real-time molecular epidemiology for outbreak response). Főbb céljuk, hogy olyan protokollokat fejlesszenek, amelyek gyorsak, költséghatékonyak, terepen is alkalmazhatók, illetve bárki számára könnyen kivitelezhetőek legyenek. Jelenleg 3 fő kutatási területen dolgoznak:

1, „Labor a bőröndben” (Lab-in-a-suitcase) - Ennek a keretében olyan kis áram, hálózat és helyigényű eszközöket fejlesztenek, amelyek egy kompakt, gyorsan felállítható és telepíthető laborhoz szükségesek.

2, Szekvenálási módszerek (Sequencing Methods) - Szekvenálási eljárások fejlesztése, amelyek rövid idő alatt, a kontamináció minimalizálásával szolgáltatnak szekvencia adatot, alkalmazhatóak terepen és könnyen adaptálhatóak különböző patogén vírusokra.

3, Bioinformatikai fejlesztések (Lab-on-an-SSD) - Bioinformatikai munkafolya-

matok optimalizálása úgy, hogy alkalmazhatóak kis számítási kapacitással (limited resources) rendelkező felhasználók számára is.

A nanopórus-alapú szekvenálás első nagyléptékű bevetése a nyugat-afrikai Ebola-járvány kapcsán valósult meg. A betegmintákból megvalósított vírus-genom szekvenálás az addig ismert legtöbb genomszekvencia adattal meghatározott járvánnyá emelte. A technológia mobilitására és vírusos járványokban való bevetésére ez volt az első markáns példa [6].

A technológia hordozhatósága jól harmonizál a felbukkanó fertőző betegségek által támasztott egyik legfőbb kihívással, a laboratóriumi háttér nélküli régiók vizsgálati lehetőségeinek növelésével. Az előbbiekben tárgyalt Ebola-járványt követően egyre szélesebb körű felhasználási stratégia épült a technológia köré. Járványok során történő használata mára már nem kérdéses.

#### *Nanopórus-alapú szekvenálás a koronavírus-járvány kapcsán*

A 2019 novemberében megjelent SARS-CoV-2 vírus teljes genetikai állományának leírása hetekkel a vírus felbukkanása után megtörtént. Ez rendkívül hamar, már 2020 januárjában utat nyitott a Polimeráz Láncreakción (PCR) alapuló diagnosztikai paletta világszintű eléréséhez és a valós idejű genomi epidemiológia megalapozásához számos országban, amely jelenleg már az egész világról szolgáltat információkat. A MinION szekvenálási technológiára adaptált ARTIC protokoll fejlesztése is ebben a hónapban történt meg, utat nyitva a nagy áteresztőképességű genomi szekvenálások felé. Az ARTIC protokoll lényege egy multiplex PCR előkészítési eljárás alapuló reakciósorozat, amely a virális genomot lefedő 98 ampilkont hoz létre nagy mennyiségben. Az így elkészült könyvtár a technológia által megkívánt további előkészítési folyamatot követően közvetlenül szekvenálásra kerül.

Az első SARS-CoV-2 genom adatai 2020. január 10-én váltak elérhetővé. Ugyanebben a hónapban az ARTIC protokoll publikációja is megtörtént egy publikus adatbázis hasábjain. Februárban már számos országban aktív genomi epidemiológiai vizsgálatok folytak, nagyrészt ezen technológiai eljárásokon alapulva. Márciusban több jelentős adatmennyiségű adatszolgáltatás is megtörtént, illetve elindult, főként az USA, Anglia, Franciaország, Új-Zéland, Hollandia, Spanyolország és Dél-Korea laboratóriumaiból, az előbbiekben ismertetett technológiai alapok mentén. A genomi epidemiológia fontosságát jól jelzi az a törekvés, amelyet Anglia vállalt magára, nevezetesen az összes

elérhető koronavírusos beteg vírusgenomjának szekvenálása, melyből június első hetéig több mint 20 ezer genom adata vált elérhetővé (Covid-19 genomics UK consortium - <https://www.cogconsortium.uk/>). Áprilisra több mint 40 országban folytak genomikai kutatások és szekvenálások a vírussal kapcsolatban.

A mára már világméretűvé duzzadó genomikai törekvések hatására június 4-ig több mint 37 ezer teljes virális genomadat vált elérhetővé a GISAID adatbázisban (<https://www.gisaid.org/>), melyből a <https://nextstrain.org/> adatbázis valós-idejű elemzéseket közöl. Hatalmas, soha nem látott eredmény ez, melyet a világ több száz kutatóhelyének aktív munkája tett lehetővé. A Nanopórus-alapú szekvenálás térnyerése vitathatatlan, vírusgenomikai felhasználása pedig egy újabb markáns példával bővült a jelenlegi Covid-19 járvány kapcsán.



**1. ábra. SARS-CoV-2 szekvenálása MinION technológiával a Pécsi Tudományegyetem Szentágotthai János Kutatóközpont Virologiai Laboratóriumában.** A felszerelés mobilitását szemlélteti a mellékelt kép. A képen egy valós-idejű bioinformatikai eljárás fut (Rampart), amely a szekvenálással párhuzamosan nyújt információt a szekvenálás hatékonyságáról és alkalmas a vírus teljes genetikai állományának meghatározására akár egy órán belül.

Magyarország a közép-kelet európai régióban elsőként szolgáltatott genomikai adatokat az új vírus kapcsán 2020. március 24-én. A vírusgenom szekvenálása kutatócsoportunk koordinálásával és aktív részvételével a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai Kutatóközpont több csoportjának együttműködésével valósult meg. A kezdeti törekvéseket követően további vírusgenomikai minták meghatározásával felvázoltuk a hazai járvány kezdeti mechanizmusait, a vírus geográfiai és időbeli terjedési potenciálját, illetve világméretű genomikai alapú hálózati elemzését is [7]. Genomszekvenálási törekvéseink azóta is folyamatosak, abszolút mértékben a Nanopórus-alapú szekvenálási technológiára alapozva létrehoztunk egy nagy áteresztésű szekvenálási kapacitással ellátott laboratóriumot, mellyel a járvánnyal kapcsolatos gyógyszerfejlesztési törekvéseinket támogatjuk. A laboratóriumot jelenleg a járvány első hazai hullámának megértéséhez is használjuk, további vírusgenom adatok szekvenciaelemzésével. Kutatócsoportunk jelenleg aktív fejlesztési tevékenységet is folytat az ARTIC-technológia további virológiai célzatú felhasználására vonatkozóan.

#### Irodalomjegyzék

- [1] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74(12)**: 5463-5467.
- [2] Adams, Jill U. (2008). DNA Sequencing Technologies. *Nature Education*, **1(1)**: 193.
- [3] Huang, S. (2014) Nanopore-based sensing devices and applications to genome sequencing: a brief history and the missing pieces. *Chinese Science Bulletin*, **59**: 4918–4928.
- [4] Lu, H., Giordano, F., Ning, Z. (2016) Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **14**: 265-279.
- [5] Payne, A., Holmes, N., Rakyan, V., Loose, M. (2018) Whale watching with BulkVis: A graphical viewer for Oxford Nanopore bulk fast5 files. *bioRxiv* 2018.05.03. 312256.
- [6] Quick, J., Loman, N., Duraffour, S. *et al.* (2016) Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, **530**: 228–232.
- [7] Kemenesi, G., Zeghibib, S., Somogyi, B., Tóth, G., és mtsai. (2020) Multiple SARS-CoV-2 introductions shaped the early outbreak in Central Eastern Europe: comparing Hungarian data to a worldwide sequence data-matrix. *bioRxiv* 2020.05.06.080119.





**Tóth Gábor Endre**, doktorandusz, biológus. A felbukkanó fertőző betegségek témakörben végez úttörő kutatásokat, kiemelten a denevérekben található ismert és eddig ismeretlen kórokozók vizsgálatával. Egyik fő vizsgálati területe a vírusok új megoldásokkal történő genetikai karakterizálása.



**Kemenesi Gábor**, Junior Prima Díjas biológus, víruskutató, a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának adjunktusa. Tudományos munkásságáért Bolyai János Ösztöndíjban és a PTE Szentágothai Junior Díjában részesült. A felbukkanó és újra felbukkanó fertőző betegségeket kutatja, ízeltlábú vektorok és denevérek viszonylatában.



**Jakab Ferenc**, virológus professzor, egyetemi tanár. Jelenleg a Nemzeti Virologiai Laboratórium és az országos Koronavírus Kutatási Akciócsoport vezetője. A Szentágothai Kutatóközpont BSL-4 (4-es biobiztonsági szintű laboratórium) laboratórium vezetője, ahol számos, az emberiség számára jelenleg kihívást támasztó magas patogenitású vírussal folynak kutatások.

## ÚJRAPOZÍCIONÁLT GYÓGYSZEREK ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI COVID-19 FERTŐZÉSBEN

**Keserű György Miklós**

**Természettudományi Kutatóközpont, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport  
Magyar Koronavírus Kutatási Akciócsoport**

A kínai Wuhanból induló Covid-19 járványt okozó SARS-CoV-2 koronavírus terjedésében meghatározó szerepet játszott a cseppfertőzéssel történő terjedés, a hosszú lappangási idő és a vírus hosszú életképessége. A gyors terjedés egyidejűleg jelentős terhelést okozott az egészségügyi ellátó rendszeren, és számos olyan intézkedést tett szükségessé, amely egyrészt a terjedés, a kibontakozás és az érintettség hatásainak mérséklésére irányult. Ilyenek voltak az utazási korlátozások, a védőeszközök használata, a fertőtlenítés előírása, a szociális távolságtartás stratégiája, az ellátó rendszer technikai felkészítése, valamint a különböző terápiás protokollok kidolgozása, illetve a meginduló vakcina fejlesztés. E lehetőségek mellett már a járvány korai szakaszában többféle terápiás lehetőség merült fel, amelyek alkalmazásához legalább öt különböző stratégia állhat rendelkezésre. Megpróbálkozhatunk új gyógyszer kifejlesztésével, amelyet kezelésre vagy megelőzésre használhatunk, de elindultak az új vakcina kifejlesztésére irányuló kísérletek is, sőt egy korábban már bevált stratégiaként jött szóba a fertőzöttek plazmájának alkalmazása. Mindezek mellett megpróbálkozhatunk meglévő gyógyszerek indikáción kívüli, úgynevezett „off-label” alkalmazásával, valamint meglévő gyógyszerek indikáció kiterjesztésével is.

A gyakorlatilag az egész világon elterjedt és egyre inkább kibontakozó Covid-19 járvány szinte minden lehetőséget megmozgatott. Így nem meglepő, hogy május végére mintegy 1260 különböző gyógyszerészeti megoldás klinikai vizsgálata volt folyamatban. Figyelembe véve az új gyógyszerek és vakcinák kifejlesztéséhez szükséges időt és erőforrásokat, a fokozatosan felfutó klinikai vizsgálatok jelentős része meglévő gyógyszerek Covid-19 fertőzésben történő alkalmazására irányult. A gyors reagálás szükségessége és igénye a klinikai vizsgálatok szabályozási környezetét is érintette, és egyaránt vonatkozott az indikáción kívüli használatra és az indikáció kiterjesztésére is. Az indikáción kívüli használat alapesetben Magyarországon engedélyköteles, azonban az európai és amerikai gyakorlattal összhangban az Országos Gyógyszerészeti és Élelmszeregegészségügyi Intézet (OGYÉI) 2020. március 27-én ezen jelentősen könnyített. Az engedély előzetes kérelmezésének felfüggesztése lehetővé tette,

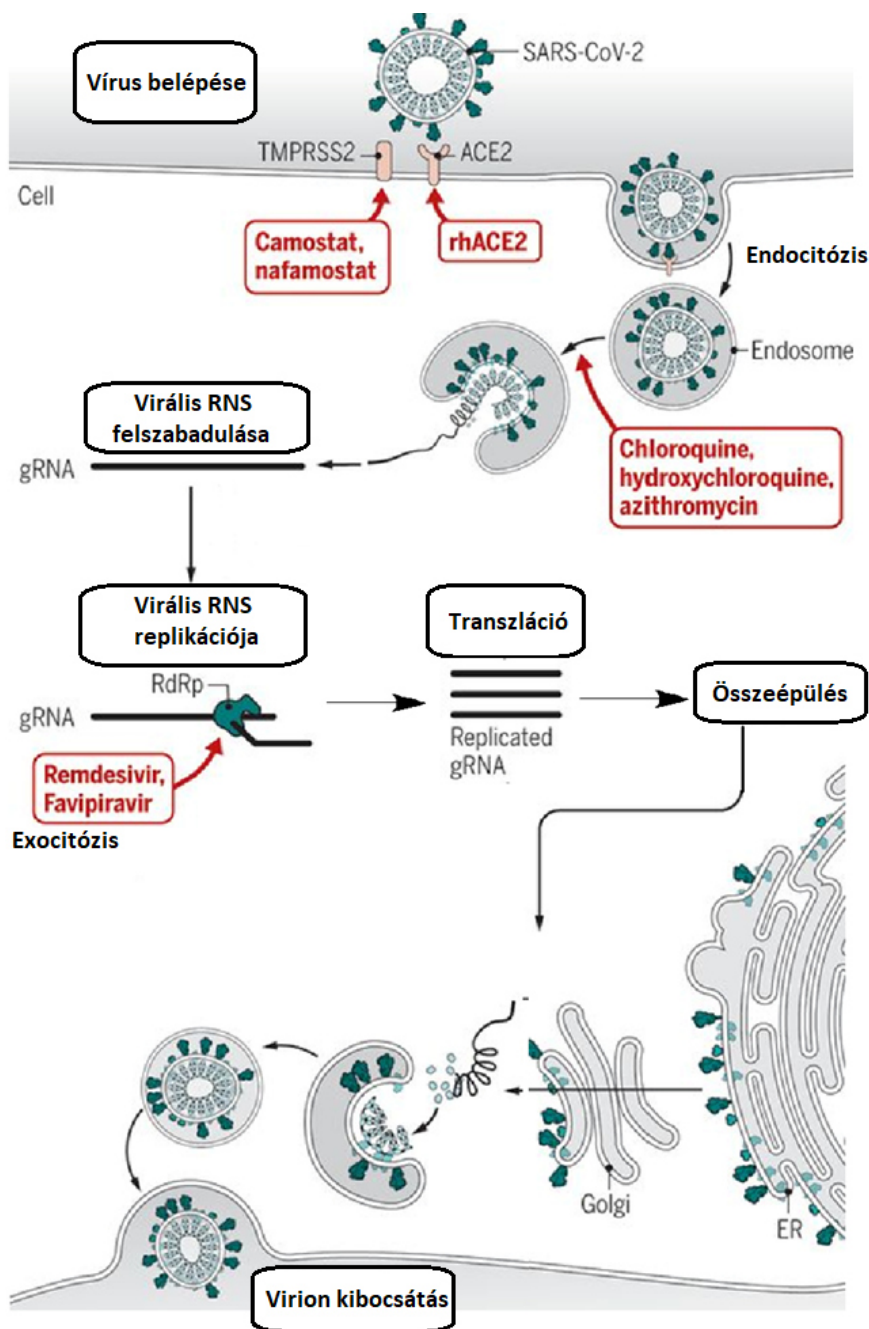
hogy olyan alapvető és a koronavírus terápiában felmerült gyógyszerkészítmények, mint a hidroxiklorokin, klorokin, remdesivir, lopinavir, ritonavir, ruxolitinib, azitromicin, oseltamivir, tocilizumab és a favipiravir, valamint további 9 szer használatához az ellátóhelyeknek nem kellett előzetes engedélyt kérni az OGYI-től. A már bevezetett gyógyszerek Covid-19 fertőzésben történő használatának másik lehetséges módja az indikáció kiterjesztése, amelyet újrapozicionálásnak nevezünk. Ez a fajta indikáció kiterjesztés azonban tudományosan megalapozott klinikai vizsgálatokhoz kötött. Ezeknek a vizsgálatoknak a lényege, hogy a korábban már igazolt indikáció mellett további indikációban, vagy indikációkban bizonyítsuk az adott gyógyszer hatékonyságát és biztonságosságát. A koronavírus-járvány hatására ebben is lépett az OGYÉI, és engedélyezte minden olyan fejlesztés alatt lévő gyógyszer indikációjának Covid-19 irányú kiterjesztését, amelyre legalább egy Fázis 1 klinikai vizsgálatot már lefolytattak, vagy ilyen vizsgálat már folyamatban van.

Az indikáció kiterjesztés lehetőségének feltérképezésére tudásalapú, tesztelés alapú vagy tervezés alapú megközelítéseket használhatunk. A tudásalapú megközelítés során a hasonló indikáció vagy a betegség hasonló patomechanizmusa, a hasonló klinikai tünetek, vagy a gyógyszer hasonló működési mechanizmusa alapján lehet már ismert gyógyszert javasolni egy adott betegségben. A tesztelés alapú megközelítés során nem ezt a hasonlóságot, hanem az adott indikációhoz rendelhető *in vitro* és/vagy *in vivo* betegségmodellekben tapasztalt hasonló hatékonyságot használják fel az újrapozicionálás lehetőségének felfedezéséhez. Végezetül alkalmazható tervezés alapú megközelítés is, amikor kiindulhatunk a betegséggel összefüggésbe hozható biomolekula, azaz a terápiás célpont szerkezetéből. Ekkor kereshetünk olyan gyógyszereket, amelyek hasonló szerkezetű és funkciójú célpontokon hatékonyak bizonyultak. Szintén felmerülhet az úgynevezett ligandum alapú megközelítés alkalmazása is, amelynek során az adott betegségben, vagy az adott tünetek kezelésében alkalmazott gyógyszer szerkezetéhez hasonló szerkezetű gyógyszert kísérhetünk meg újrapozicionálni.

Az újrapozicionálás során nagyon fontos a felfedezett lehetőségek validálása, amit elméleti módszerekkel, *in vitro* és *in vivo* modellekkel, illetve klinikai vizsgálatokkal tehetünk meg. Az elméleti módszerekkel történő validálásban használhatunk már rendelkezésre álló, az új indikáció szempontjából releváns adatkészleteket retrospektív validálásra, meta-análízisre vagy adatelemzésre. A biológiai validálás történhet sejtes tesztek vagy állatmodellek alkalmazásával.

Azonban az újrapozicionálás valódi próbái minden esetben azok a klinikai vizsgálatok, amelynek során a korábban már használt gyógyszer hatékonyságát az új indikációban, vagyis az új, gyógyítani kívánt betegségben szenvedő betegek kezelése során bizonyítjuk be.

Az újrapozicionálás lehetőségeit a Covid-19 fertőzéssel összefüggésben a vírus életciklusából kiindulva érdemes áttekinteni (1. ábra).



**1. ábra. Újrapozicionálási lehetőségek a SARS-Cov-2 koronavírus életciklusában (DOI: 10.1126/science.abb9332 alapján).**

A vírus endocitózissal jut be a gazdasejtbe, amit például az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) fehérje, illetve a sejtmembránban található transzmembrán szerin proteáz 2 (TMPRSS2) fehérje gátlásával lehet megakadályozni. Amikor a vírus már bejutott a gazdasejtbe, a következő lépés a virális RNS replikációja és átírása. Ebben a folyamatban helikázok és RNS-függő RNS polimerázok vesznek részt, amelyek szintén szóba jöhetnek lehetséges célpontként. Az életciklus következő lépése a transzláció és a megfelelő virális fehérjék létrehozása, amelyet leginkább proteázgátló vegyületekkel gátolhatunk. Végezetül elvi lehetőség kínálkozik a virion összerendezésének, illetve az új vírusok kibocsátásának a gátlására is.

A vírus gazdaszervezetbe történő bejutását alapvetően szerin proteáz inhibitorok segítségével kísérleték meg gátolni, amelyek közül a camostat-ot, illetve a nafamostat-ot érdemes megemlíteni. A Camostat 1985-ben Japánban került törzskönyvezésre, eredetileg hasnyálmirigygyulladás indikációban. Alkalmazása szerin proteáz gátló hatásának köszönhetően került fel Covid-19-el fertőzöttek kezelésére. Hasonló hatásmechanizmussal rendelkezik a nafamostat, amelyet 1999-ben, szintén Japánban törzskönyveztek. A virális RNS endoszomából történő kijutásában tulajdonítottak szerepet a klorokinnak, illetve a hidroxiklorokinnak. A klorokin egy 1934-ben Németországban felfedezett maláriaellenes gyógyszer, amelyet profilaxisban is használnak, míg hidroxiklorokint 1955-ben az Egyesült Államokban regisztrálták autoimmun gyulladások, illetve reumatoid arthritis kezelésére. E vegyületek esetében azonban többféle hatásmechanizmus is felmerült: elképzelhetőnek tartották például, hogy a virális RNS kijutásának gátlása az endo/lizoszóma pH változtatásával, vagy a közvetlen RNS kötődés miatt gátolt transzláció, vagy általánosabban a vírusfertőzés következményeképpen kialakuló gyulladásra hatva fejtik ki hatásukat. Bár a korai in vitro és in vivo vizsgálatok reményt keltőek voltak, a klinikai vizsgálatok e gyógyszerek hatékonyságát Covid-19 fertőzésben nem igazolták. A klorokin és a hidroxiklorokin ezért jó példa arra, hogy az újrapozicionálás sikerességét egyedül tudományos igényű klinikai vizsgálatokban lehet bizonyítani.

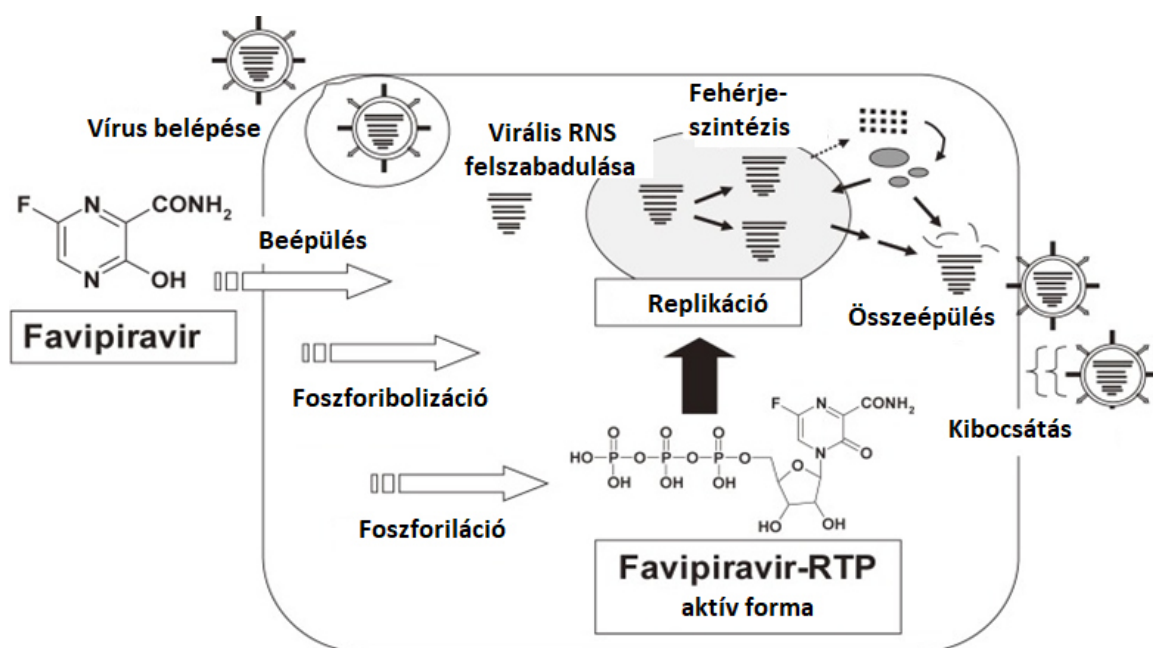
Az antivirális szerek egyik legfontosabb támadáspontja az RNS-függő RNS polimeráz, amelyre korábban több specifikus gátlószert is kifejlesztettek. Tekintettel arra, hogy a Covid-19 fertőzést okozó SARS-CoV-2 vírus az RNS vírusok családjába tartozik, a Covid-19 járványban leginkább ezeket a gyógyszereket, elsősorban a remdesivirt és a favipiravirt próbálták ki. A remdesivirt



2009-ben az Egyesült Államokban fejlesztették ki, alapvetően hepatitis C vírus, Marburg vírus, illetve ebola vírus okozta fertőzések ellen. A favipiravirt 2014-ben, az influenza A és B típusának kezelésére vezették be Japánban, azonban a vegyület alkalmasnak bizonyult a Nyugat-nílusi vírus és az ebola fertőzés kezelésénél is. Az antivirális terápia alkalmazása során tekintettel kell lenni a Covid-19 fertőzés két alapvető szakaszára, a virális, illetve a gyulladáson. Az antivirális készítmények elsősorban a betegség első, vírusfertőzés által meghatározott szakaszában alkalmazhatók sikerrel, a középsúlyos stádiumig. A gyulladáson az antivirális terápia önmagában általában már nem elegendő.

A Covid-19 járvány hazai terjedésével kutatócsoportunk a favipiravir antivirális készítmény fejlesztésével és vizsgálatával kezdett foglalkozni. A favipiravir egy széles spektrumú antivirális gyógyszer, amely számos RNS vírus ellen alkalmazható sikerrel. Ide tartoznak a sárgaláz vírus, a Dengue vírus, a Nyugat nílusi vírus, a korábbi SARS és MERS vírusok, az influenza vírusok, a Lassa láz, különböző hanta vírusok, az ebola, illetve a Sudan vírusok is.

A favipiravir valójában egy hamis nukleotid, hatásmechanizmusa alapján (2. ábra) a sejtbe jutva először foszforibolizálódik, majd foszforizálódik, így favipiravir ribotrifoszfát (RTP) képződik, amely a favipiravir aktív formája. Ez az aktív molekula azután a virális RNS-be beépülve ott egy hamis kódot okoz, amely ezáltal megakadályozza a vírus szaporodását.



**2. ábra. A favipiravir hatásmechanizmusa.**



Favipiravirral eddig két befejezett kínai klinikai vizsgálat történt. Az egyik esetben multicentrumos randomizált klinikai vizsgálat során kontrollként egy másik antivirális készítményt, arbidolt használtak. 116 beteget kezeltek favipiravirral, míg a kontroll csoportban 120 beteg volt. A vizsgálatok a betegség lefolyásának megfelelően a virális első szakaszra koncentráltak, súlyos esetek bevonására nem került sor. Mivel a vírusellenes szerek többségére (pl. influenza ellenes szerek, hepatitis C ellenes szerek) jellemző lehet a magzatkárosítást okozó mellékhatás, a vizsgálatokban és a favipiravir további alkalmazásaiban a terhesség kizáró ok. Fontos azonban megjegyezni, hogy az érintett népesség nem is tartozik a Covid-19 fertőzés elsőrendű kockázati csoportjai közé. Végpontként a klinikai felépülést, valamint a lázat és köhögést, ezeknek a változását határozták meg, és a vizsgálat eredményeképpen azt tapasztalták, hogy a favipiravirral kezelt csoportban a betegek mintegy 70%-a gyorsabb klinikai felépülést mutatott, és a tünetek is jelentősen enyhültek szemben a kontrollcsoporttal, ahol mintegy 55%-os volt a klinikai javulás. A favipiravir kezelés szignifikánsan csökkentette a láz és a köhögés idejét, lényeges mellékhatásokat nem okozott, a gasztrointesztinális tünetek mellett szérumsavemelkedést figyeltek meg, amely a betegek mintegy 13%-át érintette. A másik klinikai vizsgálat egy nehezebben értékelhető, nem randomizált, egy centrumos vizsgálat volt lényegesen kevesebb beteg bevonásával. Ebben az esetben a favipiravirral kezelt karba 45 beteg, a lopinavirral és ritonavirral kezelt kontroll karba kezelt 35 beteget vontak be. A vizsgálat elsődleges végpontja a vírusterhelés csökkenése volt, emellett egy szigorúan értékelt CT vizsgálattal nézték a tüdőgyulladás előrehaladását. Azt tapasztalták, hogy a vírus kiürüléséig eltelt napok száma a favipiravirral kezelt csoportban 4 nap, míg a kontrollcsoportban átlagosan 11 nap volt. A favipiravir kezelés hatására a mellkasi CT a betegek 92%-nak esetében szignifikánsan javult, míg a kontroll csoportban ez 62%-os volt. Hasonlóan az első vizsgálatához, itt sem tapasztaltak lényeges mellékhatásokat. A húgysav szint emelkedése ebben az esetben is megfigyelhető volt a betegek mintegy 11%-ában.

Az eddig nyilvánosságra hozott adatok ugyan biztatóak, de a favipiravir hatékonyságát és biztonságosságát a Covid-19 fertőzésben tudományos igényű klinikai vizsgálattal eddig még nem erősítették meg. Ezek a vizsgálatok alapvetően vészhelyzeti forgatókönyv alapján, „off label” alkalmazásra épülő vizsgálatok voltak, ráadásul az egyik esetben a randomizálás is elmaradt. Ezek alapján joggal merül fel, hogy a favipiravir hatékonyságát szigorúan kontrollált klinikai vizsgálatban kell bizonyítani. Ennek érdekében indult meg az Innovációs

és Technológiai Minisztérium támogatásával a magyar favipiravir fejlesztés, amelynek alapvetően három célja volt. Az első cél egy független hazai gyártás biztosítása a magyar Covid-19 betegek számára, második célja a már említett tudományos igényű klinikai vizsgálat, amellyel a hatékonyságot és a biztonságosságot tudjuk igazolni Covid-19 fertőzésben és egyben megalapozza a favipiravir újrapozicionálását influenza indikációból Covid-19 fertőzés kezelésére. Ennek érdekében két klinikai vizsgálatot készítettünk elő. Az első egy multicentrumos, placebo kontrollált, adaptív Fázis 2/Fázis 3 vizsgálat az általunk fejlesztett magyar favipiravir készítménnyel. A másik egy „open label” Fázis 3 referenciavizsgálat a japán Avigan készítménnyel, amelyet a japán kormány biztosított számunkra. Egy harmadik lehetséges cél lehet, hogy amennyiben a favipiravir hatékonysága és biztonságossága a Covid-19 fertőzésben igazolódik, akkor a gyártás felfuttatásával a favipiravir lehetséges exportcikk is lehet Magyarország számára.

Március végével összesen 3 projektet indítottunk el a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal finanszírozásában. Az első projekt a favipiravir gyártóeljárásának fejlesztését és a klinikai készítmény előállítását célozza, a konzorcium vezetője a Természettudományi Kutatóközpont. A második és harmadik projekt pedig a két klinikai vizsgálat megvalósítására irányul. A HUN-FAVI a magyar készítmény klinikai vizsgálatát célozza, a HUN-AVI pedig a japán Avigan készítmény vizsgálatához kapcsolódik. A klinikai programok a Pécsi Tudományegyetem konzorcium vezetésével valósulnak meg.

A magyar favipiravir fejlesztéssel kapcsolatos projektben elsődleges célunk egy klinikai vizsgálatra alkalmas gyógyszerkészítmény létrehozása. Az ehhez szükséges laboratóriumi eljárás kidolgozását a Természettudományi Kutatóközpont végezte. A méretnövelés az Első Indusztria Zrt.-nél történik. A félüzemi gyártóeljárás kidolgozását a Richter Gedeon Nyrt. vállalta, míg a gyógyszerkészítmény fejlesztését a Meritot Kft. végzi. A projekt sikeres megvalósításával rendelkezésre álló magyar favipiravir gyógyszerkészítmény, valamint a Japánból származó Avigan gyógyszerkészítmény klinikai vizsgálatát a klinikai vizsgálatok szervezésére és lebonyolítására létrejött HECRIN konzorcium végzi. A klinikai vizsgálóhelyek magukban foglalják a négy orvostudományi egyetem klinikai centrumait, valamint a Dél-Pesti Centrumkórház Országos Haematológiai és Infektológiai Intézetet, illetve az Országos Korányi Immunológiai Intézetet.

Egy hatóanyag előállítására szolgáló, a hatósági előírásoknak megfelelő félüzemi

gyártóeljárás kidolgozása normális körülmények között legalább egy évet vesz igénybe. Esetünkben a laboratóriumi eljárás kidolgozása 2020. április elején, míg a méretnövelés egy hónappal később indult el. Június első napjaiban pedig már a félüzemi gyártást is el tudtuk kezdeni. Mindehhez úrrá kellett lenni a szintetikus kémiai nehézségeken és a Covid-19 járvány okozta logisztikai problémákon. Mindezek miatt a favipiravir előállítására alkalmas eljárás kidolgozása viszonylag sok kihívással járt. Jól lehet a favipiravir szerkezete alapján viszonylag egyszerű molekula, szintézisének mégis sokféle stratégiával lehet nekiállni, így újabb kihívást jelent, hogy a lehető legrövidebb idő alatt a lehető legjobb szintézist kell megtalálni. Nehezítette a fejlesztést, hogy a nagy kereslet miatt szinte minden alapanyag hiánycikknek számított, ezért az alapanyagok beszerzésében jelentős segítséget kaptunk a kínai magyar külképviseletektől és a Külgazdasági és Külügyminisztérium által működtetett Covid Logisztikától. További kihívást okozott, hogy az eljárásfejlesztéssel párhuzamosan kellett megoldani a minőségbiztosításhoz elengedhetetlen analitikai módszerek kidolgozását is, amit a Természettudományi Kutatóközpont Műszercentruma végzett. Az itt kidolgozott analitikai módszerek nem csak a fejlesztési projekt szereplőit segítették, de hozzájárultak a Magyarországra érkezett favipiravir hatóanyagtartalmú gyógyszerkészítmények OGYÉI általi minőségbiztosításához.

Jelenleg a méretnövelés már a végéhez közelít, sőt az is elmondható, hogy a Richter Gedeon Nyrt. már megkezdte a hatóanyag félüzemi gyártását és a Meditop Kft. is felkészült a hatóanyagból történő készítményfejlesztésre. A klinikai vizsgálatok tekintetében a magyar készítmény várhatóan már a nyár folyamán rendelkezésre fog állni, és célunk, hogy a magyar gyógyszer-készítmény vizsgálatára szervezendő klinikai vizsgálat protokollját szintén még a nyár folyamán engedélyeztetni tudjuk. A japán Avigan gyógyszerkészítmény klinikai vizsgálatához szükséges protokollt a japán féllel folyamatosan egyeztetjük és még a nyár folyamán engedélyeztetjük. Minkét klinikai vizsgálat esetében az a célunk, hogy a gyógyszerkészítményeket a magyar betegek számára elérhetővé tegyük, ha a Covid-19 fertőzés esetleges második hulláma eléri Magyarországot. Amennyiben ezek a vizsgálatok sikeresen zárulnak, úgy a projektek nemcsak a magyar betegek gyógyulásához járulnak hozzá, hanem a nemzetközi közösség Covid-19 ellenes erőfeszítéseivel is. A magyar klinikai vizsgálatok mellett ugyanis még mintegy 20 különböző klinikai vizsgálat folyik, részben az Európai Unióban, az Egyesült Államokban, valamint Ázsia országaiban. A magyar vizsgálat része azoknak a nemzetközi erőfeszítésnek, amelyek célja,

hogy a favipiravir újrapozicionálásával egy új hatékony terápiás lehetőség álljon rendelkezésre a Covid betegek kezeléséhez.



**Keserű György Miklós** a PhD fokozat megszerzését követően kutatómunkáját előbb a Sanofi CHINOIN-ban, majd 1999-től a Richter Gedeon Nyrt.-ben folytatta. 2007-től 2012-ig a Richter originális kémiai kutatásáért felelős vezetője volt. 2013 és 2015 között az MTA Természet-tudományi Kutatóközpontjának volt főigazgatója, 2015-től a BME egyetemi tanára és a TTK Gyógyszerkémiai kutatócsoportjának vezetője. Összesen 11, emberi kipróbálásra került vegyület azonosításában vett részt, 21 szabadalomban szerepel feltalálóként. Hozzájárult az anti-pszichotikus hatású Cariprazine felfedezéséhez, amelyet az Európai Unióban és az Egyesült Államokban is engedélyeztek. A gyógyszerkémiai elért eredményeiért 2014-ben Overton-Meyer díjjal tüntették ki. 2016-ban a Royal Society of Chemistry 'Fellow' tagja lett. 2019-ben az MTA levelező tagjának választották.

## EGY COVID-19 PROJECT SZÜLETÉSE

**Ovádi Judit**  
**Természettudományi Kutatóközpont**  
**Enzimológiai Intézet, Budapest**

Miután megjelent egy összefoglaló cikkünk a Cells MDPI folyóiratban: Oláh et al. (2020) „Microtubule-Associated Proteins with Regulatory Functions by Day and Pathological Potency at Night” (doi:10.3390/cells9020357); szintén felkérésre egy kutatási cikket küldtünk be közlésre, mellyel kapcsolatban a következő válasz érkezett 2020. március 13-án Frankie Yang, Section Managing Editor-tól:

*Dear Professor Ovádi,*

*Thanks again for your submission (cells-758001) „Hindrance of Proteolytic Degradation of Alpha-Synuclein Complexed with TPPP/p25 Related to Parkinsonism”. On behalf of Editorial Board Members, I would like to take this opportunity to ask if you are interested in Guest Editing a Special Issue related to „Microtubule” or other topic related to your research interest (describing some details).*

Ez éppen a koronavírus felbukkanásának időpontjában volt (március közepe); a pandémia felmerülésének félelme, az akkori állapotok készítettek arra, hogy felkutassam a koronavírus vélt/remélt kapcsolatát kutatási területünkkel. A kutatás pozitív eredményét tükrözi a projekt címe: **„Challenging to Evolve the Impact for the Connection of Coronavirus and the Cytoskeleton Microtubule Network”**, melyet a folyóirat illetékesei érdekesnek (hot topic) találtak, így néhány napon belül a projekt kihirdetése megtörtént.

Kiemelendőnek tartom, hogy a számos ismert gyógyszermolekula rengetegének tesztelése mellett, az ismert anti-cancer molekulák vizsgálata különös figyelmet érdemelne, melynek részletei a rövid összefoglalóban is megjelennek (ezen javaslatomat Jakab doktornak, mint a Covid téma felelősének elküldtem).

**A projekthez csatlakozó kollégák kéziratának beküldését üdvözljük. A beküldéssel, elfogadással és publikálással kapcsolatos információk:**

[https://www.mdpi.com/journal/cells/special\\_issues/microtubule\\_COVID-19](https://www.mdpi.com/journal/cells/special_issues/microtubule_COVID-19)

**CELLS MDPI: Special Issue Information**

Dear Colleagues,

The sensing, integrating, and coordinating features of the eukaryotic cells are achieved by the significant contribution of the complex ultrastructural arrays of the cytoskeletal filamentous systems including the multifunctional microtubule network. The highly dynamic microtubule system, built from alpha- and beta-tubulin heterodimers, displays both physiological and pathological functions controlled by its decoration with posttranslational modifications and proteins/enzymes. Defects of these complex, highly controlled processes result in cell death and abnormalities leading to distinct diseases such as neurological disorders and cancer.

Recently the spreading of a new type of coronavirus, denoted COVID-19, has been reported. It results in a large number of infected individuals and leads to typically severe acute respiratory syndromes with significant mortality and economic impact. The coronaviruses interact with cytoskeleton filaments (i.e. microtubules and actin), which promotes their internalization into host cells, which is a critical step in viral pathogenesis; no approved vaccines and valuable therapies have been established so far.

The infection of the RNA coronaviruses has been described, involving the interaction of the cytoplasmic tail of the coronavirus spike protein with cytoskeletal proteins such as tubulin. The spike proteins mediate host-cell-attachment and virus entry. The microtubules are likely key players in the transport and assembly of spike proteins into virions during the coronavirus replication cycle. The VIRUS-VIRION transmission is a key phase of the infection. In fact, while the virus is a distinct biological entity, the virion is the infectious particle that is designed for transmission of the nucleic acid genome among host cells. This complex process remains elusive; however, the active involvement of the cytoskeleton in the hijacking of the cells infected by the viruses has been supported by the following observation: targeting of the cytoskeleton with tubulin inhibitors reduces the viral load. Thus, a potential treatment of coronavirus-infected individuals with anti-microtubule agents might be effective. A number of drugs applied in cancer therapy destruct the basic features of the microtubules: dynamism and stabilization. While the *vinca* alkaloids result in the disassembly of the microtubule network, paclitaxel stabilizes the microtubules causing the arrest of the chromosome segregation, which leads to the abolition of cell division. These issues are of high impact in chemotherapy medication; therefore, it could be hypothesized that agents with this or similar characteristics



may counteract the microtubule-derived virus infection/transmission.

The preparation of a Special Issue of *Cells*, related to the effect of coronaviruses at cellular level, is in progress. This Special Issue focuses, in addition, on the microtubule-derived coronavirus infections at molecular and atomic levels as well. These issues are supported by the recent data; namely, the virus has been isolated and its 3D structure has been determined.

At present, it is clear that the scientific world has been making significant efforts for the development/improvement of vaccines and therapeutic treatments of this human disease. This Special Issue could effectively contribute to the development of an anti-COVID-19 strategy by the identification and validation of specific drug targets as an initiative followed by the mapping of the interconnected region of the COVID-19 and microtubules. Although this project focuses on the microtubule system, its interconnection with the other filamentous systems of the cytoskeleton may influence its COVID-19-related functions. Potential topics of this Special Issue also include the structural and functional characterization of the assemblies of virus/virions with the cytoskeletal filaments as well as the selective influences of the assemblies, and the establishment of potential drug-like molecules.

*Prof. Judit Ovádi*  
*Guest Editor*

## A TOJÁS-VIRTUSTÓL A TOJÁSVÍRUSIG

**Gráf László**  
**ELTE TTK, Biokémiai Tanszék**

A 80-as évek elejétől szokásos családjunkban a tojás-virtus. Gyermekeinkkel, Lacival és Jennyvel vidám húsvétokat éltünk át. A program fénypontja a tojás-virtus volt. Nagycsütröktől kezdődően készültünk a keménytojások festésére és díszítésére. Magam vezettem ezeket a foglalkozásokat, melyek során az egyszerű festéseken túllépve egyre fantáziadúsabban dekorált tojásokat állítottunk elő. Egy ízben fémpénzekkel teleragasztott, máskor aprószegekkel sündisznósított tojások készültek, majd kristálycukorral hintettük meg a ragasztóval bekent tojások felszínét. Versengéssé fajult a játék, a legszemléletesebb tojás alkotója díjat nyert. Legnagyobb sikerem az a tojás volt, melyet frissen levágott szakállam szőrzetével egy kis szőrmók állattá, mint kiderült, denevérré alakítottam. Eszembe nem jutott, hogy ennek még következménye lehet.

Aztán felnőttek a gyermekeink és játékos kedvünk lelohadt egy időre. Ez év márciusában azonban újra éledt. Fiunk gyermekei, Blanka és Lelle játékos korba kerültek, és Laci fiunk felélesztette az egy generációval korábbi tojás-virtust. Hármásban összeállították az év tojását, a tojásvírust. Ezt kaptam locsoló-tojásként. Szerencsére vak tojás volt.



## LOCKDOWN, AVAGY HOGYAN LETTEM HÁZTARTÁSBELI

**Bay Péter**  
**Debreceni Egyetem, AOK, Orvosi Vegytani Intézet**

Március 11-én délelőtt kérdeztek meg a kollegáim arról, hogy tényleg bezárják-e az egyetemet és velük mi lesz: munka, szabadság, fizetés? Mire itt tartottunk, Olaszországban már javában tombolt a járvány és kifeszült az egészségügy. A meglepő kérdést leültünk megbeszélni egy rögtönzött laborgyűlésen, hiszen a hallgatók kitiltása miatt hirtelen „rengeteg” időnk lett kutatni, de más országokból kiindulva, kijárási tilalom és leállítás is várható volt később, ami komoly dilemmát okozott. Megbeszéltük, hogy milyen elvek mentén tervezzünk kísérleteket, illetve ha szükséges és leállunk, akkor hogyan kell leállni (fertőzésveszélyes anyagok, sejtek, egerek, hosszú távú kísérletek, fogyóeszközök allokálása és az ehhez hasonló problémák). Mindenkivel átnéztük, hogy milyen feladatot tudnak majd otthonról végezni, kezdtük szokni a home office fogalmát. Lelassultunk.

A következő héten bezártak az iskolák és óvodák. Három fiú apukájaként hazahoztam a fiúk dolgait és berendezkedtünk az otthonról tanulásra. Aki csinálta, megerősítheti, hogy érték meglepetések az embert, de pár nap alatt hozzászoktunk. Az iskolai feladatokat gyakran tarkította telefoncsörgés, mert a labor is menet közben állt át. Próbáltam segíteni egy itt élő, angol anyanyelvű kollégát, hogy jobban kiismerje magát a mindannyiunk számára ismeretlen helyzetben. Az egyetemi ügyintézésben új iratkezelési rendszer állt fel, ami kevesebb személyes kontaktust igényelt. Az egyetemen minden feladathoz két helyettest kértek, így lettem az intézetvezető egyik helyettese – és örülök neki, hogy nem volt szükség rá, hogy helyettesítsek. Én is kineveztem a saját helyetteseimet és ez haladt előre addig, amíg az állatházi gondozóknak is lett két helyettesük. Készült terv arra is, mi történjen az állatállománnyal, ha ellátási zavarok lépnek fel. Az intézetben ügyeleti rendet alakítottunk ki.

Elkezdődött az egyetemi oktatás online formára átállítása is. Szerencsére a Debreceni Egyetem e-learning felülete jó alap volt ehhez. Lehetőségként felmerült, hogy az előadásokat élőben meg lehet tartani Zoom-on abban az időpontban, amikor az előadás ki volt írva, vagy elő tudjuk narrálni. Az elő narrálást választottam, a járvány elején nem lehetett előre kiszámítani, hogy fog lezajlani a járvány: nem kerülünk-e karanténba, leszünk bármiért akadályoztatva vagy egyszerűen a gyerekeket kell felügyelni. Számomra nagyon

furcsa érzés volt egy mikrofonnak beszélni, hiányoltam a hallgatóságot, nem tudtam alkalmazkodni az igényeikhez. A kollégák egy jó része az élő Zoom előadás mellett döntött. A szemináriumok élőben zajlottak, sőt, a hallgatók kérésére, a szemináriumok lebonyolításához két oktatóra lett szükség, egyikük „vitte a showt”, beszélt, a másik oktató pedig a chat ablakban beérkező kérdéseket válaszolta meg. A gyakorlatokat, ha lehetséges volt, demonstrációként online bemutatták vagy elhalasztották. Az orvosi egyetemek felsőbb évfolyamain komoly kérdésként merült fel, hogy lehet majd pótolni a hallgató-beteg találkozásokat igénylő gyakorlatokat. A járvány kezdetén nehezen megválaszolható kérdés volt, milyen módon indulhat el majd a következő tanév a magyar és a külföldi hallgatók számára.

A kijárási korlátozások bevezetésekor a labor nedves kémiai munkájának döntő részét leállítottuk és életbe lépett az otthonról történő munka. Egyszerű egyeztetési feladatok is körülményessé váltak, email, telefon, Zoom. Mindezt úgy, hogy el tudjon bújni az ember a gyerekek elől, de így is rendszeresek voltak a megjelenő gyerekek a megbeszéléseken, vagy a szülők Tourette-szindrómája a telefonban. Mindezek ellenére több közleményt sikerült benyújtunk és ezek közül azóta néhányat már el is fogadtak. Nagyon büszke vagyok a gyors és megfeszített munkával elkészített „position paper” közleményünkre a PARP inhibitorok alkalmazhatóságáról Covid-19-ben a British Journal of Pharmacology-ban [1], amelyet Helyes Zsuzsa professzor asszonnyal (Pécsi Tudományegyetem) és brit kollégákkal együtt írtunk. Hatalmas élmény volt látni, ahogy a kutatók gyorsan és hatékonyan fognak össze a járvánnyal kapcsolatos kutatásokban, sőt, a folyóiratok is expressz kezelték a kéziratot. (A magyar Covid-19 közleményeket a <https://instantscience.hu/2020/04/29/covid-19-kutatas-magyarorszagon/> honlapon található.) Az első ijedség után pár héttel kis létszámban újraindult a nedves kémiai munka is, és az idő előrehaladtával szépen nőtt a dolgozók létszáma is.

Nemrég kezdtük megszervezni a nyári vizsgaidőszak történéseit, amihez a Tanulmányi és Vizsgaszabályzat mellett az Intézményi Védelmi Bizottság ajánlásait is figyelembe kell venni. A vizsgák során maszkot kell hordani, a szóbeli vizsgák során pedig plexifal kerül a vizsgáztató és a vizsgázó közé. A PhD hallgatók félidő vizsgájának a lebonyolítása is hasonlóan fog lezajlani.

Mindeközben zajlott az online oktatás az alapfokú és középfokú intézményekben. Én pedig itthon gondozom a gyerekeket, tanulok velük, a fennmaradó

időben pedig fejvesztve próbálok felnőni a kutatási és egyetemi feladatokhoz. A labor újra teljes üzemben működik, csak a laborgyűléseket tartjuk este, amikor a gyerekes kollégák is be tudnak jönni, mert van, aki vigyázzon a gyerekekre.

### Irodalomjegyzék

- [1] Curtin, N., Bányai, K., Thaventhiran, J., Le Quesne, J., Helyes, Z., Bai, P. (2020) Repositioning PARP Inhibitors for SARS-CoV-2 Infection (Covid-19); A New Multi-Pronged Therapy for ARDS? Br J Pharmacol, doi: 10.1111/bph.15137.



**Bay Péter** 2000-ben végzett a Debreceni Egyetemen biológus-biokémikusként. PhD fokozatát a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán szerezte Dr. Virág László témavezetésével, szabad gyök indukált károsodási modellek vizsgálatával. Posztdoktori időszakát Strasbouban töltötte az École Supérieure de Biotechnologie Strasbourg (ESBS) és az Institute de Génétique et de Biologie Moléculaire (IGBMC) intézetekben Gilbert de Murcia, Josiane Ménissier-de Murcia és Johan Auwerx irányításával. Itt kezdett el a poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek metabolikus szerepével foglalkozni. 2014 óta az MTA Lendület programjának résztvevője, azóta kutatási portfóliójának része a tumoros betegségek és a mikroflóra közti összefüggések vizsgálata. 2001-ben Pro Scientia emlékéremmel, 2015-ben Bolyai-plakettel, 2016-ban a Francia Köztársaság Akadémiai Pálmarendjének lovagi fokozatával tüntették ki. 2018 óta egyetemi tanár.



**A HOME OFFICE KÖZÖS/MEGOSZTOTT MAGÁNYA**

**Benyhe Sándor**  
**Szegedi Biológiai Kutatóközpont**  
**Biokémiai Intézet**

A Covid-19 felbukkanása szó szerint átírta legtöbbünk életét. Ez a rövid beszámoló egy korosodó kutató személyes tapasztalatain alapul. A megtisztelő felkérés elfogadását követően azon tűnődtem, vajon miről és mit is kellene írnom? Minta, azaz kiindulási pont több is akad: Dosztojevszkij *Feljegyzések az egérlyukból*, Daudet *Levelek a malomból*, Pósfai György *Tull úr intenzív élete*, vagy éppen elődünk, Elődi Pál *Levelek Tennessee-ből*. Csakhogy az ilyesmikhez *vena literata* kellenék, nekem pedig csupán krónikus visszértágulatom van.

A 2020-as év legnagyobb, egyben legaggasztóbb szenzációja volt a soknevű RNS vírus felbukkanása és gyors elterjedése. A Covid-19 (nevezik SARS-CoV 2-nek is) minden valószínűség szerint zoonózis útján fertőzte meg az embereket, nagyon gyorsan elterjedt és ijesztően magas morbiditást és mortalitást okozott. Noha kapcsolatba hozták kígyókkal és tobozskákkal is, de bebizonyosodott, hogy a vírusedzők denevérek.

Az SZBK vezetése időben döntött, még a kormányzati intézkedések megkezdése előtt korlátozta a hatvan éven felüli munkatársak belépését. Aztán a pandémia kihirdetése után további korlátozásokat kommunikáltak és vezettek be. A veszélyhelyzet életbe lépésével összhangban viszonylag gyorsan és zökkenőmentesen alakult ki az otthoni munkavégzés gyakorlata. A laboratóriumok sem álltak le, kollégáink megszervezték az izolált, de mindenképpen szükséges munkafeladatokat elvégzését (állatház, sejtkultúrák folyamatos fenntartása és egyéb, a minimális működéshez rendelhető tevékenység).

A Biokémiai Intézet heti rendszerű szemináriumi nem maradt el, hanem egy sikeres próba után online módon folytatódott csütörtökönként. A videokonferenciák lebonyolítására a Zoom platformot választottuk és jelenleg is használjuk annak ellenére, hogy menet közben adatvédelmi és biztonsági kifogások is felmerültek. Eseményenként úgy 60-70 személy csatlakozik, ami az intézet kutatói létszámát jól reprezentáló részvétel.

Vilmos Péter (SZBK, Genetika Intézet) a sajtóban is megjelent kezdeményezéséhez csatlakozva (<https://qubit.hu/2020/03/31/egy-pofonegyszeru-es->

[olcso-rutinmegoldással-napok-alatt-le-lehetne-tesztelni-a-teljes-magyar-nepesseget](#)) a Biokémiai Intézet két rendszerbiológusa, Kintses Bálint főmunkatárs és Tengölics Roland, továbbá egy molekuláris neurobiológus, Tóth Melinda kollégánk azon fáradoznak, hogy a koronavírus kutatási célból való qPCR alapú kimutatását precízebbé, elemszám-gazdagabbá, jól reprodukálhatóvá és végső soron egyszerűbbé tegyék.

Horváth Péter intézeti igazgatónk és csoportja (BIOMAG: Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport) elméleti és kísérletes megközelítések ötvözésével Covid-19 szerológiai teszt kifejlesztésén dolgozik a mesterséges intelligencia csatasorba állításával és egy-sejt mikroszkópia segítségével.

Ha már volt ötvözés az imént, akkor hozzáteszem, hogy munkacsoportom nyomógombos kémikusa Ötvös Ferenc *in silico* módszerekkel modellezi a pándémiát okozó SARS-CoV-2 koronavírus felismerő receptorok és számos létező gyógyszermolekula kölcsönhatásait, hátha a dokkolt ligandok valamelyike kompetitív antagonistának mutatkozna, így eredményesen gátolhatná a vírus-gazdasejt kötődést.

A Számítógépes Rendszerbiológia Csoportból (vezetője Papp Balázs) Ari Eszter bioinformatikus és evolúció biológus kollégánknak az éppen most fertőző koronavírus genomok filogenezisét elemzi, hogy rekonstruálhassuk a kórokozó vírus partikulumok térbeli és időbeli terjedését, valamint rokonsági viszonyait, illetve genetikai változékonyságát.

Nemcsak megértettük hogy milyen is a távmunka, hanem együtt éltünk és élünk vele. Elfogadtuk és működtetjük. PhD védések, komplex vizsgák, szemináriumok és intézeti tea (=igazgatói tájékoztatás) folytak és folynak webes csatornákon keresztül. A drótposta és a mobiltelefon tovább erősítette az elektronikus kommunikációt. Mehetett a cikkírás is, ezerrel. A kutatóközpont egészében és a Biokémiai Intézetben is az igazgatóktól kapott tájékoztatás alapján kijelenthetjük, hogy a karanténos-távmunkás periódusban a kutatói publikációs aktivitás nemhogy leállt volna, hanem „szárnyakat kapott”. Behálózott világunkban így működött a home office. Nem dőlhetünk azonban hátra, mert a vírus még közöttünk van, mondhatnók a Covid-19 élt, él, élni fog... Csak ne legyen áramszünet!

Főigazgatói rendelkezés értelmében június 2-án újraindulnak laboratóriumaink

és folytatódik a kutatómunka, bár bizonyos korlátozások a személyes kontaktusok lehetőség szerinti minimalizálása okán érvényben maradnak még egy ideig. Mit mondjak, már nagyon hiányzik a csoport, a labor, az intézet megszokott létezése. Az elővigyázatossági SZBK karanténnak egyelőre annyi. Ne is jöjjön újra! Legyen inkább JUK, így, pontos jével, azaz „júniusban újra kezdjük”.



**Benyhe Sándor** az SZBK Biokémiai Intézetének tudományos tanácsadója, az MTA doktora. Csoportvezető kutató a Neurobiológiai Egységben, az Opioid Receptor Csoportot irányítja. Érdeklődési területe a G-prótein kapcsolt receptorok változékonysága, az opioid és a kannabinoid receptorok heterogenitása, neurokémiaja és ligandkötő mintázataik tanulmányozása. Az utóbbi időben bifunkcionális receptor-ligandok kutatásfejlesztésével és a neuropeptidok evolúciós diverzitásának kérdéseivel foglalkozik. Részt vesz az International Narcotic Research Conference és az European Neuropeptide Club tudományos közösségek működésében. Az SZTE négy doktori iskolájában tevékenykedik, eddig kilenc PhD fokozatot szerzett doktorandusz témavezetője volt.

**FOTOAKTÍV FEHÉRJÉK KARANTÉN IDEJÉN**

**Lukács András**  
**Pécsi Tudományegyetem, ÁOK**  
**Biofizikai Intézet**

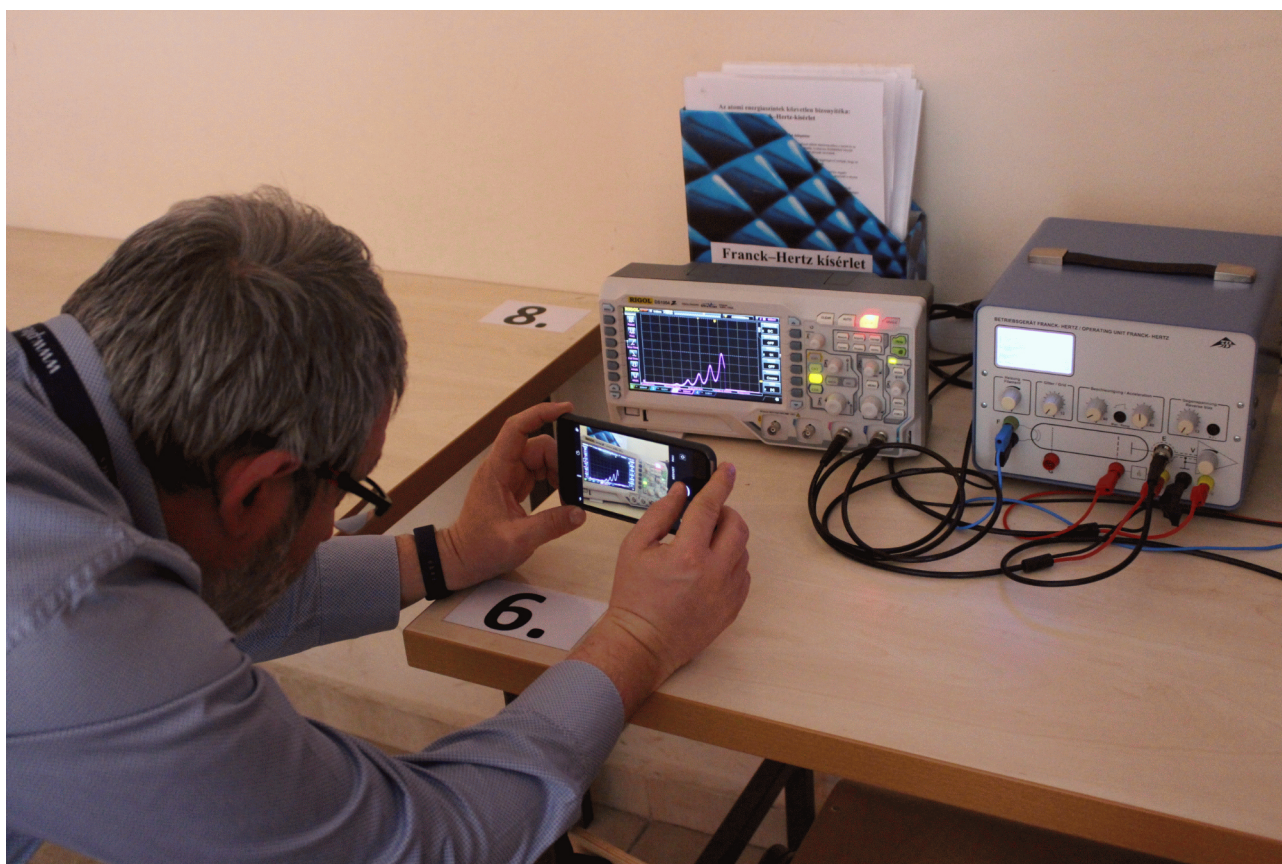
Amikor január elején egykori kollégám beszámolt arról, hogy ők Kínában jó ideje karanténban vannak, (naiv módon) fel sem merült bennem, hogy ez velünk is megtörténhet. A SARS annak idején ijesztő volt, de végül magától megállt, a vírus komolyabb társa (pl. MERS) el sem jutott hozzánk. Február közepén még részt vettünk az Amerikai Biofizikai Társaság konferenciáján, és a nyári melegben, az óceán parton sétálva fel sem merült bennünk, hogy lesz három hónap, amikor szinte semmilyen sétára nem lesz mód, illetve bizonytalan ideig repülőre sem szállhatunk.

Kollégáim számára és számomra a fordulat akkor következett be, amikor március 12-én, csütörtökön az összes magyarországi egyetemet bezárták. Nekem csak irodalmi és filmes élményem volt arról, hogy egy tanév egyszer csak megszakad: Szabó Magda Abigéljének emlékezetes jelenete, amikor bejelentik, hogy a tanév a következő héten véget ér. Mi persze egy pillanattig sem számoltunk azzal, hogy a tanév véget ér, de arra sem, hogy a tanév végéig nem látunk élőben diákot. Az első napokban azt hittük, hogy április végén visszatérhet az oktatás és a diákok visszatérnek a vizsgaidőszakra.

Mindössze tíz napunk volt, hogy elindítsunk egy olyan jellegű oktatást, amelyet még sohasem teszteltünk, és amilyenre sohasem készültünk. Voltak ötleteink, hogy hogyan lehetne távoktatni, korábban teszteltünk olyan platformokat, amelyeken kérdéseket tudtunk feltenni a diákoknak, még tesztet is tudtunk ezeken keresztül íratni (pl. Socrative). Nekem személy szerint volt néhány videóm is – főleg termodinamikai kísérletekről, mert meguntam a felszerelést magammal cipelni az egyetem egymástól távol eső tantermeibe – de valójában semmilyen anyaggal nem voltunk készen. Az első pillanatban az sem volt világos, hogy az online órákat milyen platformon lehetne megtartani, Facebook-on, Youtube-on vagy van erre valami alkalmasabb platform? Utólag vicces, hogy bár majdnem két éven keresztül részt vettem egy tanulmányi bizottság munkájában, amelynek az volt a feladata, hogy megtalálja az optimális tanulástámogatási platformot, a váratlan helyzet gyakorlatilag letarolta az ötleteket és olyan megoldások maradtak életben, amelyeket korábban ilyen-olyan okokból még említésre méltónak sem találtunk.



Mi a Teams mellett döntöttünk úgy, hogy én például korábban csak annyira ismertem, hogy a számítógép elindulásával párhuzamosan ez is elindult. Néha – amikor lekapcsoltam – elgondolkodtam rajta, hogy mire is jó. Március közepén kevesebb, mint egy hét alatt kiderült, hogy a rendszer gyakorlatilag mindent tud, amire nekünk szükségünk lehet: online megbeszéléseket lehet rajta tartani, prezentációkat lehet bemutatni, feladatokat tudunk kiadni és értékelni, ráadásul sokkal követhetőbben, mint offline üzemmódban. Miután tehát eldőlt, hogy milyen platformon fogunk oktatni, felmerült a sokkal fontosabb kérdés, hogy hogyan fogunk oktatni. Az úgynevezett frontális órák – vagyis az előadások és szemináriumok – esetében ezt viszonylag könnyebben meg lehetett oldani, de nagy kérdés volt, hogy hogyan fogunk például gyakorlatokat tartani a műszerek és mérések nélkül. Attól tartva, hogy a következő héten már nem jöhetünk be az oktatói laborokba – erre végül nem került sor – egy utolsó nekirugaszkodással március 19-én, péntek délután az összes gyakorlatot lemértük, a műszerekről, a mérésekről fényképeket készítettünk, ezeket kapták meg a diákok a következő hetekben a feladatok során.

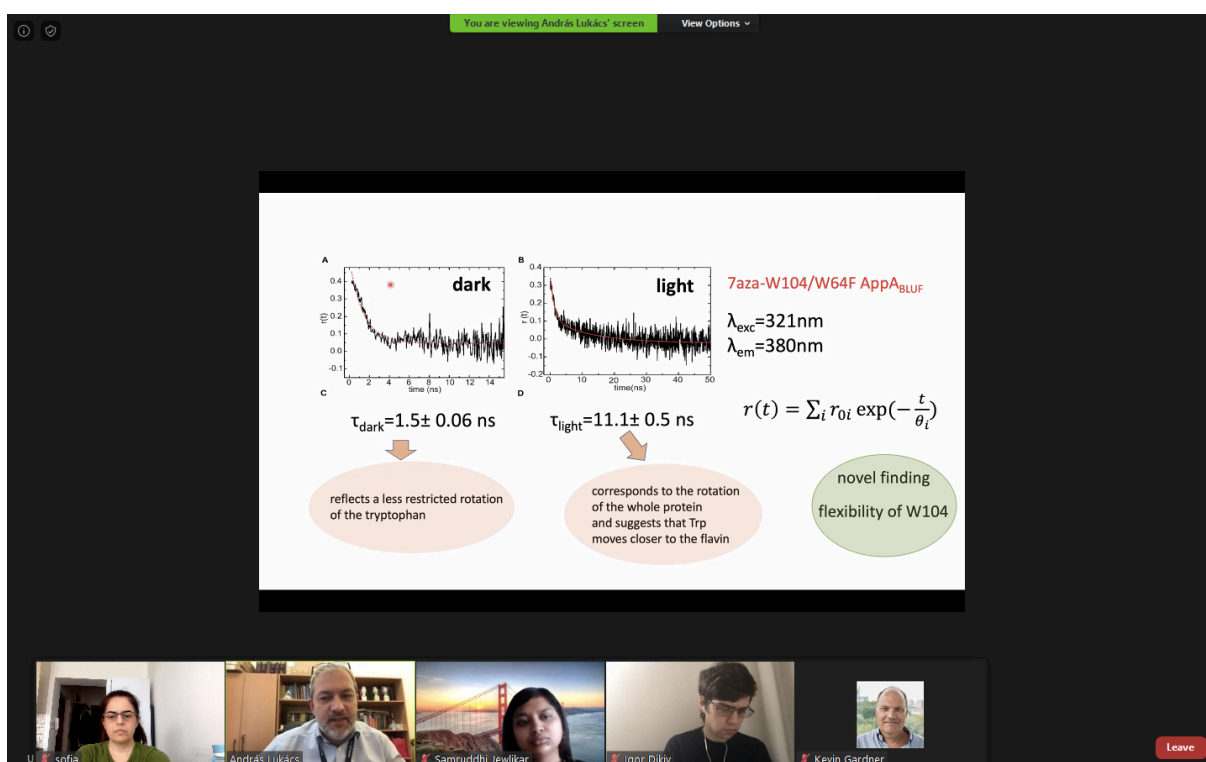


**1. ábra. Lukács András a Frank-Hertz kísérletről fényképeket készít.**

Az online oktatás melleleg sokkal több pozitív eredményt hozott, mint amire



számítottunk, vagy ahogyan azt reméltük. Óriási pozitívummal zárult a félév azáltal, hogy közel százórányi előadásanyagot vettünk fel. Ezt régóta terveztük, de senki sem remélte azt, hogy ezt ilyen gyorsan tető alá hozzuk. Mindemellett a diákok a legtöbb esetben pontosabban és gyorsabban végezték el a feladataikat, mint a szokásos kontakt órák során. Az a helyzet, hogy saját maguk gazdálkodhattak az idejükkel a többségnél pozitív befolyással bírt, és gyorsabb és pontosabb munkát végeztek. Ez az összeszedettség a vizsgákra való felkészülésben is meglátszott, a legtöbb diák nagyon jól és összeszedetten felkészült a vizsgákra, amelyeket továbbra is online módon végzünk.



## 2. ábra. Photoactive proteins Super Zoom meeting.

Az oktatási kreativitás felszabadulása mellett a karantén természetesen negatív hatással volt a kutatási aktivitásunkra. Amellett, hogy az online oktatás az összes időnkét elvitte – mint kiderült egy óra előadáshoz mintegy négy óra készülésre van szükség – a kijárási korlátozás idején fel sem merült, hogy a kísérleteket folytassuk. Ennek megfelelően hat hét karantén és online oktatás után úgy éreztem magam, mint aki újra levegőhöz jut, amikor részt vehettem egy, a New York-i Stony Brook Egyetem által Zoom-on szervezett workshop-on, amelynek témaköre saját kutatási területem, a fotoaktív fehérjék kutatásának volt szentelve. A workshop szervezése még tavaly ősszel elkezdődött, de a járvány és a karantén teljesen megghiúsította (volna). James Iuliano barátom és

régi kollaborációs partnerem április elején felvetette, hogy ha már úgyis megterveztük a workshopot, akkor ne hagyjuk veszni és tartsuk meg Zoom-on. Így rendeztük meg végül április 30-án és május elsején a Photoactive Proteins Super Zoom workshopot a Berkley, a City College of New York, a Stony Brook University, a University of East Anglia, valamint a PTE ÁOK Biofizika Intézet részvételével.

A (vidéki) kijárási korlátozás feloldásával újraindult a labormunka is: ilyen hosszú kihagyás után már mindenki alig várta, hogy ha csak valami egyszerű dolgot is, de hadd mérjen valamit. Megszerveztük, hogy egy laborban egyelőre csak egy ember dolgozzon, voltak, akik a biztonság érdekében hétvégén dolgoztak a laborban, így lassan elkezdtek felvenni a ritmust.

Időközben beköszöntött a vizsgaidőszak is, ami a mi esetünkben többnyire zökkenőmentes volt, biofizikából ugyanis szóbeli vizsgát tartottunk, szintén online módon. Ezen a módon egy szempillantás alatt megszűntek a teremtendők, nem kellett hosszadalmas délutáni vizsgákat szerveznünk, a diákok pedig nagyon gyorsan adaptálódtak az új rendszerhez.



**Lukács András** 2007-ben szerzett PhD fokozatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán. 2007-2009 között az Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biologie kutatóintézetében volt posztdoktorális kutató, 2009-2011 között a University of East Anglia vegyész karán dolgozott tudományos főmunkatársként. 2011 óta újra a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében dolgozik, 2015 óta egyetemi docensként. Kutatási területe a fotoaktív fehérjék funkcionális dinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópiai módszerekkel. 2013-ban Magyar Zoltán ösztöndíjas, 2014-2017 között Bolyai János ösztöndíjas volt. 2017-től az EFOP 3.6.2 Ultragyors fizikai folyamatok atomokban, molekulákban, nanoszerkezetekben és biológiai rendszerekben című projekt egyik vezető kutatója.

KARANTÉNBAN<sup>1</sup>

**Sarkadi Balázs**  
*Természettudományi Kutatóközpont*  
*Enzimológiai Intézet*

Feleséggel, fiammal, menyemmel és két kisunokával, egy nagy kertesi családi házban éljük át a világtól való elzártságot. A külvilággal e-mailen és Skype-on kommunikálunk, kihozatjuk a legtöbb bevásárolni valót, esetleg valamelyikünk védőfelszerelésben elhatol a legközelebbi boltig és megvásárolja, ami feltétlenül szükséges. Az idő lelassult, az élményeket a szép tavaszi napokon virágzó fák, a gyorsan cseperedő unokák jelentik, lehet sokat beszélgetni, zenét hallgatni, kertészkedni, könyveket és szakcikkeket olvasni, vagy régi filmeket nézni. Itthon, nyugdíjasként a családi karanténban tehát tulajdonképpen remekül megvagyok, bár hiányzik a labor és a kísérletes munka közvetlen közelsége, a folyamatos beszélgetések a szakmai tervekről és az eredményekről.



**Sarkadi Balázs** orvos, biológus, az MTA rendes tagja. Több évet töltött posztdoktor-ként, majd kutatóként az USA és Kanada vezető egyetemein és kutatóintézeteiben. Jelenleg a Természettudományi Kutatóközpont emeritusz professzora, a Semmelweis Egyetem kutatóprofesszora. Számos nemzetközi tudományos társaság tagja, a FEBS volt elnöke, az Academia Europaea tagja. Kutatási területe elsősorban a biológiai membránok szerkezete és működése, kiemelten az ABC típusú transzporterek szerepének vizsgálata a daganatokban, az őssejtekben és a gyógyszer-metabolizmusban. Több mint 250 közleménye jelent meg nemzetközi folyóiratokban, amelyekre mintegy 15.500 hivatkozás érkezett (h-indexe 66). Témavezetésével végzett PhD hallgatóinak száma 21, számos nemzetközi oltalommal védett szabadalma került gyakorlati alkalmazásra is.

<sup>1</sup>Sarkadi Balázs Koronavírusról a karanténból című írását lásd a 5. oldalon.

## KUTATÁS KORONAVÍRUS-JÁRVÁNY IDEJÉN

**Szüts Dávid**  
**Természettudományi Kutatóközpont**  
**Enzimológiai Intézet**

### *Felkészülés*

Kutatócsoportunkban már 2020 eleje óta nagy figyelemmel kísértük az új koronavírus (SARS-Cov-2) terjedését. Eleinte nagyon távolinak tűnt a veszély, de a kínai helyzetről rendszeres, másodkézből származó beszámolókat kaptunk a csoportunkban dolgozó kínai posztdoktortól, akinek szüleit már februárban érintették az igen komoly kijárási korlátozások. Reménykedtem, hogy sikerül megfékezni a vírus terjedését, és elkerülni a súlyos járványhelyzetet Európában. Azonban ez nem tűnt valószínűnek, ezért korán megkezdtük a felkészülést. Legfőként olyan módon, hogy megrendeltünk mindent, amit a kísérleteinkhez szükségesnek tartottunk a következő hónapokra. Nagy előrelátásunkban még FFP maszkokat is rendeltünk, de ezeket persze már nem tudták leszállítani.

Februárban még csak az volt biztos, hogy az utazások érintve lesznek. Így szándékosan késlekedtem egy tervezett márciusi olaszországi tanulmányút szervezésével, és szintén késleltettem egy júniusi konferencia regisztrációját. Hamarosan be is igazolódott, hogy márciusban nem lenne bölcs dolog Milánóba utazni. Az események március közepén, ahogy arra bizonyára mindannyian emlékszünk, felgyorsultak. Az egyik héten még furcsának tűnt szendvicseket vinni ebédre a TTK étterem látogatása helyett, a következő héten viszont már be is zárt az étterem, és felkészültünk az otthonról folytatott munkára.

### *Home office*

Otthon maradtunk tehát. De hogyan tovább? A csoport tagjai több kategóriára oszlottak. A bioinformatikai feladatokat végzők zavartalanul folytathatták a munkát a szerver távoli elérésével, melyet az intézet informatikusai biztosítottak. Némelyeknek muszáj volt végig vinniük már megkezdett és meg nem szakítható kísérleteiket, ezért kénytelenek voltak bejárni a laborba. Végül pedig akinek írnivalója volt éppen, az nekikezdhetett alaposan. Ez utóbbi kategória fő képviselője a csoportvezető, akinek valahogy nem lett kevesebb a dolga. Először is már éppen dolgoztunk egy cikk bírálatainak megválaszolásán. A vírushelyzet miatt elvetettünk néhány tervezett kísérletet DNS-sérüléseket tartalmazó plazmidok sejtlizátumokban történő, izotóppal jelölt replikációjával kapcsolatban, és az addig elkészült munka alapján megírtuk a javított verziót.

Bizonyos mértékben a koronavírus-helyzetre is hivatkoztunk magyarázat-képpen, amiért nem ismétlünk meg minden egyes kísérletet az ötéves munkából egy újabb kontroll jelenlétében, de alapvetően igyekeztünk tudományosan alátámasztott érvelést alkalmazni. Ez nem hatotta meg a harmadik lektort (a hírhedt „reviewer 3”), aki az első körben megkritizált és megválaszolt kilenc tételen túl a második körben újabb huszonöt kifogásolni való dolgot talált a kéziratunkban. De miközben reviewer 3 szorgos munkáját végezte, sikerült befejezni és beküldeni egy új kéziratot is platinavegyületek mutagenikus hatásáról. Ennek lektorai kevésbé szorgosak, így még várjuk a véleményüket.

### *A munka szervezése*

Az otthoni munkavégzés egyik fő akadálya az interakció hiánya. A laborban rendszeresen tartunk csoportmegbeszéléseket, és emellett is folyton meg tudjuk nézni egymás eredményeit, el tudjuk mesélni a legfrissebb ötleteinket, feltenni aktuális kérdéseinket. Mindehhez át kellett állni valamilyen online platformra. Egyszerű megoldásként a Skype-ot választottuk. Megtartottuk a szokásos heti egy csoportmegbeszélést és egy cikkreferálást (journal club). Az időpontokat az iskolákhoz kellett hangolni, hiszen a digitális oktatás online órái a szülőket és a komputereket is igénybe veszik. További fórumként az így összehozott hívások chat ablakát használtuk, használjuk, amelybe bárki bármikor beírhatja a legfrissebb gondolatait, beküldheti az újonnan talált releváns cikkeket, és mindenki más azonnal meg is nézi az okostelefonja csipogásától vezérelve. Kiváló megoldásnak bizonyult, már sokkal korábban be kellett volna vezetni – e-mailen nem lehet hatékonyan elérni a fiatalokat! A rendszeres találkozások kiváltására arra is megkértem a csoport tagjait, hogy a hét elején küldjenek egy munkatervet, és a hét végén írják meg, hogy ebből mi sikerült.

### *Laborkísérletek*

Bizonyos kísérleteket mindenképpen folytatni próbáltunk. A mutagenézis mechanizmusait vizsgáló kutatásunkban sok hosszú távú sejttenyészetes kísérletet alkalmazunk, amelyekben az időre a mutációk akkumulálódásához van szükség. Még a járvány előtt indítottunk egy körülbelül három hónapos, rendkívül munkaigényes és nagy költségvetésű kísérletsorozatot. Ezt egy kolléga hősie munkájával és sok aggodalmas tömegközlekedésével sikerült tovább vinni a teljes járvány alatt, bár volt olyan időszak, amikor kétségesnek tűnt a sikeres befejezés. Emellett a helyzet enyhülésével elkezdtünk új hosszú távú sejttenyészetes kísérleteket is. Ezeket úgy szerveztük, hogy minél



kevesebb időt kelljen a laborban tölteni, és ott lehetőleg ne is találkozzunk. Valamilyen rendszerességű bejárásra az irodai szobanövényeink öntözése és a laborbeli gerinctelen állataink etetése miatt is szükség volt.

### *Külföldi együttműködések*

A külföldi kollaborációs partnerekkel való kapcsolattartást nem érintette komolyan a járvány, legfeljebb egymás irodái helyett otthonainkat is megtekinthettük a videóbeszélgetésekben. A kollaboratív munkák valamelyest lassultak, hiszen európai és amerikai partnereink laboratóriumai nagyrészt bezártak. Az utazások, személyes megbeszélések, konferenciák természetesen elmaradtak, és a jövőben is várhatóan korlátozva lesznek. A kísérleti munka kiesése miatt más csoportokban is a meglévő adatok elemzésére került hangsúly, így felmerült, hogy közösen is próbáljunk gondolkodni. Ennek eredményeképpen szerveztünk egy kis online bioinformatikai konferenciát a Cardiff-i Egyetem kezdeményezésére, brit-magyar-új-zélandi együttműködés-ben. A kétnapos konferencián eltelt két hét a két nap között, amelyre tényleg csak egy online konferencia esetében nyílik lehetőség. Ez az elrendezés frissebben tartotta a kutatói elméletet, és engedte, hogy az új-zélandi kollégák kialudják magukat a számukra éjfél után véget érő szekciókat követően. Az informális hangvételű konferencián sok érdekes közöletlen eredmény és módszer is elhangzott, és máris új közös projektek indultak.

### *Visszatérés*

Május folyamán szerencsére látszott, hogy a járvány lecsengőben van. Sőt, végre elkezdtek megjelenni tudományosan értelmezhető járványügyi adatok, melyek arra utaltak, hogy soha nem volt sok fertőzött, és azon emberek többsége tévedett, akik fejfájásukat vagy hőemelkedésüket a koronavírusnak tulajdonították. Így bátrabban láttunk neki a labormunkának, és május végére már csak akkor maradt a csoport bármely tagja otthon, amikor tényleg nem akadt kísérleti munkája. Más országokban is újraindult az élet: e sorok írásakor már észak-olasz és amerikai ismerőseink is dolgoznak laboratóriumi kutatásaik beindításán.

Mindezek mellett a vírusveszély természetesen nem múlt el, és munkánkra is lesz várható hosszabb távú hatása. Egyelőre nem tartunk személyes csoportos megbeszéléseket, hanem még az intézetben levők is több képernyő előtt csatlakoznak az online megbeszélésekhez. Ezt a korlátozást kedvező járványhelyzet esetén talán majd feloldhatjuk. Azonban a koronavírus-járvány hosszú

távú féken tartásának kulcsa, legalábbis egy megfelelő védőoltás megjelenéséig, mindenképpen a társadalom megfelelő alkalmazkodásában rejlik. Remélhetőleg elegendő néhány könnyen elfogadható restriktív fenntartása, de ezek között bizonyosan előkelő helyet foglal el a tömegrendezvények korlátozása. A tudományos kutatást nagymértékben elősegítő, új ötleteket és új együttműködések stimuláló konferenciák sajnos ezen kategóriába esnek, így egy ideig el kell fogadnunk az online alternatívákat. Érdekes az előnyöket is nézni: több időnk van a kutatásra, talán több időnk jut gondolkodásra, és kevésbé szennyezzük a környezetet sok utazással (egy kutató karbon lábnyomának jelentős részét adják a konferencia-utazások). Reméljük, hogy a járványból tanultakat sikerül majd hasznosítani, és annak elmúltával egy ügyesebben berendezett világban folytathatjuk munkánkat.



**Szüts Dávid** 2011 óta vezeti a Genomstabilitás kutatócsoportot a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében. A csoport a sérült DNS replikációjának mechanizmusait és a mutációk kialakulását vizsgálja biokémiai, genetikai és genomikai módszerekkel, különös tekintettel a daganatok keletkezésére és evolúciójára.

## EGYETEMI ÉLET A KORONAVÍRUS ÁRNYÉKÁBAN

**Villányi Zoltán**  
**Szegedi Tudományegyetem**  
**Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék**

2020 tavasza az egész emberiséget összehozta. A harc a láthatatlan ellenséggel, amely képes minden emberhez a kapcsolatain keresztül elérni a futótűznél is gyorsabban, megmutatta, hogy senki sem kivétel, a baj bárkit elérhet. Az ellene való védekezésben pedig egymásra vagyunk utalva.

Talán legnagyobb problémánk a túlnépesedés, ami az állatvilágot sarokba szorítva, a megszorodott vadállat-ember interakciók miatt, törvényszerűen váltja ki újabb és újabb zoonózisok kialakulását, amelyek egyre gyorsuló ütemben csapnak le, és egyre nagyobb méretekben kényszerítik a fékevesztett emberiséget természetes korlátok közé. Csak az utóbbi két évtizedben ott volt a SARS, a MERS, a madárinfluenza, a sertésinfluenza, az Ebola és a Zika, a legsúlyosabbak az állatokról átterjedt járványt okozó vírusok közül. Már ezek intő jelek voltak. A mostani járvánnyal pedig az egész világ működése megtorpant, amire az antibiotikum felfedezése óta nem volt példa. Ha a 2020-as koronavírus-járványból nem sikerül levonni a tanulságokat és minden visszatér a régi kerékvágásba, számíthatunk rá, hogy előbb-utóbb jön a következő, még súlyosabb következményekkel járó járvány. Nemcsak kezet mosni, távolságot tartani, maszkot viselni kell megtanulnunk, hanem nagyobb felelősséggel lenni egymás és az egész élővilág iránt. Lassítani az életünkön, többet lenni otthon, a családban, a városban, az országban.

Az elmúlt három hónapban a védekezés melléktermékeként elértük, hogy tisztább lett a levegő, lecsökkent a felesleges fogyasztásunk. Megtapasztaltuk, hogy élhetőbbek lehetnének a városok, mindenki nyugodtabb is lenne, ha nem lennének a reggeli és a délutáni dugók. Ha jobban be lenne osztva, ki mikor megy a munkahelyére, és ott csak hasznos időt töltene, kevesebb lenne a fölösleges fogyasztás és sürgés. Megtapasztalhattuk, hogy vannak feladatok, amiket otthonról is el lehet végezni, és vannak leckék, amiket otthonról is meg lehet tanulni. A közösségek elfogadóbbak, ha a tagjai nem napról-napra összekényszerítve csak elviselik egymást, hanem ehelyett várják a valóban hasznos együttlétet. Az is jó, ha több idő jut gyereknevelésre, a családra, az idősek gondozására. Hogy a hétköznapiakba átültessük a jó tapasztalatokat, csak szervezés kérdése.

Az egyetemen már a vészhelyzet előtt megteremtették a távoktatás lehetőségét. Ehhez az online rendszer lényegében már régóta készen állt, csak a kapacitásokat kellett nagyon gyorsan kiszélesíteni. Tanszékvezetőnk még a vészhelyzet előtt összehívott egy oktatói értekezletet, ahol már akkor a Pauli-elv szerint rendezve foglaltunk helyet, olyan távol egymástól, amennyire csak lehet. Röviden megbeszéltük, hogyan tartjuk majd meg az előadásokat és a gyakorlatokat, milyen nehézségei lehetnek majd a számonkérésnek. A kutatómunkában előre vettük az adatelemzéseket, a szakirodalmi áttekintéseket, és elkezdtünk komolyan foglalkozni az eddigi eredményeink összefoglalásával, kéziratba rendezésével. Ez határozottan jót tett a kutatásnak, egyrészt mert saját munkánk újragondolása újabb lendületet is adott, másrészt kiderült, hol vannak azok a pontok, ahol muszáj további kísérletes bizonyítékokat szerezzünk. Kísérletezni, ha a távolságtartás miatt szigorúbb feltételek mellett is, de szerencsére a veszélyhelyzet alatt is volt lehetőségünk. Az asszisztencia végig működött, az élesztő és muslica törzseinket gond nélkül fenntarhattuk, a legfontosabb kísérleteinkkel haladni tudtunk. Minden kicsit lassabban, kényelmesebben haladt, ezt azonban nem érzem feltétlenül gondnak: átgondoltabb munkavégzést tett ugyanis lehetővé. Remélem, ennek eredménye visszaköszön majd nemzetközi tudományos folyóiratokban megjelenő publikációkban is.

A legnagyobb változást és kihívást az életünkben az elektronikus oktatás és számonkérés jelentette. Az azonnali visszacsatolás miatt sokkal könnyebb bemenni egy előadóba vagy egy gyakorlóba és a jelen lévő diákoknak órát tartani, mint összeállítani az online gyakorlati feladatokat vagy előadásanyagot, és készenlétben lenni a felmerülő kérdések megválaszolásához. Mivel hosszabb ideig külföldön dolgoztam, nekem személy szerint meg kellett ismerkednem az online oktatás színterével is, a Coospace rendszerével, amiben a kollégák nagyon nagy segítségemre voltak. Le a kalappal a rendszer üzemeltetői előtt is, akik lehetővé tették, hogy a hallgatókkal történő kapcsolattartás a megnövekedett adatterhelés ellenére is zökkenőmentes legyen. A gyakorlatokon igyekeztünk a diákokat online elérhető adatok elemzésére tanítani. Többnyire minden hallgató jelen volt a gyakorlatok idejében, ezt az adott témával kapcsolatos beugrókkal ellenőriztük. Aki akadályoztatva volt, szorgalmi feladatokkal pótolhatta elmaradását. A számonkérés egy kérdésbankból véletlenszerűen összesorsolt tesztkérdésekből álló feladatsorral történt, amit a hallgatók a gyakorlat ideje alatt bármikor elindíthattak. 15 vagy 45 perc alatt kellett teljesíteniük a tesztet, annak nehézségétől függően. A szorgalmi feladatoknál

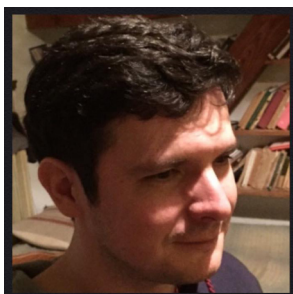
általában az első három helyes megfejtő kapott ötöst. Beiktattunk néhány esszéfeladat is, ahol a legjobban megírt munkákat jutalmaztuk. Igyekeztem aktuális témákat bedobni: a hallgatók terveztek SARS-CoV2 azonosítására alkalmas primereket, és szorgalmi feladat volt például összehasonlítani a Nature-ben megjelent SARS-CoV2 természetes eredetét bemutató cikket egy, a BioRxiv-en megjelent, majd később visszavont, a vírus mesterséges eredete mellett kardoskodó kézirattal. Személy szerint – a nehézségek ellenére – nagyon élveztem az online oktatást, és elégedett voltam a hallgatók szorgalmával. A szorgalmi esszé négy győztesét a járványügyi vészhelyzet elmúltával egy kutatói szemináriumra invitáljuk és egy laborlátogatás megszervezését helyeztük számukra kilátásba, ahol lehetőségük lesz elbeszélgetni az akadémiai pályán tevékeny kutatókkal. Ez hasznos lehet az álláskeresés előtt álló hallgatóknak és az esetlegesen motivált munkaerőt kereső laboroknak is. Az online oktatásnak tehát mindenképpen nagy előnye volt, hogy ezen a módon a kiemelkedő képességű hallgatókat szorgalmi feladatokkal sokkal jobban lehetett ösztönözni, mint korábban. Tapasztalatom szerint jobban meg merték mutatni magukat, úgy látszik, tantermi körülmények között sok hallgató kerül a feltűnést.

A technikai fejlettség jelenlegi fokán, az intelligens eszközök korában nagyon aktuális az a kérdés, hogy jelenlegi iskolarendszerünk keretei között életszerű, használható, a gyorsan változó munkaerőpiaci igényekhez gyorsan adaptálódó tudást, kompetenciákat adunk-e a diákok, hallgatók kezébe. Oktatással kapcsolatos előadások visszatérő témája az a visszásság, hogy a diákjainkat az általános iskola első osztályától kezdve minél kiterjedtebb lexikális tudás megszerzésére ösztönözzük, számonkéréskor nem leshetnek, nem súghatnak, azaz lényegében nem dolgozhatnak együtt. A nagybetűs életben ezzel szemben a kollégáikkal való együttműködés elvárás, a problémák megoldásához pedig bármit használhatnak. Ezek az életszagú körülmények most az online feladatok megoldásához is megadattak, üdítő volt látni, hogy a hallgatók segítettek egymásnak, jól éltek a világháló nyújtotta lehetőségekkel is. Fontosnak tartottam, hogy keressék egymás társaságát ezekben a szociális szempontból ingerszegény időkben. A feladatok kreatív megoldásokat igényeltek, az öröm az ehhez vezető út volt, amiben megengedett volt az együtt gondolkodás. Minden gyakorlaton, minden előadáson biztosítottunk lehetőséget a hallgatóknak személyes videó-megbeszélésre is. Ezekről mindig tartottam egy kicsit, mert a családban két általános iskolás van, a feleségem irodája is a lakásban került kialakításra. Könnyen kerülhettem volna hasonló cipőbe, mint a BBC közel-keleti



tudósítója, akinek egy élő, komoly témájú videóbejelentkezése során egy bébikompos és egy totyogó kisgyereke robbant be hirtelen a home office-ába, mögöttük egy, a helyzet elhárításában kudarcot valló, riadt anyával. Ez persze túlzás, mindenesetre örülök, hogy a készenléti 45 percben senki sem húzta le a WC-t. Összefoglalóan: a nehézségek ellenére az online oktatás oktatói oldalról nézve sikerrel zárult. Remélem, ez a vizsgaeredményekben is megmutatkozik majd!

A szerző kutatásait a koronavírus-járvány alatt is a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal ÚNKP-19-4-SZTE-118 számú ösztöndíja támogatta.



**Villányi Zoltán** a Szent István Egyetemen szerzett agrármérnök diplomát 2004-ben, szakdolgozatát Prof. Dr. Orosz László laboratóriumában készítette. 2008-ban az SZTE Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolájában szerzett PhD fokozatot Prof. Dr. Szabad János tanítványaként. A Genfi Egyetem Orvostudományi Karán öt éves posztdoktori időszakot töltött 2011-től, amelyet két év adjunktusi munka követett Prof. Dr. Martine Anne Collart laboratóriumában. 2019-től az SZTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék adjunktusa, Prof. Dr. Boros Imre Miklós csoportjában dolgozik. Kutatásai a különböző génexpressziós lépések között fellépő szabályozó folyamatok felderítésére irányulnak.

## KARANTÉN RÓMÁBAN

**Bernáth Sándor**  
**FontaMed Tanácsadó Kft.**

A 2019 végén feltűnt SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) által okozott súlyos akut légzőszervi megbetegedés (Covid-19) hetek alatt a világ több mint 100 országában terjedt el, miközben 2020. február 25. és 29. között csak 46 Covid-19 esetet regisztráltak Európa, Afrika, Észak- és Dél-Amerika 21 országában [1]. Olaszország kezdettől a járvány epicentrumának számított Európában, ami különösen az északi területen vált kritikussá, s március elejére Itália mind a húsz régiójára kiterjedt. 2020. március 11. és 21. között az összes aktív fertőzött 9-11%-a intenzív ellátásra szorult [2]. 2020. május 18-án az összes nyilvántartott fertőzött 225.886 volt [3].

Feleségemmel Rómában élünk és dolgozunk, így a Covid-19 világjárvány itt ért minket. A pandémia következményeként, 2020. március 10-én az olasz Egészségügyi Minisztérium (Ministero della Salute) honlapján megjelent rendelet értelmében elrendelték az összes kereskedelmi tevékenység felfüggesztését a szupermarketek és a gyógyszertárak kivételével, március 21-én pedig minden nem létfontosságú üzleti és ipari tevékenységet leállítottak [4]. Nem féltünk, nem estünk pánikba, de a helyzetet kezdettől nagyon komolyan vettük. Igyekeztünk a javasolt és lehetséges óvintézkedéseket betartani a másoktól való távolságtartástól kezdve a maszk viselésén át a gyakori kézmosásig. Különösen, hogy itt minden 7 regisztrált betegből 1 meghalt, ami elég borús perspektívát kínált. Az elhunytak száma 2020. május 18-án 32.007, ami az összes regisztrált megbetegedés 14,16%-a. Az elhalálozottak száma több mint 68-szorosa a magyarnak (május 18-án 467), miközben az olasz lakosság lélekszáma csak hatszorosa hazánkéinak.

Hogy miért vált ilyen súlyossá a helyzet Olaszországban, arra különféle elméletek vannak. Valóban idősödő a társadalom, a születéskor várható élethossz 82,7 év, ami a 6. legmagasabb a világon. (Az első helyezett Japánban ez 83,7 év, míg hazánkban 75,9, ami az 57. helyet jelenti a WHO 2015-ös felmérése szerint [5]). Olaszország a világon a második legidősebb populációjával rendelkező ország, s a járvány az idősebb korosztályt sújtja súlyosabban. Ugyanakkor Németország hasonlóan elöregedő társadalom, miközben a halálozási arány 4,53%, lényegesen alacsonyabb. Az tény, hogy

Olaszországban az intenzív osztályokon 100 ezer lakosra levetítve 12,5 ágy jut, míg Németországban ez 29,2. Olaszországban már 2020. februárjában az ágyak felét az intenzív osztályokon Covid-19 betegek foglalták el [6]. Felvetődött az is, hogy a járvány terjedésében fontos szerepet játszhattak az olasz társadalmi és kulturális szokások. Olaszországban a 18 és 29 év közötti fiatalok napi szinten érintkeznek szüleikkel és nagyszüleikkel. Ráadásul, itt a legmagasabb azoknak a 30 és 49 év közötti embereknek az aránya, akik még mindig a szüleiknél laknak. Ugyanakkor, a hipotézis alátámasztására végzett kutatás és statisztikai analízis ezt a feltevést nem támasztotta alá [7]. Az analízis azt mutatta, hogy a halálozási arány a régiókkal mutat korrelációt, a társadalmi és kulturális szokásokkal nem. Ráadásul a halálozási arány átfed Európa más régióiban tapasztaltakkal.

Olvasni lehetett arról is, hogy az emberek eléggé fegyelmezetlenek voltak, s főleg az északi régióban tízezer számra büntettek meg embereket, mert nem tartották be a kijárási tilalmat. Itt Rómában, legalábbis a Trastevere kerületben, ahol élünk, ezt nem tapasztaltuk. Persze 2020. május 18-án Lombardiában 85.019, Piemontéban 29.519, Emila-Romagnaban 27.267 és Venetoban 18.950 fertőzési esetet regisztráltak. Ehhez képest Lazioban 7.485 esetet. Lombardiában közel 10 millió ember lakik, Lazioban mintegy 6 millió, tehát nem létszámarányosan magasabb a fertőzések száma. Meglehet, itt Lazioban ténylegesen fegyelmezettebbek voltak az emberek, mint az északi régiókban, de ennek tudományos igényű vizsgálatával nem találkoztam. Tegyük hozzá rögtön, bár Olaszország példája óvatosságra kellett volna, hogy intse más országok politikai vezetését, ennek ellenére az USA-ban, Oroszországban, az Egyesült Királyságban, Franciaországban, Spanyolországban, Belgiumban és Braziliában hasonlóan súlyos helyzet alakult ki. Nyilván komplex okok vannak emögött, amit az elkövetkező időszakban valószínűleg megpróbálnak feltárni.

A kórházak és időotthonok itt is gócpontokká váltak. Annyira, hogy az időotthonokban történt halálesetek magas száma miatt, a WHO azt mézszárlásnak (Nursing Home 'Massacre') nevezte, aminek kapcsán hivatalos vizsgálat is indult [8]. Lombardiában a mintegy 24.000 időotthonban lakó gondozottak közül 3.045 hunyt el február 1. és április 15. között a fertőzés következtében. Ráadásul, olyan hibát, sőt talán bűnt is elkövettek, hogy egy március 8-án kelt regionális határozat értelmében időotthonokban helyeztek el fertőzött betegeket, a kórházak tehermentesítésére. Ezt még súlyosbította egy március 30-án kelt lombardiai rendelet, ami utasította az időotthonok vezetőit, hogy 75

éven felülieket más egészségi problémával ne szállítsanak kórházba, a szállítással és a sürgősségi ellátással összefüggő kockázatok miatt. Ez több idősoththonban az érintettek halálos ítéletével ért fel.

Bár az okok mélyebb és megbízhatóbb feltárása még várat magára, az biztosnak látszik, hogy az olasz hatóságok a kezdet kezdetén nem ismerték fel a betegség valódi súlyosságát, illetve a járványszerű terjedés valódi volumenét, egyáltalán nem voltak felkészülve arra. Későn hozták meg az Európában egyébként példátlanul szigorú korlátozó intézkedéseket, s ezzel értékes heteket vesztek el. Ehhez társult, hogy a Confindustria, az ország legnagyobb ipari lobbiszervezete hatalmas nyomást gyakorolt a politikai vezetésre a szigorítások bevezetése ellen [8]. Megalapozatlan döntések is szerepet játszottak. Március 31-én, egy sikeres 21 millió eurót gyűjtő kampányt követően Lombardia kormányzója elrendelte egy hatalmas szükségkórház építését Milánóban, ami 1.324 beteg befogadását tette volna lehetővé annak ellenére, hogy figyelmeztették, nem fogják tudni megfelelően felszerelni. Végül a nagyon költséges szükségkórházban csak néhány tucat beteget kezeltek [8].

Időközben a gyógyítási stratégiák kidolgozása, gyógyszerek, vakcinák kutatásfejlesztése gőzerővel folyik szerte a világban, így itt is [9]. A létező gyógyszerek egy része, mint a maláriaellenes chloroquine nem bizonyul(t) elég biztonságosnak, olyan tesztelt antivirális szerek, mint lopinavir plus ritonavir kombináció, umifenovir, baloxavir, niclosamide és iseltamivir nem eléggé hatékonyak. A kortikoszteroidok úgy tűnik többet ártanak, mint használnak. Az antibakteriális azythromycint szintén kipróbálták, de nem volt hatékony. Jelenleg két antivirális szerrel (remdesivir, favipiravir) és az immunosuppresszív tocilizumabbal folynak klinikai vizsgálatok Olaszországban is. Gyógyult betegek vérplazmájával szintén kísérleteznek, s interferon kezelések is klinikai vizsgálat alatt vannak. Amit egyelőre tudni lehet, hogy az antivirális szerek és a plazma kezelés a betegség korai szakaszában tűnnek hatékonyak, míg a tocilizumab és az inhalált béta-interferon alkalmazása a betegség későbbi szakaszában, súlyossá vált állapotban célszerű. Az igazi megoldást egy hatékony vakcina hozhatja el. Több országban is zajlanak kísérletek, köztük az olasz IRBM Science Park biotechnológiai vállalat vakcinájával, ami az Oxfordi Egyetemmel karöltve fejlesztenek. A klinikai tesztek a UK-ben kezdődnek a preklinikai biztonságossági vizsgálatokat követően.

Végül egy személyes beszámoló, hogyan éltük meg a járványt Rómában. A

lakhelyelhagyási tilalom azt jelentette, hogy külön engedély nélkül élelmiszerboltba, illetve gyógyszertárba 400 m-es körzeten belül mehettünk csak, máshová nem. A munkavégzés szempontjából az új helyzet engem nem érintett, mivel évek óta főként gyógyszerek törzskönyvezéséhez szükséges szakértői anyagokat készítek angol és amerikai gyógyszergyártók számára, s az ehhez szükséges minden aktivitás a konzultációkon keresztül a forráskutatáson át a szakértői anyagok megküldéséig IT technológiával megoldható. Rózsa, a feleségem, az ENSZ Világélelmészeti Programjánál (WFP) dolgozik, mint projektvezető konzulens. Az ő esetében egy héttel a karantén bevezetése előtt az otthoni munkavégzés lehetőségét mindenkinek tesztelni kellett az Internet kapcsolat kapacitásától kezdve a telekommunikációs eszközök és programok működésén át az IT biztonság elvárt szintjének biztosításáig. Mindent összevéve, a munka területén a pandémia nálunk nem okozott/okoz problémát, így ebben szerencsésnek mondhatjuk magunkat.

Valószínűnek látszik, hogy a jelenlegi helyzetnek hosszú távon is komoly hatása lesz a munkavégzésre, munkaszervezésre bizonyos területeken. A pandémia előtt az USA-ban a munkaképes lakosság kb. 15%-a dolgozott távmunkában, míg Európában ez az arány jelenleg csak 2-3 % között volt. A világjárvány alatt kényszerűen bevezetett távmunka a gyakorlatban mutatta meg, melyek azok a területek, amelyek teljes hatékonysággal végezhetőek online. Egy 2015. és 2017. között 75 országban végzett nemzetközi felmérés néhány érdekes tényrt tárt fel az otthoni munkavégzéssel kapcsolatban [10]. Eszerint a fejlett országokban online munkát végzők egyharmada nő, míg a fejlődő országokban csak egy ötöde. Az ilyen munkát végzők 18%-a legfeljebb középiskolai végzettségű, 25%-a műszaki szakember, 37%-ának van felsőoktatási diplomája, s 20%-ának posztgraduális diplomája. A posztgraduális diplomával rendelkezők 57%-a tudományos és technológiai szakember (12% természet- és orvostudományok, 23% mérnöki tudományok, 22% IT technológia). További 25% közgazdaság, pénzügy, könyvelés területén van. Az ilyen területeken gazdaságossági számítások alapján valószínűleg jóval kevesebbet fognak a jövőben a dolgozók irodákban tölteni. Meglehet, kialakul egy rugalmas rendszer kevesebb irodai nappal, s több otthonival.

Visszatérve a személyes tapasztalatokra, magánéletünkben a legfontosabb változást a pandémiához kapcsolódó korlátozó intézkedések következtében a számunkra kedves aktivitások, apró rituálék elmaradása jelentette/jelenti. Ami hiányzott/hiányzik, rendszeres és hosszú sétáink Róma parkjaiban és történelmi



nevezetességei között, a reggeli kávé és cornetto (az osztrák 'kipferl' és a francia 'croissant' olasz megfelelője) kedvenc bárjainkban, a Trastevere hangulatos éttermeinél utcai asztaloknál felszolgált vacsorák, a turisták lüktető, életvidám hömpölygése, a kiállítások, köztük a reneszánsz festő, Raffaello halálának 500. évfordulója alkalmából rendezett, de kényszerűen bezárt római kiállítás, amire csak elővételben 70 ezer jegyet adtak el online stb. Mindenesetre fizikai, mentális és érzelmi síkon is igyekeztünk alkalmazkodni az új helyzethez. Fizikai aktivitásként, egyebek mellett, újra gyakoroltam a helyben futást - amit utoljára 18 éves koromban, kötelező katonai szolgálatom idején tettem -, hogy ezzel is nehezítsem a koronavírus dolgát. Kikapcsolódást jelentő mentális karbantartás céljából összeállítottam egy magyar, angol, olasz nyelvű fotóalbumot madárképeimből, amit barátaim tetszéssel fogadtak. Végül pedig érzelmileg sokat segített/segít, hogy gyermekeinkkel, családtagjainkkal, barátainkkal ma már úgy lehet beszélgetni, hogy nemcsak halljuk őket, de látjuk is az arcukat. A telekommunikációs technológia mai szintjén a karantén nem ugyanazt jelenti, mint amilyen mondjuk az 1918–19-es spanyolnátha idején volt.



Most, hogy ezeket a sorokat írom, két hete már, hogy enyhítettek a korlátozásokon, de hosszú időnek kell még eltelnie, hogy a város megteljen étellel. Most még elhagyatott, magányos. Hat nappal a kijárási tilalom megszüntetése után készítettem a fenti képeket. Az emberek sokasága, ami időnként szinte kényelmetlenül, de mégiscsak étellelívé tette a város történelmi helyeit, nagyon hiányzik. Jó lenne valami bölcs megoldást találni arra, hogy ne kelljen az embereknek eltűnni a szabadból ahhoz, hogy csökkenjen a légszennyezés és a zaj, hogy kevesebb legyen az elszórt szemét. Jó lenne, ha a jövőben minél több ember minél többször tudna örülni annak, amikor napos időben látja a felettünk levő ég gyönyörű kék színét.

Az utóbbi jó néhány évtizedben elképzelhetetlen lett volna ilyen kihaltságról tanúskodó képeket készíteni római műemlékeknél (Colosseum, Trevi-kút, Pantheon, Via dei Fori Imperiali), mint most, hat nappal a karantén feloldása után, egy szép májusi vasárnap délelőtt.

#### Irodalomjegyzék

- [1] Tuite, A.R., Ng, V., Rees, E., Fisman, D. (2020) Estimation of Covid-19 outbreak size in Italy. *Lancet Infect Dis*, **20(5)**: 537.
- [2] Remuzzi A, Remuzzi G. Covid-19 and Italy: what next? (2020) *Lancet*, **395(10231)**: 1225-1228.
- [3] Covid-19Italia I Dati, le mappe, Corriera della Sera, 18 maggio 2020. <https://www.corriere.it/salute/20-febbraio-25-coronavirus-mappa-contagio-italia-6ed25c54-57e3-11ea-a2d7-f1bec9902bd3.shtml>
- [4] Lazzerini, M., Putoto, G. (2020) Covid-19 in Italy: momentous decisions and many uncertainties. *Lancet Glob Health*, **8(5)**: e641-e642.
- [5] Life expectancy and Healthy life expectancy Data by WHO region. <https://apps.who.int/gho/data/view.main.SDG2016LEXREGv?lang=en>
- [6] Rosenbaum, L. (2020) Facing Covid-19 in Italy - Ethics, Logistics, and Therapeutics on the Epidemic's Front Line. *N Engl J Med*, **382(20)**: 1873-1875.
- [7] Giangreco, G. (2020) Case fatality rate analysis of Italian Covid-19 outbreak [published online ahead of print, 2020 Apr 16]. *J Med Virol*, 10.1002/jmv.25894.
- [8] Winfield, N. Many failures combined to unleash death on Italy's Lombardy. The Associated Press news. April 26, 2020. <https://apnews.com/de2794327607a3a67ed551f0b6b71404>

- [9] Pascarella, G., Strumia, A., Piliego, C., et al. (2020) Covid–19 diagnosis and management: a comprehensive review [published online ahead of print, 2020 Apr 29]. *J Intern Med*,10.1111/joim.13091.
- [10] Berg, J., Furrer, M., Harmon, E., Rani, U., Silberman, M.S. (2018) Digital labour platforms and the future of work: Towards decent work in the online world International Labour Office – Geneva, ILO, 2018.



**Bernáth Sándor** a FontaMed Tanácsadó Kft. tulajdonos-ügyvezetője; a LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft. társtulajdonosa és fejlesztési igazgatója; a Kinexum LLC (USA) európai gyógyszerregulációs tanácsadója. Címzetes egyetemi docens a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán. 1986 és 1994 között a Pittsburgh Egyetemen (Pittsburgh, PA, USA) kutató és tanított. A biológiai tudomány kandidátusa; üzleti menedzsment diplomát szerzett a Brunel Egyetemen (London, UK).

Dear Colleagues,

After careful consideration, we have decided **to cancel the [Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society \(HBS\)](#), originally planned to be held in Pécs, in August 2020.**

We all deeply regret that this summer will pass without this important event of our Society, which has been a source of much insight, fun and enjoyment for all of us in recent years.

Our decision was influenced by the following circumstances:

- the number of abstract submissions remained very low until the specified deadline;
- very few exhibitors would be willing to participate under the current conditions;
- PTE, the host university, currently upholds a policy banning the organization of any major meeting;
- it would be very difficult to adhere to social distancing measures at poster sessions and other social events.

Despite the above decision, we warmly encourage everyone to take part in the next [Hungarian Life Sciences Conference](#), planned for **26-28 March, 2021.**

The [HBS Annual Meeting in Pécs](#) is planned to take place **at the end of August in 2022.**

**We look forward to meeting you soon under more favorable circumstances.**

*László Buday, President, HBS  
Ferenc Gallyas, local organizer, HBS  
Mihály Kovács, Secretary General, HBS  
Attila Varga, CEO, Diamond Congress Ltd.*