

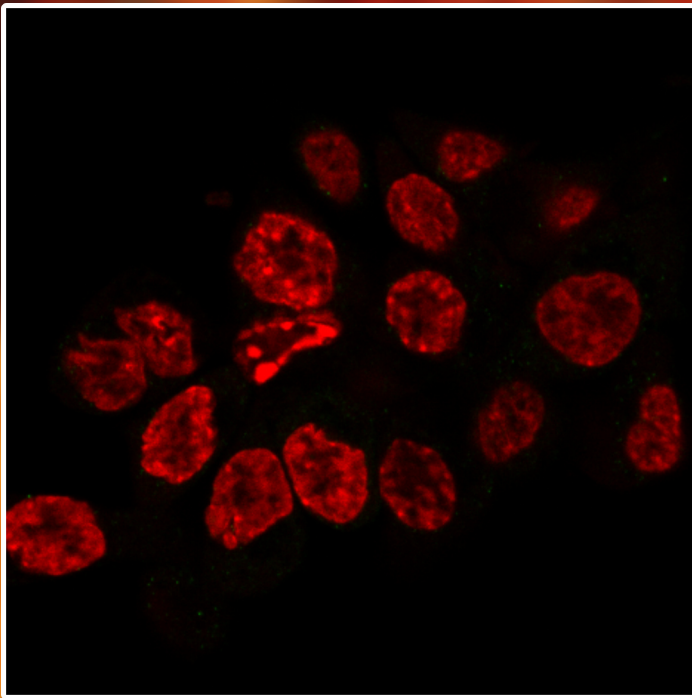
# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

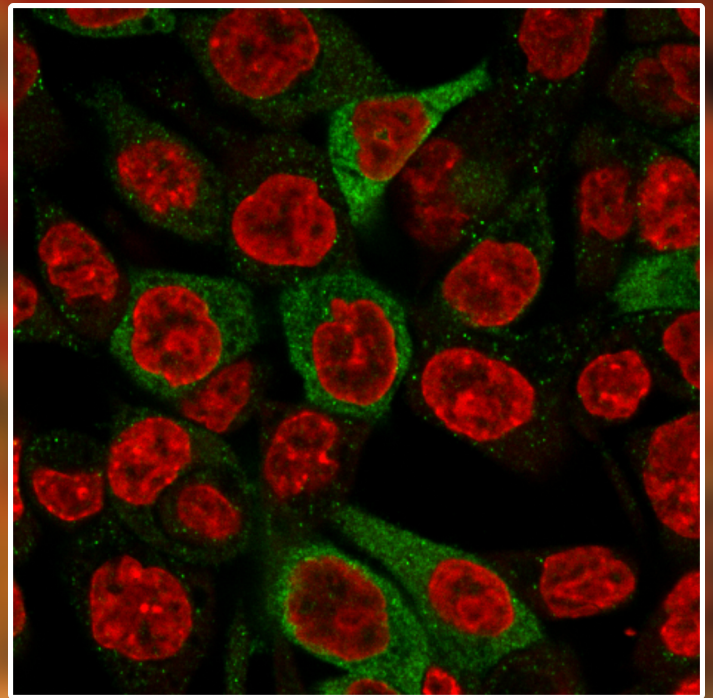
XLIV. évfolyam 3. szám

2020. szeptember

**vad típusú sejt**



**Tks4-KO sejt**



# 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 3. SZÁM**

**2020. szeptember**

## TARTALOMJEGYZÉK

*Címlapkép: Vad típusú és Tks4 hiányos (Tks4-KO) HCC 116 sejtek immunfluoreszcens jelölése fibronectin fehérjére (piros) és sejtmagi DAPI festésre (kék). A konfokális mikroszkópos képet készítette: Szeder Bálint (TTK, Enzimológia Intézet).*

### AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak ..... 3.

### HAZAI TUDOMÁNYOS MŰHELYEK

Csősz Éva: Képzelt riport a Debreceni Egyetem Proteomika  
Szolgáltató Laboratórium vezetőjével ..... 4.

### TUDOMÁNYOS CIKK

Horváth Lilla, Bősze Szilvia: Szalicilanilid származékok és  
peptidkonjugátumaik kémiai és in vitro jellemzése ..... 16.  
Szeder Bálint, Kudlik Gyöngyi, Takács Tamás, Kurilla Anita,  
Koprivanacz Kitti, Vas Virág, Buday László: A Tks állványfehérjék  
száz arca ..... 34.

### VISSZATEKINTÉS AZ ELMŰLT 50 ÉV KIEMELKEDŐ CIKKEIRE

Tőzsér József: Az antiretrovirális terápiában kialakuló  
gyógyszerrezisztencia új mechanizmusának molekuláris vizsgálata ..... 51.

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)

**AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI  
2020. MÁRCIUS 15. ÉS 2020. SZEPTEMBER 15.  
KÖZÖTT**

**Hermesz Edit**, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biológiai Intézet, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékének egyetemi docense több évtizedes oktatói munkája, valamint a biológiai tudományok népszerűsítésében vállalt szerepe elismeréseként **Magyar Arany Érdemkereszt polgári tagozat** kitüntetésben részesült.

**Hudecz Ferencet**, az MTA rendes tagját, az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet, Szerves Kémia Tanszék egyetemi tanárát az **MTA Természettudományi alelnökévé** nevezték ki.

**Kondorosi Éva**, az MTA rendes tagja, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont kutatóprofesszora **Az Európai Bizottság tudományos főtanácsadói testületének (Group of Chief Scientific Advisors)** tagja lett. A megbízás 3 évre szól.

**Nyitray Lászlót**, az MTA doktorát, az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszékének egyetemi tanárát az **MTA Doktori Tanács titkárává** választották.

**Gratulálunk a kitüntetetteknek!**

**KÉPZELT RIPIORT A DEBRECENI EGYETEM PROTEOMIKA SZOLGÁLTATÓ LABORATÓRIUM VEZETŐJÉVEL**

**Csősz Éva**  
**Debreceni Egyetem, ÁOK,**  
**Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet,**  
**Proteomika Szolgáltató Laboratórium**  
**e-mail: [cseva@med.unideb.hu](mailto:cseva@med.unideb.hu)**

Kedves Olvasó!

Mindenekelőtt előre szeretném bocsátani, hogy egyelőre szó sincs meghasonlásról. Azért választottam a laborbemutatásnak ezt a formáját, mert úgy gondoltam, hogy a laboratórium 15 évét egyszerűbb ilyen formában bemutatni, rálátást engedni a régi és a jelenlegi helyzetre. Természetesen joggal vetődik fel, hogy mi értelme van így kérdezgetni? És, ha saját magától kérdez az ember, akkor arra amúgy is igazán könnyű válaszolni. Igen, ez teljesen jogos felvetés, és erre nem is tudok mit mondani. Én tettem fel a kérdéseket, és én válaszoltam rájuk. Ez olyasmi, mint amikor az ember egymagában sakkozik. Tudja is, meg nem is a lépéseket, mert amikor benne van az egyik szerepben, akkor teljesen az adott szerephez alkalmazkodva próbál cselekedni.

Ugyanakkor egy ilyen riport jó lehetőség arra is, hogy végiggondoljuk honnan indultunk, számot adjunk arról, hol tartunk most, mit értünk el eddig és milyen további terveink vannak.

Bízom benne, hogy a Proteomika Szolgáltató Laboratórium múltját és jelenét élvezhető formában tudom bemutatni, tudományos eredményekkel és személyes megjegyzésekkel fűszerezve.

Jó olvasást kívánok!

### *Hogy kezdődött?*

A Proteomika Szolgáltató Laboratórium Tózsér József professzor úr vezetésével alakult 2005-ben azzal a céllal, hogy tudományos kutatásokhoz, valamint olyan K+F tevékenységhez, ahol magas szintű fehérje analízis szükséges, biztosítsa a tudományos és műszeres analitikai háttérrel. A laboratórium az akkori Orvos- és Egészségtudományi Centrum keretén belül, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által felügyelve és működtetve jött létre, kiváló lehetőséget teremtve a klinikai kutatások során felmerült kérdések, a rendelkezésre álló betegminták, valamint a korszerű fehérje analitikai platform összekapcsolására.

*Számodra hogyan kezdődött? Korábban is proteomikával foglalkoztál?*

Ez egy érdekes kérdés. Azt hiszem, számomra akkor kezdődött a történet, amikor a PhD tanulmányaim vége felé témavezetőm, Fésüs professzor úr jelezte, hogy a frissen végzett/végző kollégák közül nem engem választott a csapatába. Ez számomra akkor óriási törést jelentett. Nagyon szerettem volna továbbra is a transzglutaminázzal dolgozni, de úgy tűnt, ideje valami másba belekezdeni. Két kisgyerekekkel nem szívesen vágtam volna bele egy külföldi postdoc képzésbe, teljesen tanácstalan voltam a PhD utáni időszakot illetően. Felmerült az is, hogy hazamegyünk Erdélybe, vagy másfelé kezdek állás után nézni. Az ipart kizártam, mindenképp a kutatásban szerettem voltan maradni. Ekkor keresett meg Tőzsér professzor úr és állást ajánlott a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumban. PhD tanulmányaim alatt foglalkoztam kétdimenziós elektroforézissel, de a fehérje azonosításról és a tömegspektrométerekről fogalmam sem volt. Az igazság az, hogy a tanulmányaim során a fehérje azonosítás rész nem fogott meg igazán, valahogy úgy voltam vele, hogy ez az a terület, amivel nem igazán akarok foglalkozni. Ha jobban belegondolok, akkor gyakorlatilag nem én választottam a proteomikát, hanem a proteomika választott engem. Sok kétség közepette elvállaltam az állást. Visszagondolva azt hiszem, ez volt életem egyik legjobb döntése.

*Ha nem volt korábbi tapasztalatod, hogyan sikerült beletanulni ebbe az új rendszerbe?*

Az elején nagyon nehéz volt. Volt pár hónapom, amikor Dr. Boross Péter kollégám, aki részben a Tőzsér munkacsoportban, részben pedig a Proteomikán dolgozott, tanított engem. Ez a periódus nem tartott sokáig, ugyanis Péter Portugáliába ment egy jó nevű proteomika laborba, így gyakorlatilag egyedül maradtam egy asszisztenssel, akinek nem volt semmiféle proteomikai tapasztalata. Dr. Medzihradszky Katalin (Szegedi Biológiai Központ, Szeged) proteomika laborjában kétszer két hét gyorstalpaló tanulás, valamint a Per-Form Kft. által szervezett Tömegspektrometriás iskola után el kellett kezdeni a munkát. Szegeden kaptam egy alap „kiképzést” a MALDI segítségével történő fehérje azonosítással kapcsolatban, kaptam protokollokat és nagyon sok olyan hasznos tanácsot, amelyek segítségével a szolgáltató tevékenységet el lehetett indítani. Sokszor zsongott a fejem a sok új információtól, és nem is igazán tudtam mindent elsőre pontosan a helyén kezelni.

Péter beállította a készüléket, majd elutazott, én pedig egy ideig gyakorlatilag asszisztensi munkát végeztem: fehérjét emésztettem, „etettem” a készüléket

mintával és oldatokkal, elemeztem az adatokat. Minden nap úgy mentem be, hogy csak még ma működjön a rendszer! Közben olvastam a rendelkezésemre álló könyveket, protokollokat, és próbáltam megtanulni, megérteni a készülék működését, az ionok mozgását, a fragmentációt stb. Ez az állapot négy hónapig tartott, ez után állt le a rendszer. Így visszanezve, azt kell mondanom, hogy nagyon szerencsés voltam, mert ez egy HPLC-MS rendszer esetében igen hosszú leállásmentes üzemidő.

*Mi történt ezután? Miért bírt ez ilyen nagy jelentőséggel?*

Ezután következett a tanulás egy másik formája. Eddig könyvből tanultam, de innentől kezdve élesben ment minden. Mivel közvetlen segítségem nem volt, vettem a gépkönyvet, és próbáltam beazonosítani és elhárítani a hibát. Nagyon sok segítséget kaptam Dr. Szabó Páltól (TTK Műszercentrum, MS Metabolomika Kutatólaboratórium, Budapest), akivel gyakorlatilag napi telefonos kapcsolatban voltuk. Ő távdiagnosztikával és nagyon jó tippekkel próbált segíteni, valamint nagyon sokat tanultam a HPLC szervizestől, Fekete Attilától. Sajnos pár hónapig eltartott, amíg sikerült a problémát megtalálni és elhárítani. Ez a folyamat megismétlődött többször, így az első év végére már elég jól tudtam HPLC-t szerelni és hibát elhárítani. Tekintve, hogy még nagyon az elején jártunk, és pénzben nem nagyon bővelkedtünk, a szervizt általában csak akkor hívtuk, ha megvolt a probléma és azt a javítást/szerelést én nem tudtam elvégezni. Nagyon sokat tanultam ez idő alatt, és végtelenül hálás vagyok a segítőimnek! Egyedül, segítség nélkül, elbuktam volna.

*Térjünk át a vizsgálatokra. Sokat foglalkoztok a könny tanulmányozásával. Nem teljesen szokványos biológiai minta. Hogy jött ez az ötlet?*

Számomra ez már adott volt. Amikor 2008-ban a laborba kerültem, már volt egy működő projekt, amely során a Szemklinikán, Dr. Csutak Adrienne vezetésével gyűjtött diabéteszes retinopátiában szenvedő betegek könnyét vizsgálták a proteomika laborban. Én is bekapcsolódtam a vizsgálatokba, majd Dr. Boross Péter távozásával az adatelemzés gyakorlatilag rám maradt. Ez már ismerős terep volt számomra, mert a PhD során jelentős mennyiségű adatot kezeltem és elemeztem, ám a könnyvizsgálat teljesen új terület volt. Ahogy kezdtem beleásni magam a kérdésbe, nagyon sok érdekességet fedeztem fel. Olyan fehérjéket találtunk, amelyek segítségével a diabéteszes retinopátia ún. proliferatív, előrehaladott stádiuma előrejelezhető [1]. Meglepődve fedeztem fel, hogy ezek a fehérjék mind az ún. antimikrobiális és immunmodulátor peptidek/fehérjék (AMP) családjába tartoznak. Nagyon megfogott engem ez a fehérje

család, valamint a kémiai barrier, amely ezen fehérjék segítségével véd minket minden olyan testfelületünkön, ahol a szervezetünk érintkezik a külvilággal.

Nagyon szerencsésnek éreztem magam: volt egy érdekes dolog, amire felfigyeltem, és egy nagyon érzékeny, fehérje analitikai rendszerem. Gyakorlatilag minden egyben volt: fontos volt megismertetni a labort és munkáját, ezt pedig elgondolásunk szerint úgy lehetett leghatékonyabban elérni, hogyha tudományos kérdéseket teszünk fel és demonstráljuk, hogyan lehet ezeket megválaszolni a rendelkezésre álló proteomikai háttérrel. Mivel nagyon jól együtt tudtunk dolgozni Dr. Csutak Adriennel, aki azóta már a Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Szemészeti Klinikájának vezetője, több „könnyes” projektünk volt, ahol úgy gondolom, megfelelően sikerült bizonyítani a proteomika használhatóságát a biológiai minták tanulmányozására.

*Nagyon nehéz a könnyel dolgozni? Meg kell ríkatni az embert hozzá?*

A könnyel nagyon nehéz dolgozni, de leginkább azért, mert egyszerre nagyon kis, általában 2-5 µl-nyi mennyiséget tudunk gyűjteni. Megríkatni pedig senkit sem szeretnénk, ugyanis mi az ún. bazális könnyet vizsgáljuk, amely igen kis mennyiségben állandóan ott van a szem felszínén. Éppen ezért kifejezetten fontos, hogy úgy gyűjtsük a mintát, hogy semmiféle irritációt ne okozzunk. Ez azért lényeges, mert amúgy is viszonylag nagy a biológiai változatosság, nem szeretnénk ezt még azzal is tovább növelni, ahogy az egyes donorok reagálnak az irritációra. Több évbe telt, amíg kitapasztaltuk, hogyan lehet úgy gyűjteni a könnyet, hogy minimalizáljuk a gyűjtéssel kapcsolatos variációt.

*Milyen kérdéseket próbáltatok megválaszolni a könnyminták vizsgálatával?*

Nagyon sok érdekes kérdés merült fel, viszont nem minden kérdés megválaszolásához tudtunk elegendő mennyiségű és minőségű mintát gyűjteni. A diabéteszes retinopátián kívül vizsgáltuk Alzheimer-kórban szenvedő betegek könnyét. Megnéztük, hogy az AMP fehérjék mennyisége hogyan változik Alzheimer-kórban szenvedő betegek könnyében, és érdekes megfigyeléseket tettünk. Azt találtuk, hogy a könnymirigyek által termelt AMP fehérjék statisztikailag szignifikáns mértékben kevesebb, míg az epitel sejtek által termelt AMP, a dermcidin, nagyobb mennyiségben volt jelen a betegek könnyében [2]. Emellett a zöldhályogban szenvedő betegek könnyét is tanulmányoztuk, valamint azon betegek esetében, akik trabekulektómián estek át, vizsgáltuk a szemben lezajló sebgyógyulási folyamatokat [3, 4]. Nagyon meglepődtünk, hogy milyen kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a

szemben zajló sebgyógyulási folyamatokat illetően. Az adatok jelentős része a szaruhártyára korlátozódik, ami részben érthető, de a sclera, vagy a mélyebb rétegek sebgyógyulási folyamatai kevésbé ismertek. Ezen a téren végeztünk mi vizsgálatokat és feltártuk a gyulladásos folyamatok időzítésének fontosságát a sebgyógyulás során a későbbi lebenyt érintő komplikációk megjelenése szempontjából [3].

*Foglalkoztok verejtékkel is. Ez is adott volt, akárcsak a könny?*

Nem. Csak a könny volt adott. Nagyon megfogott engem az AMP család és kíváncsi voltam, hogy az egyik legkiterjedtebb kémiai barrier, a bőr felszínén található barrier esetében hogyan alakul az AMP-k mennyisége. Dr. Emri Gabriella bőrgyógyással közösen terveztünk egy projektet, amelynek során verejtéket gyűjtöttünk, és azt tanulmányoztuk. Megpróbáltuk azonosítani a verejték abundáns fehérjéit. Amint várható volt, gyakorlatilag ezek is az AMP családba tartoztak [5].

*Hogyan kerültek kapcsolatba a nyállal? Mert ugye jelentős nyálproteomikai vizsgálatokat is végeztek?*

Igen, ez egy érdekes történet. Már több éve foglalkoztunk a könny és a verejték vizsgálatával, a különböző betegségek diagnosztizálásához használható biomarker fehérjék azonosításával, amikor megkeresett minket Márton Ildikó professzor asszony a Fogorvostudományi Karról, hogy szeretne beadni egy OTKA pályázatot szájüregi laphámrák nyálbiomarkerek azonosítása céljából, amelybe genomikai és proteomikai vizsgálatokat is szeretne belevenni. Nagyon örültem a megkeresésnek, és elkezdtünk együtt dolgozni a nyál proteomikai vizsgálatán. Kifejezetten szerencsésnek érzem magam, hogy együtt dolgozhattunk. Azt hiszem, mindannyiunk számára egy igen eredményes együttműködés kezdődött akkor, és tart még a mai napig is. Több publikációt közöltünk a témában [6-8]. Sikerült két olyan potenciális nyál biomarkert azonosítani, amely a hazai populációban is feltehetően jól használható, valamint egy nagyon fontos felismeréssel lettünk gazdagabbak: a világ más országaiban biomarkerként azonosított fehérjék nem működtek a magyarországi populációban. Ez nagyon elgondolkodtató, mert a biomarkerek azonosítását célzó vizsgálatok általában egy viszonylag homogén populáció bevonásával történnek.

*Említetted, hogy a labor munkáját és az általa biztosított lehetőségeket meg kellett ismertetni a kutatóközönséggel. Ez hogyan történt?*

Tulajdonképpen két vonalon dolgoztunk. Egyrészt minden olyan lehetőséget



megragadtam, ahol tudományos és tudományos ismeretterjesztő előadás keretében beszélhettem a könnyvizsgálatokról és a laboratórium által biztosított analitikai lehetőségekről. Ez egész sok előadást jelentett, elsősorban Debrecenben, de jelentkeztem a hazai konferenciák gyakorlatilag mindegyikére. A másik vonal pedig az oktatás volt. Proteomika témában előadásokat készítettem és tartottam több tantárgy keretén belül, valamint 2010-től egy teljes féléves Proteomika kurzust indítottunk be, amely elméleti és gyakorlati ismereteket egyaránt nyújt az érdeklődők számára. Oktatási tevékenységünknek köszönhetően több százan hallhattak a proteomikáról és a proteomikai technikákról, az érdeklődők pedig gyakorlati ismereteket is szerezhettek.

*Ez így elég sok munka. Mind egyedül végezted?*

Az elején voltam csak egyedül, később csatlakoztak hozzám hallgatók. A laborunk jelenleg is nyitott a hallgatók számára, ami azt jelenti, hogy minden érdeklődő jöhet. Szívesen fogadtam az elején egyedül én, majd a későbbiekben munkatársaimmal együtt az érdeklődő hallgatókat. A kezdeteket tekintve, ha egyik oldalról nézzük, akkor akár azt is mondhatjuk, hogy „vak vezet világtalant” állapot volt a jellemző. Ez kétségtelenül igaz is, ugyanis az elején viszonylag kevés tapasztalattal rendelkezttem, de amit tudtam, szívesen megosztottam másokkal. Én inkább úgy fogalmaznék, hogy együtt tanultunk. Nagyon izgalmas időszak volt. Ha már hasonlatoknál tartunk, akkor inkább a sötét erdős hasonlatot használnám: úgy képzeltem ezt az időszakot, hogy egy vékonyka fénysugarú lámpással botorkálok a sötétben, és amire a lámpám rávilágít, arra rácsodálkozok. Ha valaki társult hozzám, én örültem, hogy a fénysugár által mutatott dolgok megcsodálásában van társam. Egy idő után több és több vékony fénysugaracska jelent meg, és már több dolgot is meg tudtunk együtt nézni. Ez a helyzet azóta sem változott, csak a lehetőségek bővülésével a fénysugarunk erőssége nőtt meg.

Nagyon örülök, hogy olyan kiváló PhD hallgatókat volt alkalmam vezetni, mint Kalló Gergő és Márkus Bernadett, akik azóta munkatársaim is. A hallgatók szerencsére folyamatosan jönnek: van, aki témát szeretne kidolgozni nálunk a laborban, és van olyan is, aki csak érdeklődik, és megfigyelőként szeretne tapasztalatot szerezni. Számos belföldi és külföldi hallgató látogatta meg laborunkat, és több Erasmus vagy Makovecz ösztöndíjas szerzett tapasztalatot nálunk. A labor folyamatosan bővült, a jelenlegi nagyon jó csapatban rajtam kívül dolgozik egy igen tehetséges postdoc, Kalló Gergő, két diplomás kolléga:

Kovács Renáta biotechnológus és Guba Andrea vegyész, Kökényesiné Csáki Julianna asszisztens, illetve két PhD hallgató: Ajneesh Kumar és Erdenetsetseg Nokhoijav. A csapatunk jelenleg 4 lelkes TDK hallgatóval (Bába Orsolya, Bertók Nikolett, Moagi Gontse Mabuse, Vo Minh Doan), valamint Tózsér József professzor úrral teljes, aki rendületlenül segíti mindenben a laboratóriumunkat. Azt hiszem, az ő útmutatásai nélkül, bolyongó fényű lámpáink sokszor ide-oda cikáztak volna ahelyett, hogy egységesen és hatékonyan világítottak volna.



**Ad-hoc csoportkép a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumban.** A képen balról jobbra Guba Andrea, Ajneesh Kumar, Kalló Gergő, Csósz Éva, Erdenetsetseg Nokhoijav és Kökényesiné Csáki Julianna látható.

### *Milyen a műszerpark? Hogyan fejlődött az évek során?*

Mikor a laborba kerültem, volt egy MALDI-TOF (Sciex), illetve egy 4000QTRAP (Sciex) készülék összekapcsolva Agilent 1100 (Agilent) nano HPLC-vel, valamint egy kétdimenziós elektroforézis rendszer (Bio-Rad). Azóta a készülékállományunk jelentősen átalakult: a MALDI-TOF készülékünket mindannyiunk nagy bánatára leselejteztük, mert már nem volt gazdaságosan javítható, és új készülékek kerültek a laborba. Jelenleg van egy Orbitrap Tribid tömeg-

spektrométer nanoUPLC-vel, illetve Trancend TurboFlow mintaelőkészítő rendszerrel (ThermoScientific), egy 5500 QTRAP tömegspektrométer (Sciex), két H-class UPLC (Waters) és még működik a 4000 QTRAP tömegspektrométer (Sciex) a hozzá kapcsolt EasynLC II nano HPLC-vel (Bruker). Ezen kívül üzemel a kétdimenziós elektroforézis rendszer (Bio-Rad), és mindezekhez rendelkezünk a megfelelő adatelemző szoftverekkel.

*Ezzel a műszerparkkal gondolom, igen széles analitikai spektrumot tudtok lefedni. Milyen fő analíziseket végeztek?*

Igen, ezekkel a készülékekkel már proteomikai és metabolomikai kérdéseket egyaránt meg tudunk válaszolni. A fehérjék esetében lehetőség van a fehérjék azonosítására, jelöléssel vagy jelölés nélkül történő kvantitálására, célzott kvantitatív proteomikai vizsgálatok kivitelezésére, fehérjék poszt-transzlációs módosításainak meghatározására, valamint intakt fehérjék vizsgálatára. A kismolekulák esetében lehetőség van az egyes vegyületszoptok azonosítására és - ha szükséges - kvantitálására. Jól beállított módszerünk van az aminosavak és biogén aminok vizsgálatára, valamint mintaelőkészítés nélküli direkt analízist is el tudunk végezni komplex biológiai mátrixokban a Turboflow rendszer segítségével.

*Gondoltad volna tíz évvel ezelőtt, hogy ilyen sok mindent fogtok vizsgálni a laborban?*

Egyáltalán nem, habár nem is igazán gondolkodtam akkor ennyire előre. Próbáltam minden nap túlélni. Megfogadtam Dr. Szabó Pál javaslatát, hogy válasszak ki egy irányt, amihez ragaszkodom, és céltudatosan haladjak e felé, „mert ha az embert bedobják a mélyvízbe, és csak úgy úszik néha erre, néha arra, akkor elfogy az ereje mielőtt partot érne”. Én feladatként kiválasztottam a fehérje azonosítást, majd a kvantitatív proteomikát, és minden tudásunkkal, minden energiánkkal ezt a feladatot próbáltuk a tőlünk telhető legjobban megoldani. Úgy érzem, egy idő után már elég szilárdan meg tudtuk állni és talpon maradni a laborral ezen a talajon, a többi csak úgy jött. Különböző lehetőségek adódtak, és megpróbáltuk mindegyikből a lehető legtöbbet kihozni. Most itt tartunk.

*Mit tartasz a legnagyobb elismerésnek?*

Szerencsére elismerésben nincs hiány: gyakorlatilag minden új megrendelés, amely a laborunkba érkezik, elismerés. Ha ismernek minket, és megbíznak a szakértelmünkben, a munkánkban, tanácsot kérnek tőlünk és ránk bízzák

mintáik vizsgálatát, az nagy elismerés számunkra. Ugyanakkor, ha TDK hallgató érkezik a laborunkba, és megtisztel minket a bizalmával, az ugyancsak elismerés. Ehhez hasonlóan, amikor elfogadnak egy-egy kéziratot publikálásra, ez szintén elismerés számunkra. Viszont az egyik legnagyobb elismerés nekem az volt, amikor a Medzihradzky laboratóriumból felhívtak és tanácsot kértek kvantitatív proteomikai kísérlet megtervezéséhez. Amint korábban is említettem, Szegeden tanultam, és nagyon hálás vagyok emiatt. Úgy alakult, hogy a számunkra fontos biológiai kérdések megválaszolásához elsősorban a kvantitatív proteomika eszköztárát kellett használnom. Gyakorlatilag munkám jelentős része az ezzel kapcsolatos módszerfejlesztéshez, valamint a kvantitatív proteomikai kísérletek kivitelezéséhez kötődik, míg az SZBK-ban működő labor főként poszt-transzlációs módosítások vizsgálatával foglalkozott. Nagyon felnézek mai napig is a Medzihradzky csapatra, akik számomra szakmailag követendő példaként állnak előttem, és ezért óriási megtiszteltetés volt számomra, hogy én adhattam tanácsot kvantitatív proteomikai kérdéskörben azoknak, akiktől tanultam.

*De azért voltak más, kézzel foghatóbb elismerések is?*

Igen, természetesen. Kalló Gergő kollégám több elismerést is kapott (Astellas Pharma díj, Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj), hallgatóink rendszeresen kapnak különféle díjakat, ösztöndíjakat. Én kaptam Bolyai János kutatási ösztöndíjat, amire különösen büszke vagyok, PD OTKA-t két alkalommal, FK OTKA-t, valamint megválasztottak a MBKE keretén belül működő Proteomika Szakosztály elnökének, és az EuPA (Európai Proteomikai Társaságok Szövetsége) őszi tisztújító választásán egy vezetőségi pozícióra jelöltek.

*Milyen a labor kapcsolata a többi hazai proteomika laborral? Gondolom, nem sokan foglalkoznak itthon proteomikával.*

Jó a kapcsolat. Mindegyik laborban fantasztikus, nyitott kutatók dolgoznak, akiknek rengeteg jó ötletük van. Én nagyon örülök, hogy kollaborációs munkák, illetve a Proteomika Szakosztály kapcsán is velük együtt dolgozhatok. Ez nagyon jó érzés. Tényleg nem sok proteomikával foglalkozó labor van Magyarországon. A Proteomika Szakosztályban heten képviseltetik magukat (TTK, MS Proteomika Kutatócsoport, Budapest; ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Budapest; Szegedi Egyetem, Peptidkémiai Laboratórium, Szeged; Pécsi Tudományegyetem, Proteomika Laboratórium, Pécs; Debreceni Egyetem, Proteomika Szolgáltató Laboratórium, Debrecen; ELTE, Proteomikai Csoport, Budapest; SZBK, Proteo-

mikai Laboratórium, Szeged). Ezen kívül Dr. Szabó Pál laboratóriuma (TTK Műszercentrum, MS Metabolomika Kutatólaboratórium, Budapest) is foglalkozik proteomikai kérdésekkel, valamint Dr. Guttman András laboratóriuma (Debreceni Egyetem, Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium, Debrecen), ahol elsősorban glikomikával foglalkoznak, de proteomikai kérdéseket is érintenek.

*Tudnál pár szót mondani a Proteomika Szakosztályról? Mikor jött létre? Mik a céljaitok?*

A Proteomika Szakosztály 2019. márciusában az Egerben megrendezett Hungarian Molecular Life Sciences konferencián alakult azzal a céllal, hogy egységes platformot biztosítson a hazai proteomika laboratóriumokban dolgozóknak. Fő célunk az oktatás, tanulás és önképzés mellett a közös pályázatok beadása, valamint a munkacsoportok közötti kollaborációk elősegítése. Nagy hangsúlyt fektetünk a hallgatók képzésére: elindítottunk egy konferencia-sorozatot „Tanuljunk egymástól” címmel, ahol a PhD hallgatók lehetőséget kapnak a munkáik bemutatására, az előadás gyakorlására, illetve bátorítjuk a nemzetközi konferenciákon való részvételt. Tekintve, hogy a Proteomika Szakosztály az EuPA tagja, valamint a Magyar Biokémiai Egyesület a FEBS tagja, a Szakosztály tagjainak számos lehetőségük van az EuPA és a FEBS konferenciákon és kurzusokon történő kedvezményes részvételre. Én személyes küldetésemnek tekintem a hazai proteomikai műhelyek megismerését az európai kutatóközönséggel, és a magyar proteomika „bekapcsolását” az európai köztudatba. Ehhez nagyon fontos a konferencia-részvétel, a kollaborációs kapcsolatok kiépítése, közös pályázatok beadása stb. Bátorítanék ez úton is mindenkit, aki szeretne részt vállalni ebben a munkában, hogy csatlakozzon a Proteomika Szakosztályhoz! A szakosztályról és a belépésről további tájékoztatást a Magyar Biokémiai Egyesület honlapján (<http://mbkegy.hu/apps/mbkegy/pages/index.php>) található, illetve e-mailben lehet keresni engem, vagy a Szakosztály titkárát, Dr. Klement Évát (Proteomikai Laboratórium, SZBK, Szeged).

*Hogyan tovább? Milyen terveitek vannak?*

Szerencsére tervekben nem szűkölködünk. Rengeteg kérdésünk van, és ezek közül néhányhoz minták is rendelkezésre állnak. Ezeket próbáljuk meg első körben megválaszolni. A fehérjék mellett szabad aminosavakat, biogén aminokat, vitaminokat is próbálunk vizsgálni, valamint a könny-, nyál- és verejtminták mellett elkezdtük a vérminták vizsgálatát is. A vizsgált

betegségek továbbra is a cukorbetegség, szemet érintő komplikációja a diabéteszes retinopátia, elhízás, zöldhályog, szájüregi laphámrák, valamint a szájüregi daganatmegelőző állapotok: a lichen és a leukoplákia. A cél a proteóm és metabolóm vizsgálata az említett kóros állapotokban, valamint az adatok rendszerszintű, interakciós hálózatokba rendezett vizsgálata. Kidolgoztunk egy olyan hálózatképző módszert, amely a fehérjék esetében mind a minőségi, mind a mennyiségi információt figyelembe tudja venni [9], és ezt a súlyozott hálózati modellt kívánjuk használni a komplex adatelemzés során. Természetesen, nyitottak vagyunk a kollaborációra. Minden kérdés megválaszolása egy érdekes kaland, amely sok tanulási lehetőséget biztosít.

*Akkor nem marad más hátra, mint sok sikert kívánni a továbbiakhoz! Köszönöm a beszélgetést!*

Köszönöm szépen és köszönöm a lehetőséget!

#### Irodalomjegyzék

- [1] Csosz, É., Boross, P., Csutak, A., Berta, A., Tóth, F., Póliska, S., Török, Z., and Tozsér, J. (2012) Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy. *J Proteomics*, **75**: 2196–2204.
- [2] Kalló, G., Emri, M., Varga, Z., Ujhelyi, B., Tozsér, J., Csutak, A., and Csosz, É. (2016) Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer's disease reveal potential tear diagnostic biomarkers. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0158000
- [3] Csósz, É., Tóth, N., Deák, E., Csutak, A., and Tózsér, J. (2018) Wound-healing markers revealed by proximity extension assay in tears of patients following glaucoma surgery. *Int J Mol Sci*, 10.3390/ijms19124096
- [4] Csósz, É., Deák, E., Tóth, N., Traverso, C. E., Csutak, A., and Tózsér, J. (2019) Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications. *FEBS Open Bio*, **9**: 1020–1028.
- [5] Csosz, É., Emri, G., Kalló, G., Tsaprailis, G., and Tozsér, J. (2015) Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. *J Eur Acad Dermatology Venereol*, **29**: 2024–2031.
- [6] Csosz, E., Márkus, B., Darula, Z., Medzihradzky, K. F., Nemes, J., Szabó, E., Tozsér, J., Kiss, C., and Márton, I. (2018) Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. *FEBS Open Bio*, 10.1002/2211-5463.12391

- [7] Marton, I. J., Horvath, J., Labiscsak, P., Markus, B., Dezso, B., Szabo, A., Tar, I., Piffko, J., Jakus, P., Barabas, J., Barabas, P., Olasz, L., Kover, Z., Tozsér, J., Sandor, J., Csosz, E., Scholtz, B., and Kiss, C. (2019) Salivary IL-6 mRNA is a Robust Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med*, 10.3390/jcm8111958
- [8] Csosz, É., Lábiscsák, P., Kalló, G., Márkus, B., Emri, M., Szabó, A., Tar, I., Tozsér, J., Kiss, C., and Márton, I. (2017) Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS One*, **12**: 1–21.
- [9] Csosz, É., Tóth, F., Mahdi, M., Tsaprailis, G., Emri, M., and Tozsér, J. (2019) Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. *BMC Bioinformatics*, **20**: 1–18.

## SZALICILANILID SZÁRMAZÉKOK ÉS PEPTID-KONJUGÁTUMAIK KÉMIAI ÉS *IN VITRO* JELLEMZÉSE

Horváth Lilla<sup>1, 2</sup>, Bősze Szilvia<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport,  
<sup>2</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem,  
Hevesy György Kémia Doktori Iskola

### Összefoglalás

A szalicilanilid (2-hidroxi-*N*-fenilbenzamid) származékok rendkívül változatos vegyületek, és számos biológiai hatásukat írták le. Kiemelkedő antiparazita és antibakteriális hatásuk mellett antivirális és tumorölő szerepüket is vizsgálták. Ezen vegyületek szelektivitása, specificitása és biohasznosíthatósága növelhető hordozópeptidekhez történő konjugálással. A hordozópeptidek lehetnek egyes sejttípusokra jellemző sejtfelszíni struktúrák ligandumai. A hordozópeptidek alkalmazásával növelhető a vegyületek sejtbejutása, ami rendkívül fontos többek között az intracelluláris patogének (pl. *Mycobacterium*ok) és a tumorelles hatás növelésében. Jelen összefoglalóban antituberkulotikus és antitumor hatású szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumaik előállítását, kémiai sajátságait és *in vitro* hatásait foglaltuk össze.

### Bevezetés

A szalicilanilid típusú vegyületek széleskörű biológiai aktivitással rendelkeznek. Jelenleg a klinikumban parazitaellenes szerként alkalmaznak szalicilanilid származékokat (niklozamid, oxiklozanid). Emellett antibakteriális, antivirális, antitumor és gombaölő hatásuk is jól ismert [1]. A szalicilanilid származékok hatékonyan gátolnak egyes Gram-pozitív baktériumokat, például meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*, vankomicin-rezisztens *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* és *Pasteurella multocida* [2-4] törzseket. Számos antimikobakteriális hatású vegyületet is azonosítottak, melyek hatékonyak *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H<sub>37</sub>Rv és különböző rezisztens törzsek ellen; valamint atípusos *Mycobacterium*ok például *M. avium*, *M. kansasii*, és a gyorsan nöövő *M. abscessus* ellen is [5, 6]. A szalicilanilid vegyületek antimikrobiális hatása mellett az antitumor szerepük is jól ismert [7, 8].

A *Mycobacterium* nemzetséghez számos intracelluláris patogén tartozik. Ezek közül legismertebbek a tuberkulózis betegséget okozó *Mtb* komplex tagjai. A tuberkulózis napjainkban is komoly népegészségügyi probléma, hiszen az



Egészségügyi Világszervezet becslése szerint az emberiség egynegyede fertőzött a *Mtb* baktériummal [9]. Habár ezek túlnyomó része látens fertőzöttség, az egyre szélesebb körben alkalmazott immunterápiák (pl. autoimmun betegségek esetében) és egyéb faktorok (pl. HIV fertőzöttség, öregedés, alultápláltság, alkoholizmus) hatására kialakulhat az aktív betegség. További kihívás a tuberkulózis gyógyításában az antibiotikum-rezisztens törzsek megjelenése és terjedése, amely sürgeti az új antituberkulotikus hatású vegyületek fejlesztését [10]. Az atipikus vagy nem tuberkulotikus mikobaktériumok (NTM) körében is számos kórokozó ismert. Ezen baktériumok elterjedtek a talajban, vízkészletekben és a vízhálózatban [11]. Számos oportunista patogén közül kiemelkedő jelentőségű a *M. abscessus*, amely jellemzően nozokomiális fertőzésként légzőszervi, bőr és nyálkahártyát érintő kórképekért felelős. A *M. abscessus* az egyik leginkább antibiotikum-rezisztens mikobaktérium, amely megnehezíti a kórokozó elleni hatékony védekezést [12]. Az asztrocita eredetű glioblasztóma (GBM) egy rendkívül változatos tumortípus, rossz prognózissal és évtizedek óta változatlan kezelési protokollal [13, 14]. A glioblasztóma gyógyszeres kezelése rendkívül nehéz feladat, hiszen a hatóanyagok át kell jutniuk a vér-agy gáton, szétterjednie az agyban, és specifikusan a tumorsejtekre kell kifejtenie a hatását. Tovább nehezíti a tumor eliminációját az ún. tumor őssejtek. A tumor őssejtek speciális, kezdetlegesen differenciálódott, aszimmetrikus osztódásra és önmegújításra képes sejtpopuláció a tumoron belül. Ezen sejtek jelenléte újabb, differenciáltabb és heterogén tulajdonságú tumorsejt populációt eredményez. A tumor őssejtek jelenléte tovább növeli a tumor agresszivitását és nehezíti az adott terápia sikerességét, illetve hozzájárul a daganat kiújulásához a sebészeti/gyógyszeres kezelést követően. Mindezekon kívül a tumor őssejtek jellemzően rezisztensek a legtöbb gyógyszeres terápiára, pontos jellemzésük és célzásuk fontos kutatási feladat [15].

A daganatsejtek sok tekintetben különböznek az egészséges sejtektől. Az eltérések pontos feltárása lehetőséget nyújt új daganatellenes szerek fejlesztésére. Egyes hatóanyagok a tumorsejtek megváltozott anyagcseréjén keresztül célozzák azokat (metotrexát, 5-fluorouracil, L-aszparagináz) [16]. Számos jelátviteli pálya (MAPK, PI3/Akt/mTOR, HER2, EGFR, VEGF) működése változik tumorképződés során, ezek is lehetséges terápiás célpontok [17, 18]. A sejthalál folyamataiban történő változások is jól ismertek. Az apoptózis szerepe és terápiás célzása jól ismert [19], ám az autofágia szerepe a tumorképződésben és a tumorok fennmaradásában több kérdést is felvet. Habár az autofágia segít

a tumorsejtek homeosztázisának fenntartásában, a túlzott autofágia sejthalált vált ki [20]. Így lehetséges, hogy egy tumorsejt populáción belül az autofágia apoptózis indukáló és gátló hatással is rendelkezik [21].

Az autofágia (a sejtek „önemésztése”) jelensége számos biológiai folyamatban játszik szerepet: intracelluláris aggregátumok és hibás sejtorganellumok eliminációja, antigén prezentáció, sejtöregedés, genom instabilitás elleni védelem és nekrozis gátlás. Az autofágia egy többlépéses folyamat, amely során egy jellemző, kettős membránból álló autofagoszóma keletkezik, amely lizoszómával egyesülve autofagolizoszómát alkot [22]. Továbbá, leírtak egy autofágián alapuló sejthalál mechanizmust, az autózist, amelyet megfigyeltek tumorsejteken is [23].

Új hatóanyagok azonosítása mellett fontos kutatási feladat a hatóanyagok célzott sejtbejuttatása és szelektivitásuk növelése. Jellemző sejtfelszíni struktúrák (pl. receptorok) peptid ligandumai használhatók célbajuttató egységként. Hatóanyagok hordozópeptidekhez konjugálásával jobb biohasznosíthatóság, valamint nagyobb célsejt specificitás és receptor-mediált endocitózis révén megnövekedett sejtbejutás érhető el. A tuftsin egy természetes tetrapeptid (humán: TKPR, kutya: TKPK), melyet széleskörű biológiai aktivitás jellemez: immunstimuláló, antitumor és antibakteriális hatása van [24]. A tuftsin liganduma a neuropilin-1 receptornak, és a megfelelően tervezett tuftsin származékok alkalmasak lehetnek többek között alveoláris makrofágok (az egyik legjellemzőbb gazdasejtjei a *Mtb* intracelluláris kórokozónak), illetve glioblasztóma sejtek célzására [25, 26]. A neuropilin receptorok transzmembrán fehérjék, melyek részt vesznek az immunitásban és bizonyos tumoros elváltozásokkal is kapcsolatba hozhatók. Egyes vaszkuláris endotheliális növekedési faktorok (VEGF) és 3. osztályú szemaforinok koreceptoraként fejtik ki széleskörű biológiai hatásukat. Elősegítik az angiogenezist, az endotheliális sejt vándorlást és a sebgyógyulást. Tumoros megbetegedések esetén rossz prognózissal társul a neuropilinek expressziója, ami magyarázható a nagyszámú tumor progressziót elősegítő kötőpartnerrel [27].

Munkánk során új antimikobakteriális hatású, illetve glioblasztóma gátló szalicilanilid származékokat azonosítottunk. Ezen származékokból sejtbejutásuk és szelektivitásuk növelése érdekében tuftsin származékokat tartalmazó peptid-konjugátumokat állítottunk elő. Jelen összefoglalóban a szabad vegyületek és peptidkonjugátumok kémiai és *in vitro* funkcionális jellemzését mutatjuk be.

## Anyagok és módszerek

### *Felhasznált anyagok*

A peptidszintézis során használt 9-fluorenilmetiloxikarbonil (Fmoc) aminosavszármazékokat és a 4-(2', 4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamidonorleucil (Fmoc-Rink Amid MBHA) gyantát az Iris Biotech (Marktredwitz, Németország) forgalmazta. A peptidszintézis során használt vegyszereket, mint *N,N*-dimetil-formamid (DMF), diklórmétán (DCM), *N*-metilpirrolidon (NMP), trifluoecetsav (TFA), 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én (DBU), *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), piperidin, acetonitril, 5(6)-karboxifluoreszcein (Cf), triizopropilszilán (TIS) a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) forgalmazta. Az *in vitro* vizsgálatok során használt vegyületek és a sejt kultúrák fenntartásához használt sejtenyészítő médiumok és vegyszerek: dimetilszulfoxid (DMSO), (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium)-bromid (MTT), nátrium-dodecil-szulfát (SDS) (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), tripszin, glutamin, RPMI-1640, DMEM magzati borjú savó (foetal bovine serum, FBS) (Lonza™, Bázél, Svájc).

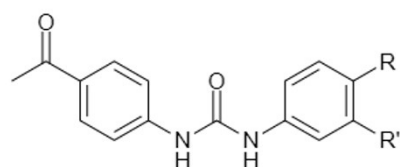
### *Konjugálható szalicilanilid származékok előállítása*

Az új szalicilanilid származékok: 4-aminoszalicilsav származékok (MK7, MK8, MK9) és szalicilanilid 4-formilbenzoátok (SalBenz1, SalBenz2) [5] tervezését és szintézisét Jarmila Vinšová kutatócsoportjában (Department of Organic and Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University; Hradec Králové, Csehország) végezték. A sematikus szerkezetek az 1. ábrán láthatók.

### *Hordozópeptidek előállítása szilárdfázisú peptidszintézissel Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával*

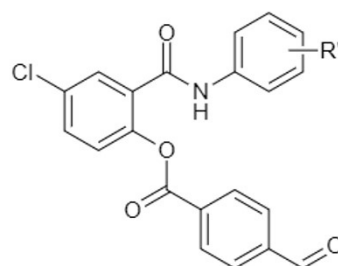
A tuftsin egységeket tartalmazó [TKPKG]<sub>n</sub> (n = 1-4) hordozópeptideket [28] Fmoc/*tert*-butil szilárdfázisú peptidszintézissel manuálisan állítottuk elő Fmoc-Rink Amid MBHA polimer hordozón. Az Fmoc hasítóelegy összetétele 2% piperidin és 2% DBU és 96% DMF (V/V%), a kapcsolószer pedig DIC/HOBt elegy volt. Előállítottunk a konjugációhoz aminosav-oxiacetilézett és az *in vitro* sejtbejutási vizsgálatokhoz Cf-nel fluoreszcensen jelölt peptidszármazékokat [29]. A peptidszekvencia felépítését követően az oldallánc védőcsoportok és a peptid hordozóról való hasításához 95% TFA-t és 5% desztillált vizet (V/V%) tartalmazó elegyet használtunk. A hasított, nyers termékeket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, a kapott termékek homogenitását analitikai RP-HPLC-vel határoztuk meg [30], a tömegpontosságot pedig nagy felbontású tömegspektrométerrel vizsgáltuk (Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™

tömegspektrométer - Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország – pozitív mód, 3  $\mu$ l/perc áramlási sebesség, 200-2000  $m/z$  tömegtartomány). A spektrumok kiértékelését Thermo Scientific™ Xcalibur™ szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) végeztük.



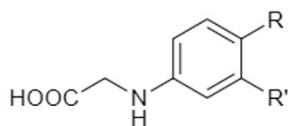
**MK7**  $C_{17}H_{16}N_2O_5$ ,  $M_{\text{átlagos}}$ : 328,32

**MK8**  $C_{16}H_{14}N_2O_5$ ,  $M_{\text{átlagos}}$ : 314,30



**SalBenz1**  $C_{22}H_{13}BrClF_3NO_4$ ,  $M_{\text{átlagos}}$ : 447,79

**SalBenz2**  $C_{21}H_{12}Cl_3NO_3$ ,  $M_{\text{átlagos}}$ : 448,68



**MK9**  $C_{10}H_{11}NO_5$ ,  $M_{\text{átlagos}}$ : 225,20

**1. ábra. A szalicilanilid származékok alapváza, az egyes származékok rövidítése, összegképlete, valamint molekulatömeg ( $M_{\text{átlagos}}$ ) adatai.** MK: 4-aminoszalicilsav származékok (R:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COOCH}_3$ , R':  $-\text{OH}$ ), SalBenz: szalicilanilid 4-formilbenzoát származékok (R'': 4- $\text{CF}_3$ , 3,4-diCl).

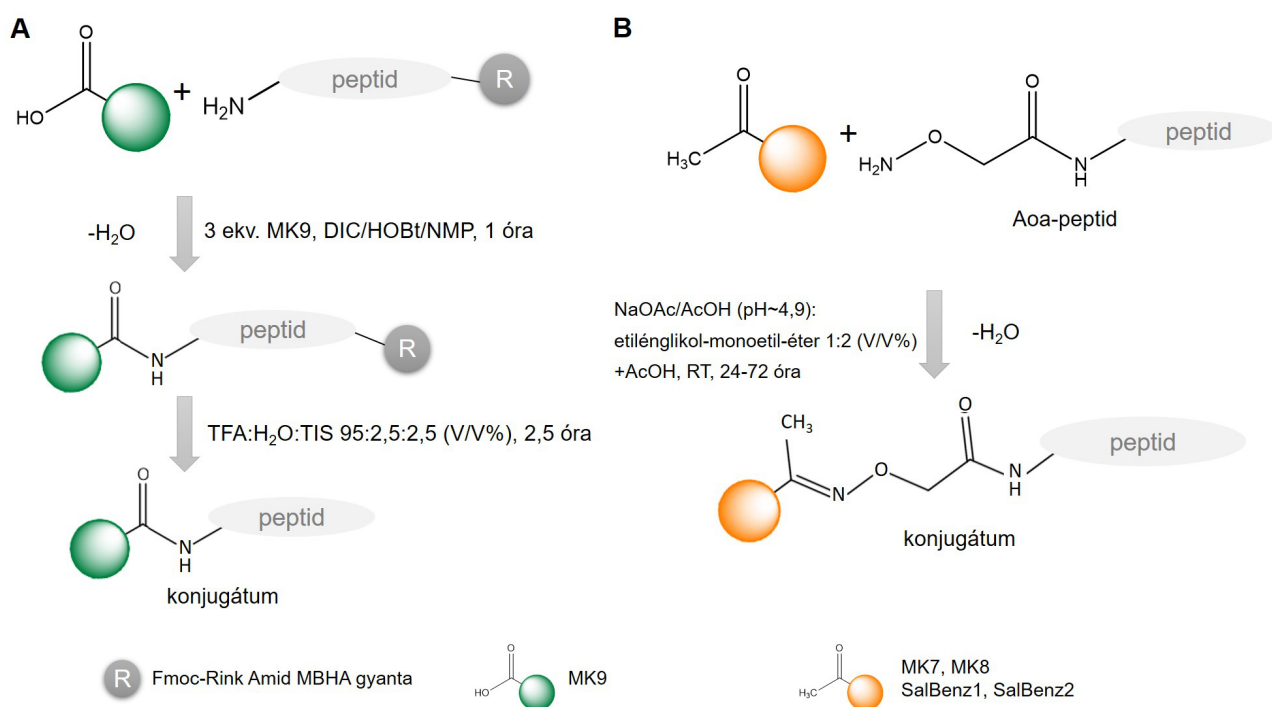
### Peptidkonjugátumok szintézise amidkötés és oximkötés kialakításával

A szalicilanilid származékok és peptidek között többféle kötéstípus kialakítására nyílik lehetőség. A szabad vegyületek karboxilcsoportja (MK9) és a peptidek N-terminálisa között amidkötés, míg a karbonilcsoport (MK7, MK8, SalBenz1, SalBenz2) és aminoszalicilcsoport között oximkötés alakítható ki. Az amidkötés kialakítása polimer hordozón, DIC/HOBt kapcsolószerekkel készült (2.A ábra), a konjugátumok további feldolgozása a peptidszintézisnél leírtak szerint történt.

Oximkötés kialakítása oldatfázisban, enyhén savas körülmények között (pH~4,9, nátrium-acetát/ecetsav puffer, a reakcióelegy koncentrációja ~6-8 mg/ml), az aminoszalicilcsoportot tartalmazó szalicilanilid származékok között történt (2.B ábra). A reakcióelegyek tisztítására félpreparatív RP-HPLC rendszert használtunk (Knauer, Bad Homburg, Németország, A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz (V/V%), B eluens: 0,1% TFA / acetonitril:  $\text{H}_2\text{O}$  = 80:20 (V/V%), Phenomenex Jupiter C18 oszlop (10  $\mu$ m, 90 Å, 10 x 250 mm, Torrance, CA, USA), áramlási sebesség: 4 ml/perc, detektor:  $\lambda$  = 220 nm), a tisztított termékek homogenitását és tömegpontosságát a már ismertetett módon vizsgáltuk.

### A konjugátumok stabilitásának meghatározása

A konjugátumok stabilitását vizsgáltuk az *in vitro* kísérletek során alkalmazott körülmények között. Így a vegyületek stabilitását a minimális inhibíciós koncentráció (MIC) érték meghatározáshoz hasonlóan a vegyületek DMSO törzsoldataiból (4 mg/ml) 31 napig 37 °C-on; és a citosztatikus hatás, illetve sejtbetűtési és lokalizációs vizsgálatoknak megfelelően 24 óráig (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 2,5% magzati borjú savót (fetal bovine serum, FBS) tartalmazó sejtenyésztő médiumban (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640) vizsgáltuk [30].



**2. ábra. A hatóanyag és hordozópeptid konjugátumok szintézise A) amidkötés és B) oximkötés kialakításával.** DIC: *N,N'*-diizopropilkarbodiimid, HOBt: 1-hidroxibenzotriazol, NMP: *N*-metilpirrolidon, TFA: trifluorecetsav, TIS: triizopropilszilán, Aoa-: aminooxiacetil-, NaOAc/AcOH: nátrium-acetát/ecetsav puffer.

### MIC érték meghatározása *Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* tenyészetben

A szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumok antimikobakteriális hatását *Mtb H<sub>37</sub>Rv* tenyészetben határoztuk meg „hígítási leves” módszerrel. A vegyületekből tíztagú hígítási sort készítettünk 0,5-200 mg/ml koncentrációtartományban, majd folyékony Sula táptalajt tartalmazó csövekbe pipettáztuk az oldatokat. A csöveket standard számú baktériummal inokuláltuk, majd 4 hét inkubációt (37 °C) követően meghatároztuk a minimális inhibíciós koncentrációt, azaz azt a legkisebb koncentrációt, ahol szabad szemmel nem tapasztalható baktérium növekedés. A hatásosság (inhibíció) ellenőrzése érdekében a csövekből szilárd Löwenstein-Jensen táptalajra oltottunk, majd 4 hét (37 °C) elteltével meghatároztuk a telepkező egységek (TKE) számát [31-34].

### *A vegyületek szelektivitásának meghatározása, az in vitro citosztatikus hatás vizsgálata*

A szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását kolorimetriás tetrazólium - MTT teszttel határoztuk meg [35, 36]. A vegyületekből nyolctagú hígítási sort készítettünk  $1,28 \times 10^{-3}$ - $200 \mu\text{M}$ , illetve  $6,4 \times 10^{-4}$ - $50 \mu\text{M}$  koncentráció tartományban, majd a sejteket kezeltük az anyagokkal. Az inkubációt követően (20-24 óra,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) mostuk a sejteket. Citosztázis meghatározása esetén a sejteket továbbtenyésztettük, majd MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium)-bromid) oldattal (2 mg/ml) kezeltük. Mitokondiális enzimek az MTT festéket vízoldhatatlan, lila színű formazán származékká redukálják. A kicsapódott származékot DMSO-ban oldottuk, ELISA readerrel (Labsystems iEMS reader, Helsinki, Finnország) az abszorbanciát  $\lambda=540$  és  $620 \text{ nm}$ -en meghatároztuk, és kiszámoltuk a citosztatikus hatást. A kapott értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk, és illesztett görbe segítségével meghatároztuk az  $\text{IC}_{50}$  (medián gátlási koncentráció, half maximal inhibitory concentration) értékeket.

### *Az LC3-I/II autofágia fehérje markerek kimutatása Western blot analízissel*

A szalicilanilid származékok és konjugátumaik autofágiára gyakorolt hatását Western blot módszerrel, a Biri-Kovács és munkatársai cikkében [37] leírtakhoz hasonlóan vizsgáltuk. Röviden, U87 glioblasztóma sejteket kezeltünk a vegyületekkel (20-24 óra,  $10 \mu\text{M}$ ), majd a sejtekből lizátumokat készítettünk. A fehérjéket SDS gélelektroforézissel, 10%-os Tris-Tricin [38] gélen választottuk el, majd PVDF membránra blottoltuk. Blokkolást követően az autofágia marker LC3-I/II fehérjét indirekt módon jelöltük (Cell Signaling Technology, 12471, nyúl, 1:1500). Mennyiségi kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TA, USA, sc-1616, kecske, 1:2000). A másodlagos ellenanyagok (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004, kecske, 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, sc-2354, egér, 1:2000) mosását követően kemilumineszcens jelet detektáltunk (ChemiDoc XRS+ rendszer, Bio-Rad, Budapest, Magyarország).

### *A hordozópeptidek fluoreszcens származékainak in vitro sejtbejutása és intracelluláris lokalizációjuk meghatározása*

A Cf-peptidek sejtbejutását áramlási citometriával vizsgáltuk. Fluoreszcensen jelölt peptidszármazékokkal inkubáltuk a sejteket (3 óra,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )  $6,25$ - $50 \mu\text{M}$  koncentrációtartományban (négy tagú hígítási sor), majd mosást követően az aspecifikusan sejtfelületre kötött peptideket tripszines kezeléssel távolítottuk el. A tripszin leállítását követően a sejteket mostuk, majd sejtszusz-

penzióként áramlási citométerrel (BD LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analizáltuk [30].

A hordozópeptidek intracelluláris lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Fluoreszcensen jelölt peptidszármazékokkal (50  $\mu\text{M}$ ) inkubáltuk a sejteket (90 perc, 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ), majd mosást követően lizoszóma (Lyso-Tracker™ Deep Red) és magfestést (Hoechst 33342) végeztünk. Fixált (4% paraformaldahid) és élő sejteket is vizsgáltunk konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jéna, Németország) [37].

#### *Az intracelluláris baktérium inhibíciójának meghatározása fertőzött MonoMac6 sejteken*

A szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumok *in vitro* intracelluláris hatását fertőzött sejtes módszerrel vizsgáltuk. Letapadt humán monocita sejteket (MonoMac6 sejtek) *Mtb* H<sub>37</sub>Rv baktériummal fertőztünk, majd az extracelluláris, nem fagocitált baktériumokat mosással távolítottuk el. A fertőzött sejteket kezeltük a vegyületekkel (100-200  $\mu\text{M}$ ), majd mosást követően 2,5% SDS-el lizáltuk. A lizátumot szilárd Löwenstein-Jensen táptalajra oltottuk, majd 4 hét inkubációt (37 °C) követően meghatároztuk a telepképző egységek (TKE, colony forming unit - CFU) számát [39].

#### *A peptidkonjugátumok lizoszómális degradációs mintázatának meghatározása*

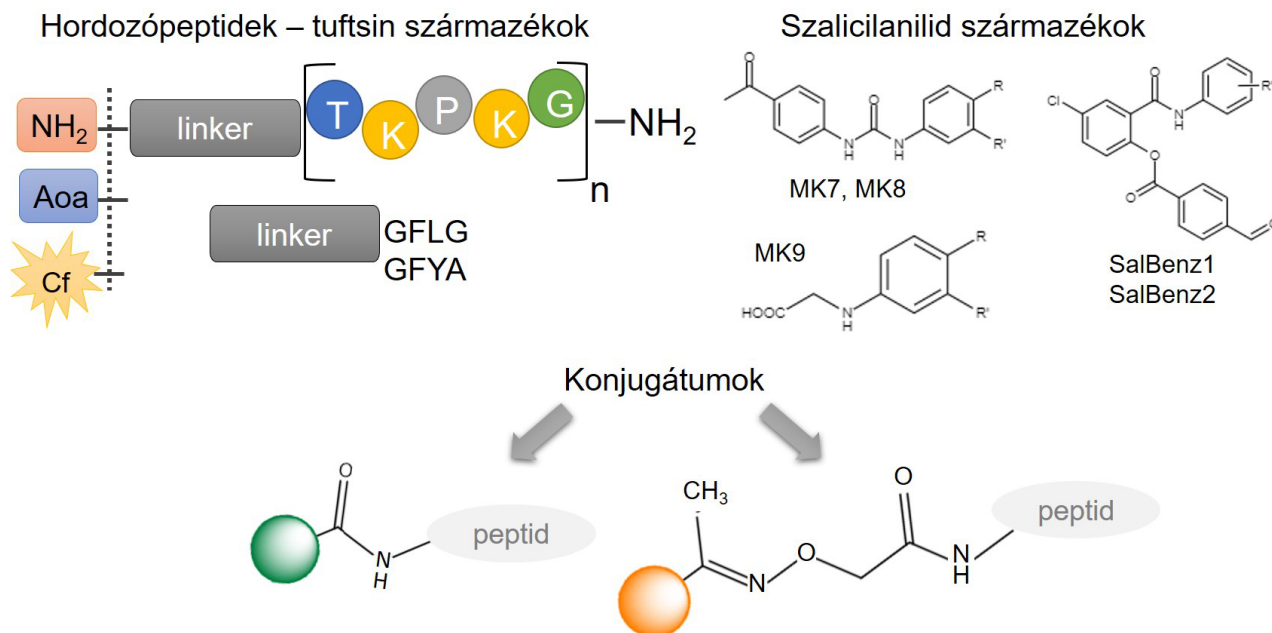
A peptidkonjugátumok degradációját vizsgáltuk patkánymáj lizoszóma preparátumban (7.A ábra) [40]. A konjugátumok oldatait (0,5 M nátrium-acetát puffer, 50 pmol/ $\mu\text{l}$ ) patkánymáj lizoszóma preparátummal inkubáltuk (37 °C, 600 rpm), meghatározott időpontokban (5 perc, 1, 2, 4, 8, 24 óra) mintát vettünk. A lizoszómális enzimek hatását ecetsavval „csendesítettük”, majd a mintákat desztillált vízzel hígítottuk. A bomlástermékek azonosítására nagy felbontású RP-HPLC-MS készüléket (Thermo Scientific Ultimate 3000 UPLC, Supelco Ascentis C18 (2,1 x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) oszlop - Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ tömegspektrométer; Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) használtunk.

## **Eredmények**

### *Hordozópeptidek és konjugátumok szintézise*

Új 4-aminoszalicilsav (MK7, MK8, MK9) származékokat, szalicilanilid 4-formilbenzoátokat (SalBenz1, SalBenz2) és peptidkonjugátumaikat állítottunk elő (3. ábra). Hordozópeptidként tuftsin származékokat ([TKPKG]<sub>n</sub> (n=1-4)) használ-

tunk, melyeket közvetlenül vagy enzimlabilis tetrapeptid linkerrel (GFLG, GFYA) [30, 41] keresztül konjugáltunk a szalicilanilid származékokhoz oximkötés (MK7, MK8, SalBenz1 és SalBenz2) vagy amidkötés (MK9) kialakításával.



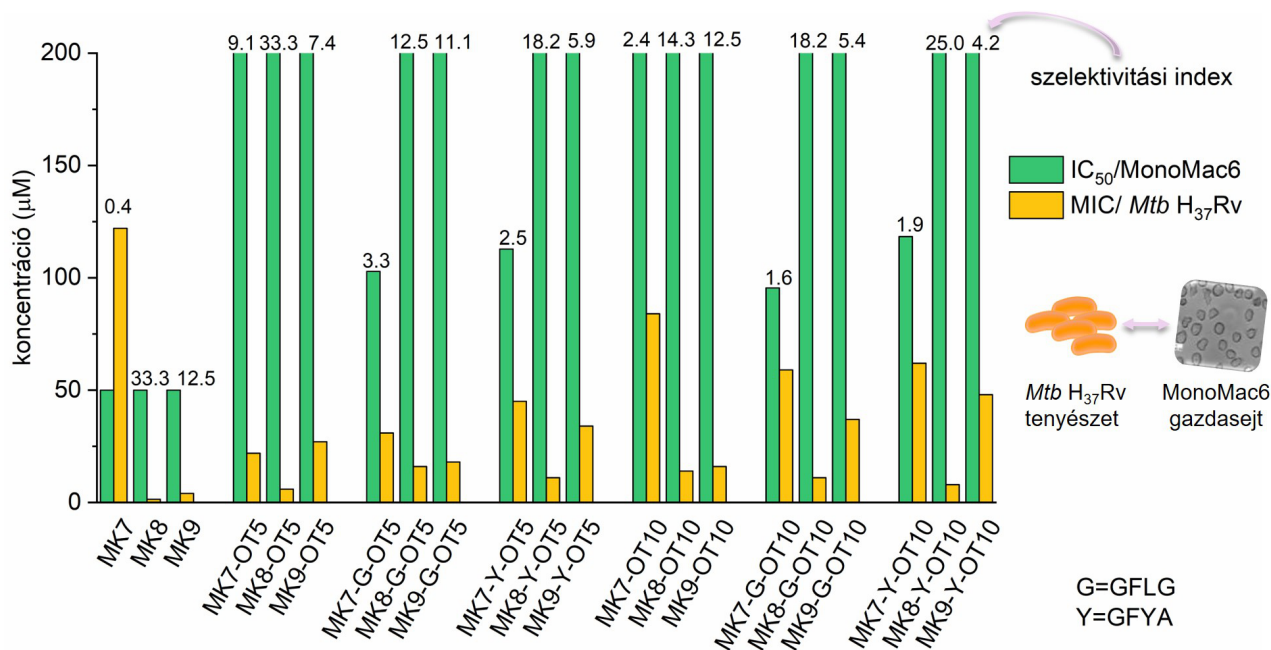
**3. ábra. A kismolekulás hatóanyagok, konjugálásra alkalmas és fluoreszcens hordozópeptidek, valamint a konjugátumok szerkezetének sematikus ábrája.** (R: -COOH, -COOCH<sub>3</sub>, R': -OH, R'': -4-CF<sub>3</sub>, 3,4-diCl). Antituberkulotikus hatás *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv tenyészetben és a különböző vegyületek szelektivitása.

A szalicilanilid származékok gátolták a *Mtb* H<sub>37</sub>Rv baktériumok növekedését (4. ábra). Ezen antituberkulotikus hatás a peptidkonjugáció után is megmaradt. Egyes esetekben (pl. MK7-OT5, MK7-GFLG-OT5) a peptidkonjugátumok a szabad hatóanyagnál is kisebb MIC értékkel rendelkeznek.

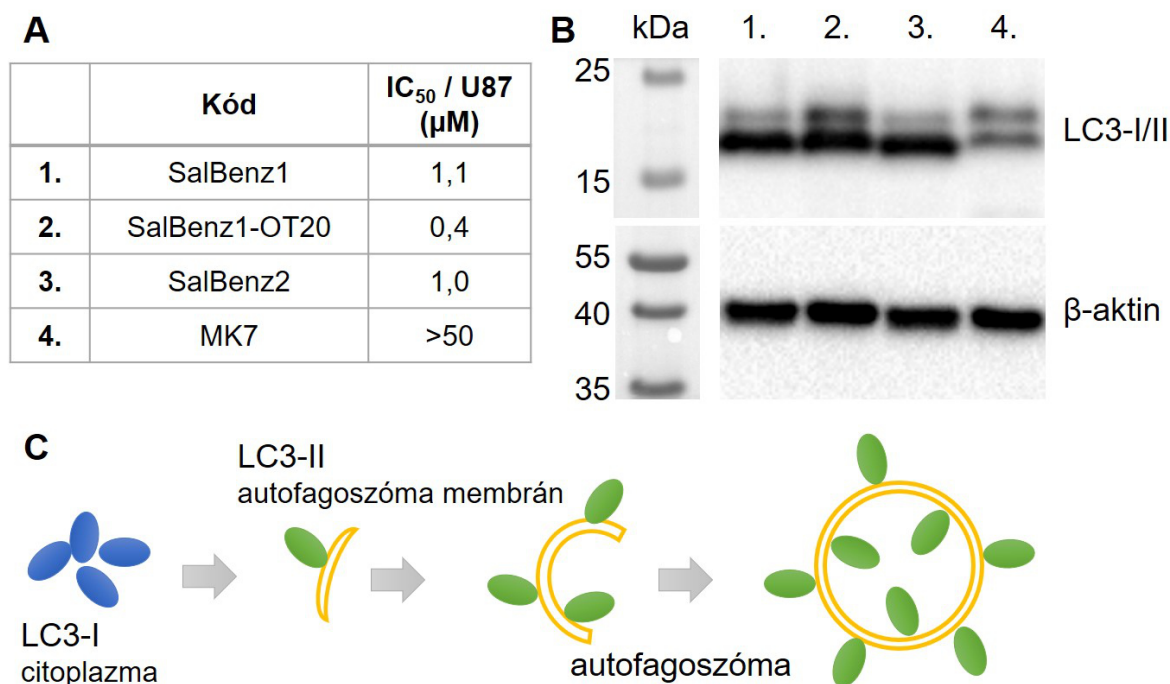
A vegyületek szelektivitásának jellemzése érdekében meghatároztuk az egyes vegyületek (szabad hatóanyagok, valamint peptidkonjugátum származékaik) citosztatikus hatását a gazdasejt modellként alkalmazott MonoMac6 sejteken. A 4-aminoszalicilsav származékok (MK7, MK8, MK9) nem citosztatikusak a MonoMac6 sejteken, és különböző szelektivitással rendelkeznek (4. ábra). Ezzel szemben a szalicilanilid 4-formilbenzoátok (SalBenz1, SalBenz2) esetében alacsony IC<sub>50</sub> értékeket tapasztaltunk. Ezért meghatároztuk a vegyületek citosztatikus hatását U87 glioblastóma sejtkultúrán is, amelyen szintén jelentkezett a citosztatikus hatás (5.A ábra). Ezen származékok ideális jelöltek antitumor hatású vegyületként.



Az LC3-I/II autofágia fehérje markerek kimutatása Western blot analízissel  
A szalicilanilid származékok autofágiára gyakorolt hatását Western blot módszerrel vizsgáltuk. U87 glioblasztóma sejteket kezeltünk a hatóanyagokkal és konjugátumaikkal.

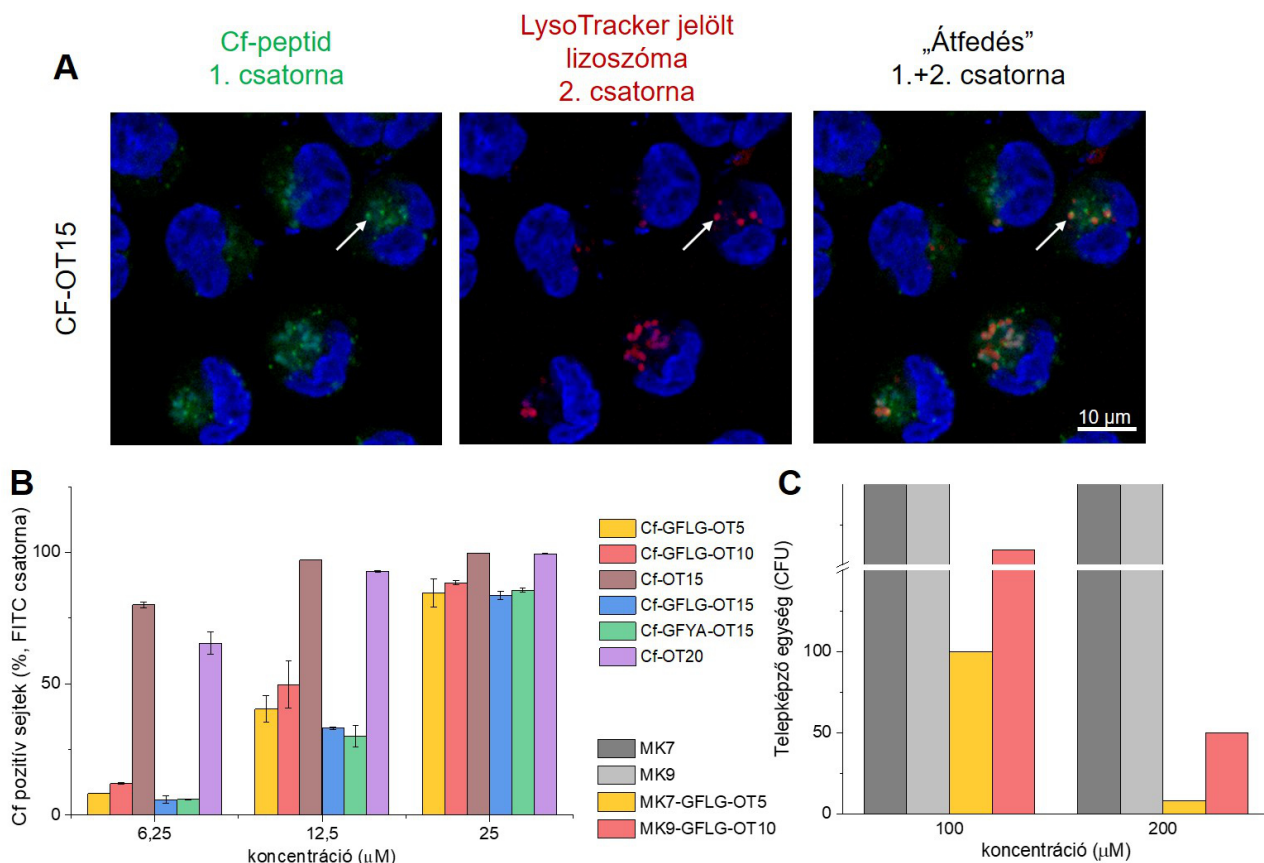


4. ábra. A 4-aminoszalicilsav származékok és peptidkonjugátumaik antituberkulotikus és citosztikus hatása.



5. ábra. A szalicilanilid származékok antitumor és autofágiára kifejtett hatása. **A)** A vegyületek IC<sub>50</sub> értékei U87 glioblasztóma sejteken. **B)** Az LC3-I és LC3-II fehérjék arányának megváltozása a vegyületekkel való kezelés hatására. **C)** Az autofagoszóma kialakulásakor az LC3-I fehérjék foszfatidil-etanolaminhoz kötődnek, az így kialakult LC3-II fehérjekonjugátumok képesek az autofagoszóma membránba beépülni.

A kezelések hatására a sejtekben zajló autofágia folyamatokat az LC3-I/II fehérje markerek megváltozásán keresztül vizsgáltuk (5.B ábra). Az LC3-I fehérje a citoszólban található forma, amely foszfatidiletanol-aminhoz kötődve (LC3-II) képes beépülni az autofagoszóma membránjába (5.C ábra). Ezen LC3-II konjugátum autofágia markerként használható [42, 43]. A kezelés hatására jól láthatóan megváltozik ezen fehérjék aránya intracellulárisan, ami autofágia jelenségére utal.

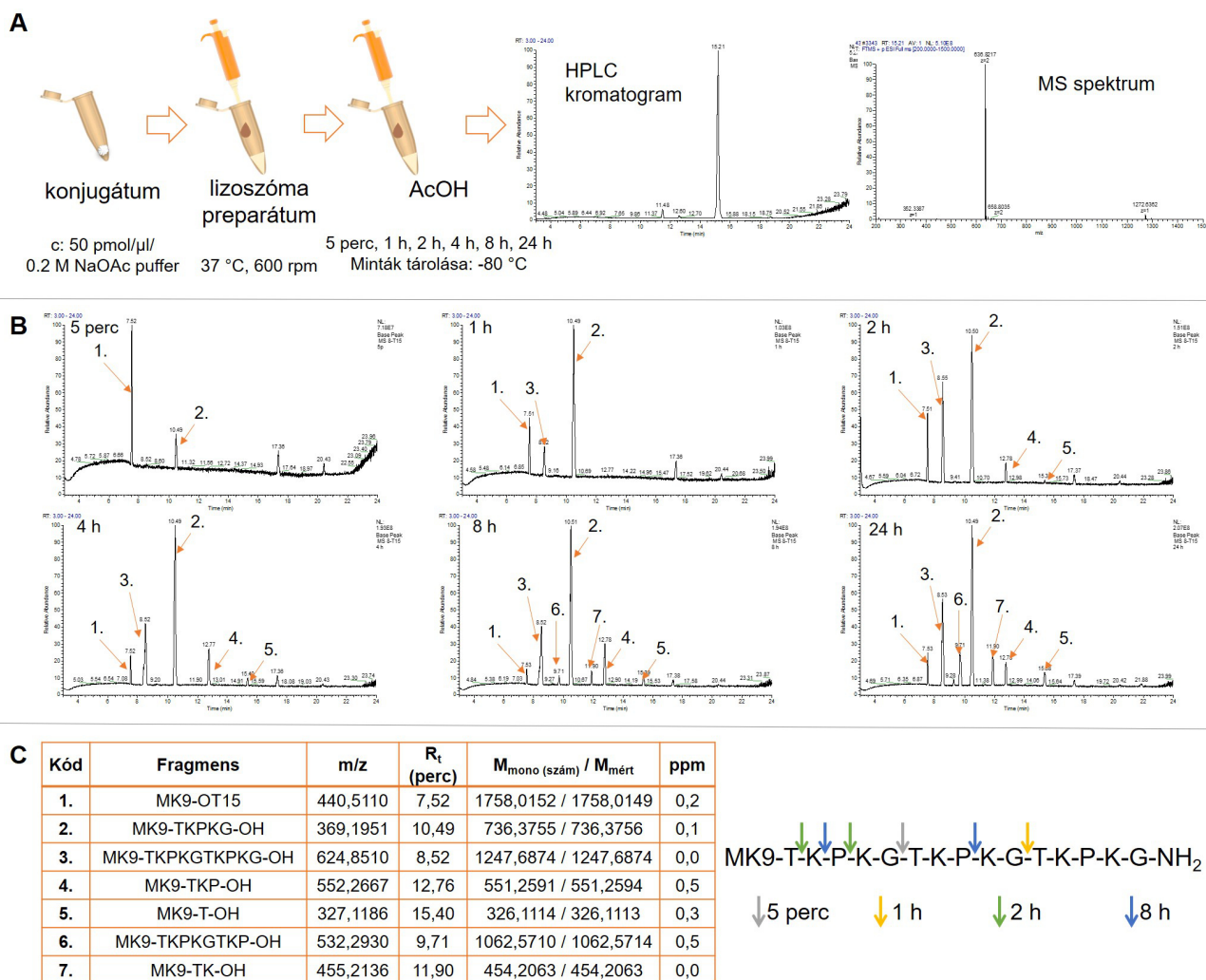


**6. ábra. A hordozópeptidek intracelluláris lokalizációja, in vitro sejtbejutása és a peptidkonjugátumok intracelluláris antituberkulotikus hatása. A)** A fluoreszcens Cf-OT15 peptidszarmazék intracelluláris lokalizációja. Cf-jelölt peptid (1. csatorna)  $\lambda_{ex} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 541$  nm; sejtmag festés  $\lambda_{ex} = 405$  nm,  $\lambda_{em} = 467$  nm (Hoechst 33342), lizoszómák (2. csatorna)  $\lambda_{ex} = 633$  nm,  $\lambda_{em} = 720$  nm (LysoTracker Deep Red). **B)** A fluoreszcens (Cf) peptidszarmazékok sejtbejutása és **C)** a hatóanyag – hordozópeptid konjugátumok in vitro intracelluláris antituberkulotikus hatása Mtb H<sub>37</sub>Rv baktériumokkal fertőzött MonoMac6 sejteken. Cf: 5(6)-karboxi-fluoreszcein.

### Hordozópeptidek fluoreszcensen jelölt származékainak in vitro sejtbejutása és intracelluláris lokalizációja

Az intracelluláris lokalizációt konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, fixálást és magfestést, valamint lizoszóma sejtalkotó jelölést követően. A Cf-peptidek és a lizoszómális kompartment kolokalizációja figyelhető meg, kismértékű citoplazmában megfigyelhető Cf-peptid akkumuláció mellett (6.A ábra). Irodalmi adatok alapján a tuftsin receptor-mediált endocitózissal jut a sejtekbe, melyet a

megfigyelt kolokalizáció detektálása is alátámaszt. A fluoreszcensen jelölt peptidszármazékok sejtbejutását áramlási citométerrel vizsgáltuk.

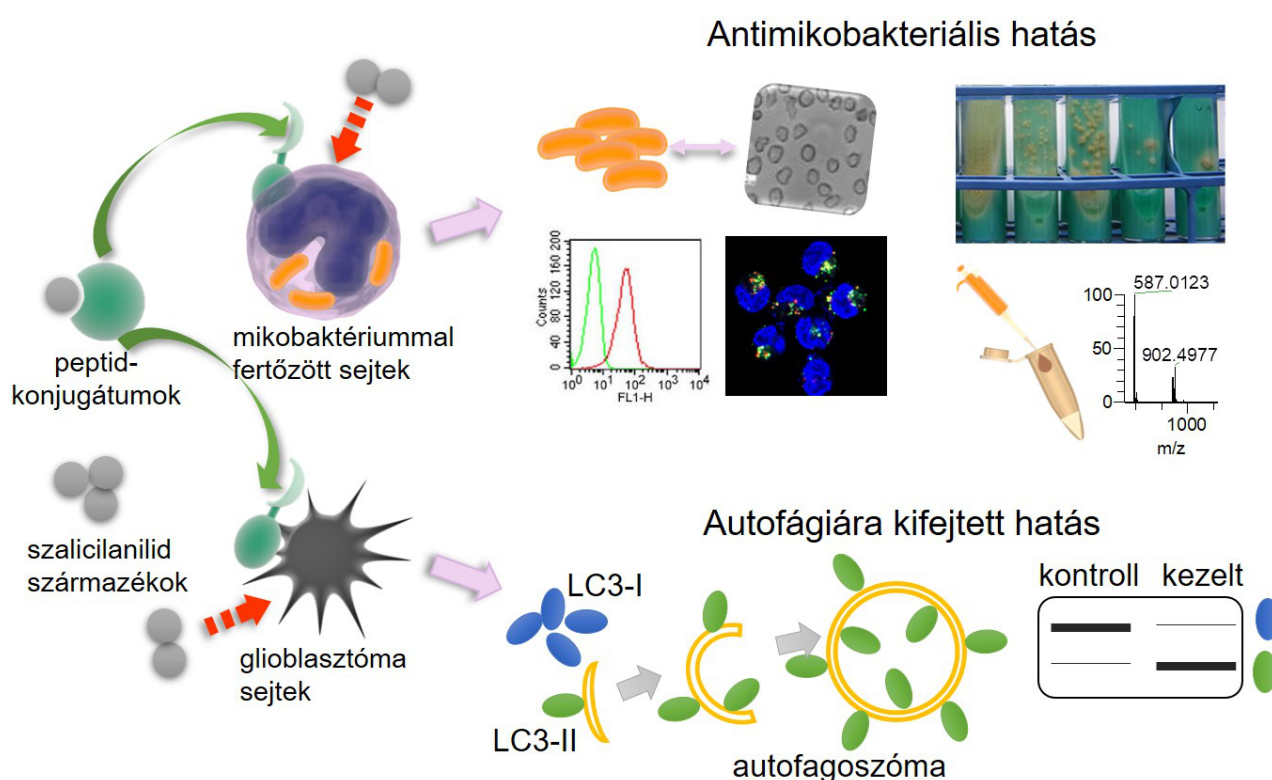


**7. ábra. A peptidkonjugátumok lizoszómális degradációja. A)** A konjugátumok oldatait (1. művelet) lizoszóma preparátummal inkubáljuk (2. művelet), majd mintavételezéskor ecetsavval „csendesítjük” a reakciót (3. művelet). A minták megfelelő hígítását követően HR HPLC-MS mérés végzünk (4. művelet). **B)** Az egyes mintavételi időpontokat követően kapott HPLC-MS kromatogramok. **C)** A kromatogramokhoz tartozó tömegspektrumok kiértékelése során beazonosítható fragmensek, amelyek azonosítása segítségével meghatározható a konjugátumok degradációjának dinamikája a mintavételi időpontokban elvégzett HR HPLC-MS mérések adataiból.

Minden peptid esetében koncentrációfüggő sejtbejutás figyelhető meg. Az enzimlabilis linkert nem tartalmazó tuftsin származékok sejtbejutása nagyobb mértékű, mint a linkert tartalmazó peptideké. Jellemzően a GFYA linkert tartalmazó peptidek bejutásának mértéke a legalacsonyabb, ezt követik a GFLG linkert tartalmazó származékok, majd a linker nélküli változatok következnek a bejutás hatékonyságát követve. A tuftsin egységek száma is befolyásoló tényező: minél hosszabb a peptid, annál nagyobb a sejtbejutás (6.B ábra).

### A vegyületek és peptidkonjugátumaik intracelluláris baktérium inhibíciója

A szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumok intracelluláris antituber- kulotikus hatását fertőzött sejteken határoztuk meg. A szabad hatóanyagok nem képesek az intracelluláris baktériumpopuláció gátlására (6.C ábra: a kezeletlen kontrollhoz viszonyított CFU (colony forming unit, telepkepző egység, TKE) értékek alapján). Ezzel szemben a peptidkonjugátumok koncentrációfüggő módon gátolják az intracelluláris baktériumokat (6.C ábra). Ezen intracelluláris baktérium gátló hatás magyarázható a megnövekedett sejtbejutással.



**8. ábra.** A szalicilanilid származékok és peptidkonjugátumok antimikobakteriális és antitumor hatásának vizsgálata során alkalmazott *in vitro* modellrendszerek (monocita, glioblasztóma) és a kísérleti munka főbb módszerei.

### A peptidkonjugátumok lizoszómális degradációja

A peptidkonjugáció növeli a szalicilanilid származékok sejtbejutását, azonban szükséges a konjugátumokból a hatóanyagok felszabadulása. A peptidkonjugátumok degradációját patkány máj lizoszóma preparátumban [40] vizsgáltuk (7.A ábra). Az enzimlabilis linkert tartalmazó peptidek lebomlása gyorsabb volt a linker nélküli peptidek lebomlásánál. Megfigyelhető a két különböző szekvenciájú linker részlet – GFLG és GFYA – közötti különbség: jellemzően a GFYA linkert tartalmazó peptidek gyorsabban bomlottak le. A legtöbb esetben (MK8-GFLG-OT10 kivételével) a felszabaduló legkisebb metabolit a hatóanyaggal kémiai kötésben maradt első (N-terminális) aminosav volt. Ezen metabolit

felszabadulásához 5 perc – 2 óra volt szükséges.

### **Konklúzió**

Munkánk során új antituberkulotikus és antitumor hatású szubsztituált szalicilanilid származékokat azonosítottunk. Peptidkonjugátumok előállításával sikeresen növeltük a szabad hatóanyagok sejtbejutását monocita sejtekbe, ezzel a mikobaktériumok intracelluláris inhibícióját elérve. Megállapítottuk továbbá, hogy a konjugátumokból a szalicilanilid származékok aktív formában felszabadulnak. Elemeztük U87 humán glioblasztóma sejtek növekedését gátló vegyületek autofágiára kifejtett hatását és bizonyítottuk, hogy a vegyületek az autofágia indukálását befolyásolják. Eredményeink alapján további szalicilanilid származékok és azok hordozópeptid konjugátumainak fejlesztésére nyílik lehetőség a kapott szerkezet-hatás összefüggések alapján.

### **Köszönetnyilvánítás**

Kutatásainkat az ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1157-8/2019-DT; Emberi Erőforrások Minisztériuma), az ELTE Tematikus Kiválósági Program (Szint+, 2018-1.2.1-NKP-2018-00005, Innovációs és Technológiai Minisztérium), Nemzeti Kiválósági Program - Fehérjetudomány és alkalmazásai nemzeti program 2018-1.2.1-NKP-2018-00005 – HUNPROTEX, valamint a VEKOP-2.3.3-15-2017-00020 (Széchenyi Program keretében) támogatta. A szerzők köszönettel tartoznak az alább felsorolt kollégáknak: Szabó Eleonóra, Senoner Zsuzsanna, Dávid Sándor, Varga Ágnes, Szűcs Gabriella (Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Bakteriológiai Laboratórium); Jarmila Vinšová, Martin Krátký, Václav Pflégr (Department of Organic and Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Csehország); Baranyai Zsuzsa, Horváti Kata, Biri-Kovács Beáta, Steckel Arnold, Laboda Laura, Kiskó Mária (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport); Szeder Bálint (TTK, Enzimológiai Intézet); Pályi Bernadett, Kis Zoltán (Nemzeti Népegészségügyi Központ, Nemzeti Biztonsági Labor), Fodor Kinga, Balka Gyula (Állatorvostudományi Egyetem).

### **Irodalomjegyzék**

- [1] Chen, W., Mook, R.A., Jr., Premont, R.T., Wang, J. (2018) Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cellular signalling*, **41**: 89-96.
- [2] Zadrazilova, I., Pospisilova, S., Masarikova, M., Imramovsky, A., Ferriz, J.M., Vinsova, J., Cizek, A., Jampilek, J. (2015) Salicylanilide carbamates:

- Promising antibacterial agents with high in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *European journal of pharmaceutical sciences*, **77**: 197-207.
- [3] Pospisilova, S., Michnova, H., Kaueroval, T., Pauk, K., Kollar, P., Vinsova, J., Imramovsky, A., Cizek, A., Jampilek, J. (2018) In vitro activity of salicylamide derivatives against vancomycin-resistant enterococci. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **28(12)**: 2184-2188.
- [4] Pauk, K., Zadrazilova, I., Imramovsky, A., Vinsova, J., Pokorna, M., Masarikova, M., Cizek, A., Jampilek, J. (2013) New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **21(21)**: 6574-81.
- [5] Baranyai, Z., Kratky, M., Vinsova, J., Szabo, N., Senoner, Z., Horvati, K., Stolarikova, J., David, S., Bosze, S. (2015) Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates. *European journal of medicinal chemistry*, **101**: 692-704.
- [6] Kratky, M., Bosze, S., Baranyai, Z., Szabo, I., Stolarikova, J., Paraskevopoulos, G., Vinsova, J. (2015) Synthesis and in vitro biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **23(4)**: 868-75.
- [7] Spaczynska, E., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Malarz, K., Kos, J., Gonec, T., Oravec, M., Gawecki, R., Bak, A., Dohanosova, J., Kapustikova, I., Liptaj, T., Jampilek, J., Musiol, R. (2019) Design and synthesis of anticancer 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides with a p53 independent mechanism of action. *Scientific reports*, **9(1)**: 6387.
- [8] Zhou, J., Jin, B., Jin, Y., Liu, Y., Pan, J. (2017) The antihelminthic drug niclosamide effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma in vitro and in vivo. *Theranostics*, **7(6)**: 1447-1462.
- [9] WHO, (2019), Global tuberculosis report 2019, *World Health Organization*.
- [10] Chetty, S., Ramesh, M., Singh-Pillay, A., Soliman, M.E. (2017) Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **27(3)**: 370-386.
- [11] Hatzenbuehler, L.A., Starke, J.R. (2014) Common presentations of nontuberculous mycobacterial infections. *The Pediatric infectious disease journal*, **33(1)**: 89-91.
- [12] Johansen, M.D., Herrmann, J.L., Kremer, L. (2020) Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature reviews Microbiology*, **18(7)**: 392-407.

- [13] Holland, E.C. (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97(12)**: 6242-4.
- [14] Alifieris, C., Trafalis, D.T. (2015) Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, **152**: 63-82.
- [15] Kanu, O.O., Mehta, A., Di, C., Lin, N., Bortoff, K., Bigner, D.D., Yan, H., Adamson, D.C. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, **13(6)**: 701-18.
- [16] Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pages, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature reviews Clinical oncology*, **14(1)**: 11-31.
- [17] Ma, W.W., Adjei, A.A. (2009) Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, **59(2)**: 111-37.
- [18] Christoffersen, T., Guren, T.K., Spindler, K.L., Dahl, O., Lonning, P.E., Gjertsen, B.T. (2009) Cancer therapy targeted at cellular signal transduction mechanisms: strategies, clinical results, and unresolved issues. *European journal of pharmacology*, **625(1-3)**: 6-22.
- [19] Wong, R.S. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **30**: 87.
- [20] Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., Pan, H. (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell death & disease*, **4**: e838.
- [21] Levy, J.M.M., Towers, C.G., Thorburn, A. (2017) Targeting autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **17(9)**: 528-542.
- [22] Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, **221(1)**: 3-12.
- [23] Doherty, J., Baehrecke, E.H. (2018) Life, death and autophagy. *Nature cell biology*, **20(10)**: 1110-1117.
- [24] Siebert, A., Gensicka-Kowalewska, M., Cholewinski, G., Dzierzbicka, K. (2017) Tuftsin - Properties and Analogs. *Current medicinal chemistry*, **24(34)**: 3711-3727.
- [25] von Wronski, M.A., Raju, N., Pillai, R., Bogdan, N.J., Marinelli, E.R., Nanjappan, P., Ramalingam, K., Arunachalam, T., Eaton, S., Linder, K.E., Yan, F., Pochon, S., Tweedle, M.F., Nunn, A.D. (2006) Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*, **281(9)**: 5702-10.

- [26] Aung, N.Y., Ohe, R., Meng, H., Kabasawa, T., Yang, S., Kato, T., Yamakawa, M. (2016) Specific Neuropilins Expression in Alveolar Macrophages among Tissue-Specific Macrophages. *PloS one*, **11(2)**: e0147358.
- [27] Prud'homme, G.J., Glinka, Y. (2012) Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget*, **3(9)**: 921-39.
- [28] Mezo, G., Kalaszi, A., Remenyi, J., Majer, Z., Hilbert, A., Lang, O., Kohidai, L., Barna, K., Gaal, D., Hudecz, F. (2004) Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tufts-like sequence. *Biopolymers*, **73(6)**: 645-56.
- [29] Fischer, R., Mader, O., Jung, G., Brock, R. (2003) Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis. *Bioconjugate chemistry*, **14(3)**: 653-60.
- [30] Baranyai, Z., Kratky, M., Vosatka, R., Szabo, E., Senoner, Z., David, S., Stolarikova, J., Vinsova, J., Bosze, S. (2017) In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tufts conjugates. *European journal of medicinal chemistry*, **133**: 152-173.
- [31] Horvati, K., Mezo, G., Szabo, N., Hudecz, F., Bosze, S. (2009) Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid-design, synthesis and antimycobacterial effect. *Journal of peptide science*, **15(5)**: 385-91.
- [32] Sula, L. (1963) *Bull World Health Organ*, **29(5)**: 607-25.
- [33] Sula, L. (1963) *Bull World Health Organ*, **29(5)**: 589-606.
- [34] Jensen, K.A. (1932) *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.*, **125(222)**.
- [35] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65(1-2)**: 55-63.
- [36] Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, **69(2)**: 581-93.
- [37] Biri-Kovacs, B., Adorjan, A., Szabo, I., Szeder, B., Bosze, S., Mezo, G. (2020) Structure-Activity Relationship of HER2 Receptor Targeting Peptide and Its Derivatives in Targeted Tumor Therapy. *Biomolecules*, **10(2)**.
- [38] Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, **1(1)** 16-22.
- [39] Horvati, K., Bacsa, B., Szabo, N., David, S., Mezo, G., Grolmusz, V., Vertessy, B., Hudecz, F., Bosze, S. (2012) Enhanced cellular uptake of a



new, in silico identified antitubercular candidate by peptide conjugation. *Bioconjugate chemistry*, **23(5)**: 900-7.

- [40] Orban, E., Mezo, G., Schlage, P., Csik, G., Kulic, Z., Ansorge, P., Fellingner, E., Moller, H.M., Manea, M. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino acids*, **41(2)**: 469-83.
- [41] Kopecek, J., Rejmanova, P., Strohalm, J., Ulbrich, K., Rihova, B., Vladimir Chytry, Lloyd, J.B., Duncan, R., (1991), Synthetic polymeric drugs. *US Patent*. 5, 037. p. 883.
- [42] Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology*, **445**: 77-88.
- [43] Polson, H.E., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M.J., Tooze, S.A. (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, **6(4)**: 506-22.



**Horváth Lilla** tanulmányait az Eötvös Loránd Tudományegyetemen végezte biológia alap- majd mesterfokon (molekuláris, immun- és mikrobiológia szakirány). Doktori tanulmányait 2017 óta a Hevesy György Kémia Doktori Iskolában szintetikus, szerves és biomolekuláris kémia programban folytatja. 2013 óta dolgozik az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban Bősze Szilvia vezetésével. 2016-ban a Semmelweis Egyetem nemzetközi tudományos diákköri konferenciáján megosztott első helyezést ért el (Semmelweis International Students' Conference, Basic Sciences I.). Doktori munkájának témája különböző peptidhordozók fejlesztése, azok kémiai és in vitro jellemzése, szelektivitásuk meghatározása, valamint szerkezet-hatás összefüggések definiálása. In vivo vizsgálatok elvégzéséhez szükséges minősítéssel (FELASA-C ekvivalens, EU-B-szint) rendelkezik.



**Bősze Szilvia** tanulmányait az Eötvös Loránd Tudományegyetemen folytatta. PhD fokozatát summa cum laude minősítéssel 1999-ben szerezte, kutatómunkáját az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban és Semmelweis Egyetemhez tartozó Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben végezte. A fokozat szerzés alatt, valamint azt követően az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban dolgozott, 1999-től tudományos főmunkatársként. 2001 óta a kutatócsoport Mikroanalitika laboratóriumának vezetője, 2012-től a Sejtenyésztő és Immunkémiai laboratóriumának vezetője. Antibakteriális és antitumor hatású vegyületek szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálatával és a vegyületek szelektív célba juttatására alkalmas hordozórendszerek tervezésével, kémiai és funkcionális jellemzésével (in vitro és in vivo rendszerek) foglalkozik. Részt vesz mikronalitikai és peptidanalitikai módszerek

kidolgozásában és fejlesztésében. Kutatási tevékenységéért 2000-ben Akadémiai Ifjúsági díjat, 2005-ben Bruckner Győző Ifjúsági díjat kapott. 2014-ben a COST StemChem, budapesti Working Group Meeting szervező bizottságának társelnöke volt. 1997 óta vesz részt az egyetemi oktatásban (elméleti és gyakorlati kurzusok, mikroanalitikai és in vitro módszerek témában). Tudományos diákköri munkák (napjainkig 10 fő) és szakdolgozatok témavezetője (osztatlan képzés, BSc, MSc; 31 fő) és 2004 óta PhD témavezető (5 fő (2 hallgató társtémavezetés)).

## A TKS ÁLLVÁNYFEHÉRJÉK SZÁZ ARCA

**Szeder Bálint, Kudlik Gyöngyi, Takács Tamás, Kurilla Anita,  
Koprivanacz Kitti, László Loretta, Vas Virág, Buday László**  
**Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest**

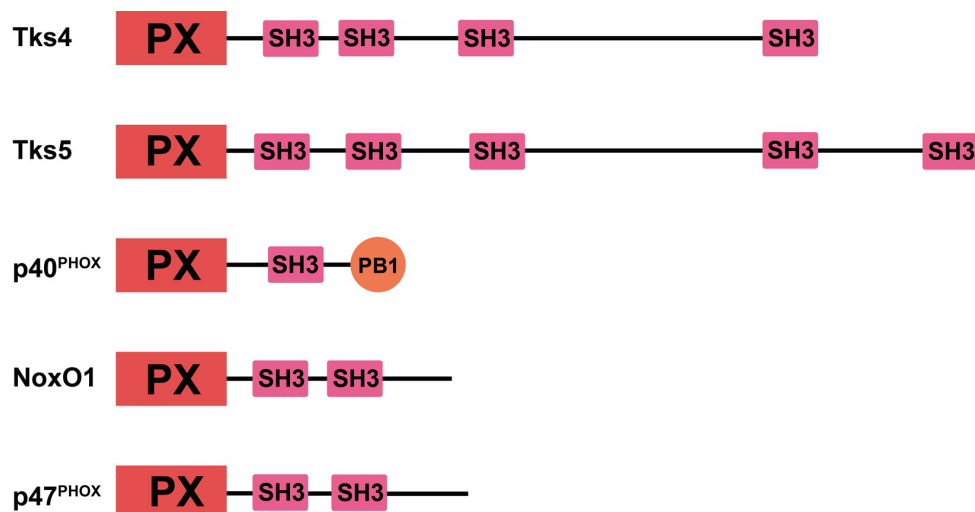
### Összefoglalás

Kutatócsoportunk több mint 10 éve a Tks állványfehérjék szerkezetének, szabályozásának, valamint sejtbiológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatával foglalkozik. A Tks4 és Tks5 állványfehérjék szerkezetileg nagyon hasonlóak és bizonyos mértékben funkcióikban is átfedő molekulák. Ezeknek az Src tirozin kináz szubsztrátként azonosított fehérjéknek a szerepét először az aktin sejtváz átrendeződésében, valamint podoszómák és invadopódiumok képzésében írták le. Emellett azonban számos más folyamatot is képesek befolyásolni, úgymint a reaktív oxigén-származékok termelődését, az embrionális fejlődést és a sejtdifferenciációt. Az utóbbi pár évben munkacsoportunk a Tks4 állványfehérjének több új funkcióját is feltárta. Ebben az összefoglalóban bemutatjuk a Tks fehérjék szerkezetét és jelátviteli utakban betöltött funkcióját, valamint változatos szerepüket a különböző sejtbiológiai folyamatokban, pl. migráció és invázió, sejtdifferenciáció, szöveti homeosztázis, vagy epitheliális-mezenchimális tranzíció. Valamint a Tks fehérjékhez kapcsolt patológiás elváltozások és egérmodellek is bemutatásra kerülnek.

### Bevezetés

Az állványfehérjék legfőbb feladata a jelátviteli folyamatok szabályozása, amelynek során fizikai közelségbe hozzák a jelátviteli kaszkád komponenseit. Ezáltal lehetővé teszik, hogy a partner fehérjék, enzimek lokális koncentrációja megemelkedjen a sejtekben, ezzel biztosítva a jelátviteli folyamatok specifikitását, illetve gyors lefolyását [1]. Munkánk során a Tks állványfehérjéket vizsgáltuk, amelyek elnevezésüket onnan kapták, hogy eredetileg az Src tirozin kináz szubsztrátjaiként azonosították őket (Tyrosine kinase substrate) [2, 3]. A Tks fehérjecsaldának két tagja ismert, a Tks5 (vagy más néven: *FISH* (Five SH3 domén)) és a Tks4 (más néven: *HOFI* (Homology of FISH)) [4, 5]. Fehérjeszerkezetüket tekintve nagyon hasonlóak, mindkettő tartalmaz egy PX (Phox Homológia) domént, melyet Tks5 esetében öt, Tks4 esetében négy SH3 (Src-homológia 3) domén követ (1. ábra). A doméneket összekötő szakaszokon több rendezetlen, prolin aminosavakban-gazdag motívum található. A PX domén felel a Tks fehérjék foszfoinozitidekhez történő kötődésért, illetve a sejtmembránhoz történő lokalizációért. Az SH3 domének, illetve prolin-gazdag szakaszok kötő-

helyül szolgálhatnak partner jelátviteli molekulák számára. A Tks fehérjékhez strukturálisan rokon fehérjék a p47-családhoz tartoznak úgymint a p40<sup>PHOX</sup>, a NoxO1 és a p47<sup>PHOX</sup> fehérjék (1. ábra). A Tks fehérjék között filogenetikai kapcsolat van, expressziójuk a gerincesek törzsére jellemző [6]. A Tks fehérjék a legtöbb szövettípusban jelen vannak, azonban a Tks4 nem detektálható a hereszövetben, míg a Tks5 a lép- és hereszövetben nincs reprezentálva [2, 3]. Mindemellett több sejtvonal típusban is kifejeződnek [3, 7].



**1. ábra. A p47 fehérjecsalád tagjai.** Tks4 és Tks5 fehérjékhez strukturálisan rokon fehérjék a p40<sup>PHOX</sup>, a NoxO1 és a p47<sup>PHOX</sup> sematikus doménszerkezete.

### A Tks állványfehérjék és az EGFR jelpálya kapcsolata

Munkacsoportunk elsőként írta le, hogy a Tks fehérjéknek szerepe van az Epidermális növekedési faktor receptoron (EGFR) keresztül aktiválódó jelpályában. Korábban sikerült kimutatnunk, hogy EGF kezelés hatására a Tks4 foszforilálódik a sejtekben és egy komplexbe kerül az EGFR-ral [8]. Tks5 esetében is bizonyítottuk az EGFR aktiváció utáni Tks5-foszforilációt, de a fehérje komplex az EGFR és a Tks5 között nem volt kimutatható [9]. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a Tks4-nek és a Tks5-nek átfedő funkciói lehetnek, de hatásuk mégis eltérő lehet az EGFR útvonalban [9].

Az általunk javasolt modell szerint a Tks4-et az Src kináz foszforilálja, amelyet az EGFR intracelluláris kináz doménja, EGF kötődést követően aktivál [8]. A szoros Src-Tks4 interakciót nemrégiben mutattuk ki, rávilágítva arra, hogy a kapcsolódáshoz a Tks4 egyik prolin-gazdag régiója (466-474 szakaszon), valamint az 508-as tirozin foszforilációs helye szükséges. Az Src kináz pedig SH3 és SH2 doménjén keresztül kapcsolódik a Tks4-hez [10]. EGF hatására tehát a membrán belső felszínén egy EGFR-Src-Tks4 komplex alakulhat ki, mely képes

az EGF jelpálya további elemeit megkötni, illetve aktiválni [10].

Kísérleteink arra is utáltak, hogy a Tks fehérjéknek két „állapota” lehet. Az egyik állapotban a citoplazmában helyezkedik el a Tks4 és a Tks5, majd EGF aktiváció hatására foszforilálódnak, és konformáció változás történik. A Tks fehérjék, elméletünk szerint foszforilált állapotban „kinyílnak” és a membránhoz transzlokálódnak [8, 9]. A kinyílt állapotban szabaddá váló PX domén pedig kötődni tud a sejtmembránban lévő olyan foszforilált-lipidekhez, melyeket az EGFR által aktivált foszfoinozid-3-kináz (PI3) szintetizált. Így a membránhoz kihorgonyozott és nyitott konformációjú Tks molekulák további partnerfehérjéket köthetnek.

#### *A Tks fehérjék szerepe a sejtek mozgásában*

A Tks állványfehérjék legtöbbet vizsgált funkciója a sejtek migrációjával kapcsolatos, ugyanis a podoszóma és az invadopódium képzésében a Tks fehérjéknek központi szerepe van. Irodalmi adatok alapján egészséges sejtekben a podoszómák, daganatos sejtekben pedig az invadopódiumok alakulnak ki. Ezek a struktúrák olyan aktinban gazdag sejtmembrán kitüremkedések, melyek segítségével a sejtek mozoghatnak, és az extracelluláris mátrixot lebontva távolabbi helyekre vándorolhatnak [11].

A Tks5 a korai podoszóma struktúrákban jut jelentős szerephez, mégpedig úgy, hogy platformot képez a podoszómák kialakításához szükséges molekulák megkötéséhez, így segíti elő a jeltovábbító molekulák interakciójának lehetőségét. A folyamat során a Tks5 N-terminális PX doménjének segítségével a membránhoz kötődik, specifikusan a receptor tirozin kinázok aktiválása során létrejövő foszfoinozitol-3,4-biszfoszfáthoz (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) és partnerfehérjével, mint a Grb2-vel (growth factor receptor-bound protein 2), az Nck fehérjével (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein ) vagy az N-WASP-pal (Wiskott–Aldrich Syndrome protein) komplexet képez [12, 13]. A Tks4 PX doménjén keresztül szintén képes kötődni a membránban lévő foszfoinozitokhoz. A Tks5-tel szemben a Tks4 szerepét már a strukturálisan érett podoszómákhoz kapcsolják, általa kerülnek mátrix-metalloproteázok (MMP-k) a membránkitüremkedésekhez, így biztosítja a sejt az MMP-k használatával az extracelluláris mátrix emésztését [3].

Az invazív tumoros sejtekre jellemző invadopódiumok kialakulása nagyon hasonló a podoszómákhoz [14]. Az irodalomban ezért még vita tárgya, hogy a

két, aktinban gazdag membránkitüremkedés (a podoszóma és az invadopódium) mennyiben tekinthető egyáltalán eltérő struktúrának. A podoszómák legtöbbször dinamikusabban átépülő membránkitüremkedések, mint az invadopódiumok [15], ezen kívül az Nck1 fehérje jelenlétét az invadopódiumhoz, míg a Grb2 fehérje jelenlétét inkább a podoszómákhoz kötik [16].

A tumorsejtek migrációja és a metasztázis képzése is szoros összefüggésben áll az invadopódiumok kialakulásával. A tumorsejtek biológiájával kapcsolatban a Tks fehérjék közül a Tks5 szerepéről több adat áll rendelkezésre. Megemelkedett Tks5 fehérje mennyiséget mutattak ki prosztata rákban [17], tüdő adenokarcinómában [18], glioblasztómában [19], emlőrákban és melanómában [20], illetve keratocisztás odontogén daganatban [21]. A felsorolt tanulmányokban a magasabb Tks5 szint fokozott invazivitással társult. Ezzel szemben a Tks4 szerepe tumoros elváltozásokban eddig még nem teljesen tisztázott. Ugyanakkor ismeretes, hogy az invazív tumor fenotípusokra jellemző MMP-eket a Tks4 tudja a membránba lokalizálni [22]. Ráadásul a Tks4 és a mozgékonyabb fenotípust biztosító epitheliális-mezenchimális átalakulás (EMT) között nemrégiben összefüggést fedeztek fel [23], így arra következtethetünk, hogy a Tks4-nek eddig még fel nem fedezett szerepe lehet a tumorsejt biológiában.

#### *A Tks4 állványfehérje és az EMT kapcsolata*

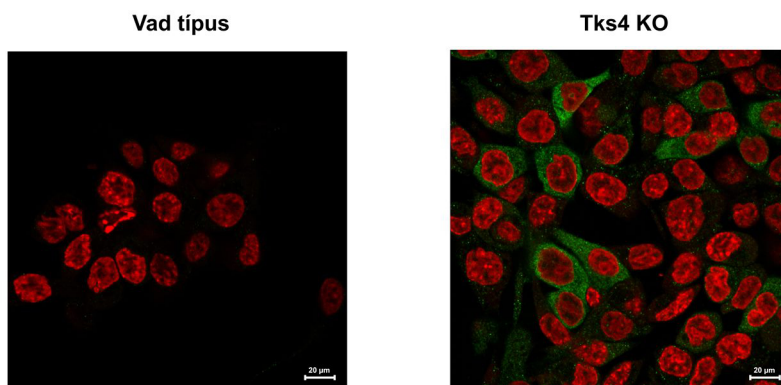
Friss kutatások összekapcsolták a Tks4 fehérjét az epitheliális-mezenchimális átalakulás folyamatának szabályozásával [23]. Az EMT során az epithél sejtek elvesztenek bizonyos rájuk jellemző tulajdonságokat és funkciókat (mint E-cadherin, occludin,  $\alpha 6 \beta 4$  integrinek és számos más sejtkapcsoló fehérje kifejezése, az apiko-bazális irányú polarizáltság vagy a szoros sejtkapcsolatok), és mezenchimális irányba differenciálódnak (N-cadherin, vimentin, fibronectin,  $\beta 1$  és  $\beta 3$  integrinek, MMP kifejezése, csökkent mértékű sejt-sejt kapcsolatok, valamint fokozott motilitás és invazivitás). Ez a folyamat főként a ZEB (zinc finger E-box binding), SNAIL és TWIST transzkripciós faktor családok által szabályozott, melyek aktivációjuk után csendesítik az epithél állapotra jellemző géneket, és fokozzák a mezenchimális fenotípus kialakításáért felelős gének expresszióját [24, 25]. Az EMT folyamata sokféle jelátviteli útvonalon keresztül, környezeti hatásra játszódhat le. A teljesség igénye nélkül, a TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta), a WNT, a Sonic/Hedgehog, a Notch és BMP (Bone Morphogenetic Protein) útvonalakon kívül, EMT-t előidéző lehet számos receptor tirozin kinázon keresztül történő jeltovábbító út, illetve EMT-t aktiválhat a reaktív oxigénszármazékok felhalmozódása is [24, 26, 27]. Maga az EMT

számos élettani folyamatban játszhat kulcsszerepet a korai egyedfejlődéstől a sebgyógyulásig, illetve fontos katalizátora tumoros elváltozások esetén a metasztázis képződésnek [24, 28]. Szeder és kollégái kimutatták, hogy a Tks4 fehérje eltávolítása (CRISP/Cas9 rendszerrel) HCT 116 (Human colon carcinoma 116) humán kolorektális karcinóma sejtekben EMT-szerű folyamatok indukálásával jár. A Tks4 knockout (Tks4-KO) sejtek elvesztik a rájuk jellemző epithél fenotípust és mezenchimális sejtekhez hasonló morfológiát vesznek fel, ami együtt jár a csökkenő számú sejt-sejt kapcsolattal és a fokozott mozgékonyssággal. Ehhez kapcsolódóan megtörténik a proteom átrendeződése is: csökken az E-cadherin szintje, valamint megemelkedik a fibronectin és SNAIL2 transzkripciós factor kifejeződése (2.A ábra). Ezenfelül a Tks4-KO sejtek kollagén mátrixban csökkent szferoid formáló képességet és fokozott invazivitást mutattak [23]. A pontos összefüggés a Tks4 hiánya és az EMT között egyelőre nem ismert, de mind az EGFR útvonal [29, 30], mind a reaktív oxigéngyök (ROS)-egyensúly [31, 32] bizonyítottan befolyásolja az EMT-t több más tumoros sejtvonalon. Ismeretes továbbá, hogy az EGF stimulus aktivátora az EMT-nek, aminek következtében megtörténik az E-cadherin expressziójának csökkenése [29, 30]. A Tks4 hiánya így valószínűsíthetően az EGF és/vagy a ROS jelátviteli útvonalakon keresztül befolyásolhatja az EMT folyamatát. Ugyanakkor lehetséges, hogy a Tks4-nek vannak olyan eddig még nem ismert kötőpartnerei, amelyekén keresztül szabályozza az EMT folyamatok beindulását. Az ELM adatbázis (<http://elm.eu.org/>) segítségével olyan hozzáférhető konzervált lineáris motívumokat kerestünk, amelyek az SH3 doméneken keresztül a Tks4 lehetséges kötőpartnerei lehetnek. A potenciális kötőpartnerek közül az ismert EMT szabályozó útvonalak résztvevőit tüntettük fel (és kérdőjellel jelöltük) a 2.B ábrán. Például a TGF- $\beta$  útvonalban részt vevő SMAD molekulák potenciális SH3 doménhez kapcsolódó Tks4 kötőpartnerek lehetnek. Ugyanígy a WNT útvonal elemei (pl. Fzd1, APC) is tartalmaznak olyan SH3-at kötő elemeket, melyekkel a Tks4-hez kapcsolódhatnak. A 2.B ábrán összefoglaltuk az EMT-szabályozó útvonalakat, amelyekben feltételezhető, hogy a Tks4 esetleg szerepet játszik. Még nem ismerjük a pontos molekuláris jeltovábbító útvonalat, amelyen keresztül a Tks4 az EMT-szerű folyamatokat befolyásolja, ennek pontos meghatározására további kutatások szükségesek.

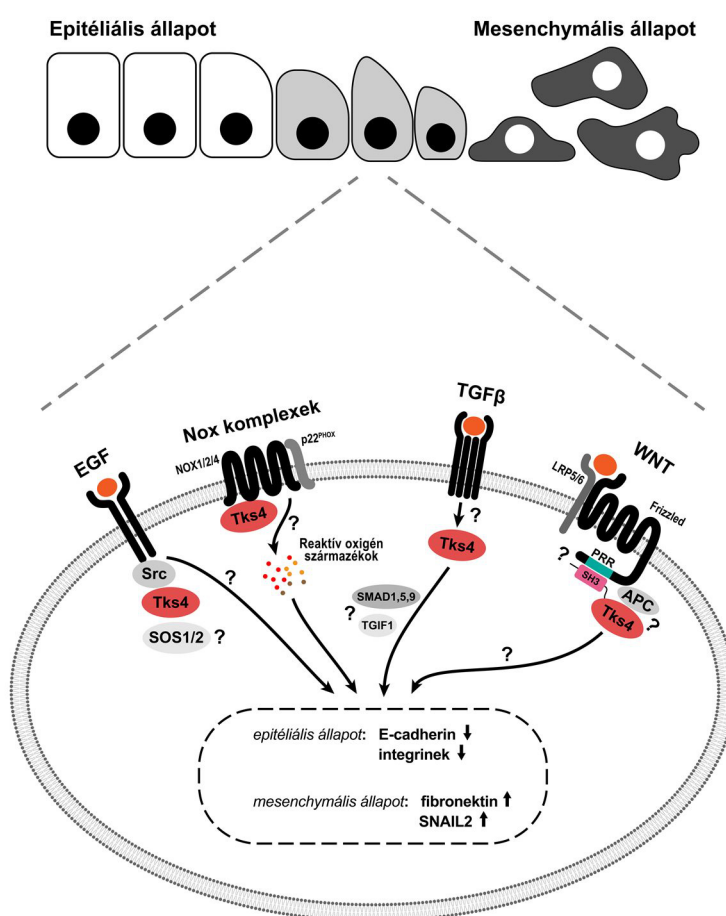
### *Tks fehérjék által szabályozott sejt differenciáció és szöveti homeosztázis*

A Tks4 szerepét a sejtes differenciációban elsőként Hishida és munkatársai írták le, akik kimutatták, hogy a Tks4 jelenléte elengedhetetlen a zsírsejtfejlődés korai szakaszában, egészen pontosan a zsírsejtprogenitorok expansziójának és

A:



B:



**2. ábra. A Tks4 és az EMT folyamat kapcsolata.** A) Tks4 hiánya a HCC 116 sejtekben EMT-szerű folyamatokat indukált, az ábrán a Tks4-KO sejtek megnövekedett fibronectin expresszióját látjuk. Kék színnel a sejtmagi DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) festést, míg piros színnel a fibronectin jelölést mutatjuk. B) A Tks4 szerepét, mellyel az EMT-szerű folyamatokat befolyásolhatja, ezen az ábrán foglaltuk össze, feltüntetve a Tks4 és az EMT-hez köthető útvonalak lehetséges kapcsolatát. A Tks4 kapcsolódása a NOX (NAPDH oxidase) komplexhez, valamint a Tks4 és az EGFR jelpálya kapcsolata ismert adat. Mindkét útvonal potenciálisan befolyásolhatja az EMT folyamatát. A Tks4 SH3 doménjéhez számos olyan, eddig még nem ismert kötőpartner is kapcsolódhat, mely bizonyítottan részt vesz az EMT folyamatában. A <http://elm.eu.org/> adatbázis segítségével prediktáltunk lehetséges Tks4 kötő partnereket, melyeket kérdőjellel jelöltünk az ábrán. Így a Tks4 közvetítésével számos lehetséges útvonalat vázoltunk fel, melyeken keresztül a Tks4 befolyásolhatja az EMT folyamatát.

korai elköteleződésének fázisaiban [5]. A tanulmány a Tks4 pontos leírása és jellemzése előtt született, így a munkacsoport a fehérjét Fad49-nek (factor for adipocyte differentiation 49) nevezte el, utalva annak elsőként azonosított funkciójára. Egy másik kutatócsoport az elhízás vizsgálata során erős kapcsolatot tárt fel a testtömeg index (BMI) és a Tks4 gént is tartalmazó ötös számú kromoszóma 5q35 régiójának polimorfizmusa (SNP) között [33], ami összefüggést sejtet a Tks4 és a zsírfejlődés, valamint zsírhomeosztázis között. Később, munkacsoportunk a Tks4 központi szerepét mutatta ki a zsír- és csontfejlődésben csontvelőből tenyésztett mezenchimális ősz- vagy sztrómasejtek (MSC-k) esetében [34].

Ezek a sejtek közös előalakjai többek között a zsír- és csontsejteknek [35]. Vizsgálataink kimutatták, hogy az egér MSC-k zsír-, illetve csontirányú differenciálata zavart szenved a Tks4 fehérje hiányában: adipogén differenciációt elősegítő környezetben tenyésztve a sejteket a Tks4-KO MSC-k képtelenek voltak lipid cseppek felhalmozására, valamint a csont irányú differenciációt támogató kultúrákban elmaradt az extracelluláris mátrix kalcifikációja [34]. A lipid metabolizmushoz kapcsolódó gének expressziójának vizsgálata kimutatta, hogy az adipogén differenciáció során a zsírcseppek formálásáért felelős és a szterán/zsírsvav anyagcserében szerepet játszó transzkripciós faktorok csökkent mennyiségben vagy késleltetve jelennek meg a Tks4-KO kultúrákban, továbbá a zsírszövetek szabályozásában és növekedésében kulcsszerepet játszó PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) transzkripciós faktor [36] nem jelent meg a Tks4-KO MSC kultúrákban [34]. Csontirányú differenciáció esetében a két legfőbb szabályozó transzkripciós faktor, a RunX2 (Runt-related transcription factor 2) és az osterix kifejeződése jelentősen elmaradt a Tks4-KO kultúrákban a vad típusú MSC-khez képest, magyarázva a fehérje hiányában megfigyelt csökkent csontképződést [34].

Az MSC-k differenciációján kívül más sejtípusok érésében is fontos szerepe van a Tks fehérjéknek. Például Oikawa és munkatársai oszteoklasztok képződése során bizonyították a Tks5 szerepét a sejtek közötti fúzió létrejöttében [38, 39]. RNS interferencia segítségével Tks5 csendesítést végeztek, ennek során az érő monocitákban a podoszómaképzés jelentősen lecsökkent és a sejt-fúzió elmaradt. A szerzők feltételezése szerint a Tks5 így, a podoszómák szabályozásán keresztül befolyásolhatja a csontmetasztázis-képzésben fontos szerepet betöltő sejt-fúziót is.



A Tks állványfehérjék szerepe talán az embrionális fejlődés során lehet a leghangsúlyosabb. Murphy és munkatársai, valamint Cejudo-Martin és munkatársai zebrahelembriókban [40] és egérembriókban [41] vizsgálták a Tks5 morfogénikus hatását. A zebrahelelakon végzett vizsgálat szerint a Tks5 szükséges a megfelelő neurulációhoz. A Tks5-morpholino zebrahele olyan rendellenességeket mutat (pl. keringési elégtelenség, abnormális koponya, csökkent számú pigmentált melanofóra), amelyek esetlegesen magyarázhatóak a neurális őssejtek megváltozott podoszóma képzésével és az ezáltal sérült migrációs képességükkel. [40] Cejudo-Martin és munkatársai a Tks5 első és második exonja közé épített géncsappdával rendelkező egereket vizsgáltak. Ezek az állatok teljes szájpadsadékkal születtek és röviddel születésük után elpusztultak [41].

A Tks fehérjék sejtdifferenciációt szabályozó szerepét a zsírszövetek homeosztázisban is vizsgáltuk. Tks4-KO egereket tanulmányozva kimutattuk, hogy a fehérje hiányában az állatok fehér zsírszövetei barnásodnak/bézsülnek, valamint barna zsírszövetük fehér zsírszövetre jellemző tulajdonságokat vesz fel [37]. A fehér zsírszövet alapvető funkciója az energiatárolás, míg a barna zsírszöveté a zsírsavakban tárolt kémiai energia hővé alakítása az UCP1 (uncoupling protein 1) fehérje segítségével. A Tks4-KO fehér zsírszövetek barnásodó/bézsülő jellegét a multilokuláris, vagyis több apró lipidcseppet tartalmazó zsírsejtek jelenléte, valamint a megnövekedett UCP1 fehérje mennyisége mutatta. A Tks4 hiányos barna zsírszövetekben azonban a fehér zsírszövetre jellemző unilokuláris, tehát egy nagy lipidcseppet tartalmazó zsírsejtek dúsulását, és az UCP1 csökkent szintjét lehetett látni. Továbbá Tks4 hiányos fehér zsírszöveten végzett részletes génexpresszió-vizsgálat kimutatta, hogy számos, a bézsülés irányába ható gén megnövekedett expressziót mutat a Tks4-KO fehér zsírszövetben. Tehát a Tks4 fontos szerepet tölt be a fehér és barna zsírszövetek homeosztázisában, feltehetően a PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor befolyásolásán keresztül [37].

A Tks4 génhányos állatokon további kísérleteket végeztünk és a zsírszövet vizsgálatával párhuzamosan a csontállományt is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a Tks4-KO állatok csontjai oszteoporotikus fenotípust mutatnak: a csontszövetben a trabekulák szeparációja és porozitása megnő. Vizsgálataink szerint ennek oka a csökkent oszteoblaszt (csontképző sejt) aktivitás, ami így nem teszi lehetővé a csontszövet megfelelő pótlását/felépítését [42]. Ezt feltehetően a már említett, az oszteoblasztok előalakjaiként funkcionáló MSC-k csökkent differen-

ciációs képessége okozza [34]. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a Tks4 hiányos egerek csontszövetében a csontépítést elősegítő markerek, mint a Runx2 vagy az oszteokalcin fehérjék csökkent szintjét tudtuk kimutatni [42]. Tehát a Tks4 fehérje megfelelő működése elengedhetetlen az oszteoblasztok megfelelő számának és mennyiségének fenntartásához.

Összességében elmondható, hogy a Tks4 állványfehérjének az elmúlt évben több új funkcióját is felfedeztük, úgymint a Tks4 részvételét az EMT-szerű folyamatokban, a barna/bézs zsírszövet homeosztázisának befolyásolását, és a csontritkulás kialakulásában betöltött szerepét.

#### *Patológias elváltozások, melyek a Tks4 fehérjéhez köthetők*

A legtöbbször idézett, a Tks4 fehérje hiányához köthető kórkép a Frank-ter Haar szindróma (FTHS) [43–45]. Először Iqbal és munkatársai írták le az FTHS és a Tks4 kapcsolatát, amikor felfedezték, hogy a Tks4 génje mutált formában van jelen az FTHS betegekben [46]. Arra is fény derült, hogy ez a nagyon ritka genetikai rendellenesség akkor jön létre, ha a Tks4 génjének mutációja mindkét allélon jelen van deléció vagy korai stop kodont eredményezve. A Tks4 fehérje hiánya súlyos elváltozásokat okoz, mint például szívbillentyű fejlődési zavarokat, a hosszú csontok megrövidülését és hajlottságát, koponya deformitásokat, melyek kiterjednek a szemekre és a fogakra is, korai szürke hályog kialakulását, csökkent zsírszövet mennyiséget okozva [47–49]. Az eddig felismert FTHS betegek száma kevesebb mint 100, közülük is csak nagyon kevesen érik meg a felnőttkort a szívet érintő súlyos elégtelenségek miatt [50, 51].

Arra a kérdésre, hogy egy egyszerű állványfehérje hiánya hogyan okozhat ilyen komplex, számos szervet, szövetet érintő megbetegedést, még nem tudjuk a pontos választ. Az eddig ismert Tks4 funkciókból csak következtetni tudunk, hogy közvetlenül vagy közvetve hogyan befolyásolja a Tks4 a korai fejlődés során a sejtek differenciációját vagy a szövetek fejlődését. Ahogy azt már írtuk, a Tks4-nek fontos jeltovábbító szerepe van az EGFR jelpályában [8, 10]. Így arra is következtethetünk, hogy a Tks4 hiányában az EGFR növekedés szabályozó hatása nem érvényesül, és a fejlődő embrióban a növekedési faktornak meggyengült hatása lehet. Ezért feltételezzük, hogy a sérült növekedési faktor jelpálya szerepet játszhat az FTHS betegek koponya és szívfejlődési rendellenességeinek kialakulásában.

Említettük, hogy a Tks4-nek meghatározó szerepe van a sejtek mozgásához

szükséges speciális sejtnyúlványok, vagyis a podoszómák kialakulásában [3]. Ha a Tks4 nincs jelen a korai fejlődés során, elképzelhető, hogy az embrióban a sejtek vándorlása nem megfelelően történik meg. Az FTSH betegekben a nem megfelelő podoszóma képződés és sejt migráció vezethet akár az érintett szövetek differenciációs zavarához is. A Tks4 hiányában kialakuló módosult növekedési faktor jelpálya és a nem egészséges podoszóma képzés mellett a zavart-EMT folyamatok is hozzájárulhatnak a FTSH szimptomák kialakításához. Ahogy azt munkacsoportunk tavaly leírta, a Tks4 hiányos sejtekben fokozott EMT-szerű folyamatok indultak el [23], így gondolhatunk arra is, hogy az FTSH érintett embriókban a sejtek epithel-mezenchimális átalakulása módosulhat, amely fejlődési zavarokat okozhat. Az elköteleződött sejtek esetén pedig a Tks4-nek a már bemutatott csont és zsírsejt differenciációt befolyásoló hatása érvényesülhet [37, 42], ami ahhoz vezethet, hogy nem csak embrionális korban, de a fejlődés későbbi stádiumában is ezek a szövetek nem működnek megfelelően. Összefoglalva tehát elmondható, hogy az FTSH komplex szimptomáit részlegesen meg tudjuk magyarázni a Tks4 eddig ismert funkcióival, de a mélyebb molekuláris biológiai folyamatok leírása és a Tks4 által meghatározott jeltovábbító mechanizmusok vizsgálatai még hiányoznak.

#### *A Tks4 funkciójának vizsgálata Tks4-KO egerek segítségével*

Munkacsoportunk a Tks4 fehérjét *in vivo* egér modellben is tanulmányozta az elmúlt évek során [37]. Egy OTKA projekt keretében Tks4 génhiányos egereket állítottunk elő, és sikeresen tartjuk fenn ezt a vonalat a Kísérletes és Orvostudományi Kutatóintézet állatházában. A C57Bl/6J genetikai háttérű egerekben eltávolítottuk az 5. és 6. exont, így a fehérje nem tud átíródni és teljesen hiányzik a Tks4-KO egerek szöveiből. A Tks4-KO egerek életképesek, azonban közel sem Mendeli arányban születnek heterozigóta tenyészpároktól. Általánoságban jellemző rájuk, hogy vad alomtársaiknál kisebb testsúlyúak egész életük során, és hosszabb ideig szorulnak gondoskodásra születésüket követően. Ezen kívül a hosszúcsontjaik és a koponyacsontjaik megrövidültek, gyakran jelentkezik náluk szürke hályog, kevés zsírszövetük van, valamint szaporodásra képtelenek. A legtöbb szempontból a Tks4-KO egerek fenotípusa hasonlít az FTSH betegek szimptomáira, így megfelelő modellállatai ennek a betegségnek.

Érdekes megjegyezni, hogy a Tks4 rokonfehérjéjének, a Tks5-nek a mutációja még súlyosabb fenotípust okoz egerekben. C57Bl/6J genetikai háttérű egerekben inzercióval sikerült a Tks5 gént mutálni és ezzel a Tks5 fehérje expresszióját megszüntetni. Ezek az egerek születésükkor vagy röviddel születés

után meghalnak. Izgalmas kísérlet volt, mikor keresztezték a Tks4 heterozigóta és a Tks5 heterozigóta egereket, hogy vizsgálják a két fehérje átfedő vagy egymást erősítő funkcióját. Ekkor a dupla mutáns (Tks4-/-;Tks5-/-) egerek nem születtek meg, a Tks4 és Tks5 együttes hiánya az étellel nem egyeztethető össze, míg külön-külön kiütve részlegesen kompenzálhatják egymás hiányát.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a fehérje-fehérje interakciókon alapuló jelpályák kutatása mindig is nagy érdeklődésre tartott számot, hiszen a résztvevő molekulák meghatározó szerepet játszanak a sejtek mozgásában, növekedésében és differenciációjában. Munkacsoportunk az elmúlt években a Tks molekulák mellett más SH3 doménnel rendelkező jeltovábbító molekulákat is vizsgált (Caskin, Abl). Reméljük, hogy a jövőben még további új felfedezéseket fogunk tudni elérni a „fehérje-szerkezet és funkció” kutatásokkal.

### Köszönetnyilvánítás

A munkát az OTKA (K124045), a FIEK(16-1-2016-0005), a HunProtEx (2018-1.2.1-NKP-2018-00004) és a MedinProt Program támogatta.

### Irodalomjegyzék

- [1] Buday, L., Tompa, P. (2010). Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *The FEBS Journal*, **277**: 4348–4355.
- [2] Lock, P., Abram, C.L., Gibson, T., Courtneidge, S.A. (1998). A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify Fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *The EMBO Journal*, **17**: 4346–4357.
- [3] Buschman, M.D., Bromann, P.A., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I., Courtneidge, S.A. (2009). The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, **20**: 1302–1311.
- [4] Seals, D.F., Azucena, E.F., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., et al. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*, **7**: 155–165.
- [5] Hishida, T., Eguchi, T., Osada, S., Nishizuka, M., Imagawa, M. (2008). A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion. *The FEBS Journal*, **275**: 5576–5588.

- [6] Kawahara, T., Lambeth, J.D., (2007). Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, **7**: 178.
- [7] Lányi, Á., Baráth, M., Péterfi, Z., Bögel, G., Orient, A., Simon, T, et al. (2011). The Homolog of the Five SH3-Domain Protein (HOFI/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and Cell Spreading. *PLOS ONE*, **6**: e23653.
- [8] Bögel, G., Gujdár, A., Geiszt, M., Lányi, Á., Fekete, A., Sipeki, S., et al. (2012). Frank-ter Haar Syndrome Protein Tks4 Regulates Epidermal Growth Factor-dependent Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, **287**: 31321–31329.
- [9] Fekete, A., Bögel, G., Pesti, S., Péterfi, Z., Geiszt, M., Buday, L. (2013). EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5. *Journal of Molecular Signaling*, **8**: Art. 8.
- [10] Dülk, M., Szeder, B., Glatz, G., Merő, B.L., Koprivanacz, K., Kudlik, G., et al. (2018). EGF Regulates the Interaction of Tks4 with Src through Its SH2 and SH3 Domains. *Biochemistry*, **57**: 4186–4196.
- [11] Paterson, E.K., Courtneidge, S.A., (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *The FEBS Journal*, **285**: 8–27.
- [12] Oikawa, T., Itoh, T., Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *Journal of Cell Biology*, **182**: 157–169.
- [13] Daly, C., Logan, B., Breeyear, J., Whitaker, K., Ahmed, M., Seals, D.F. (2020). Tks5 SH3 domains exhibit differential effects on invadopodia development. *PLOS ONE*, **15**: e0227855.
- [14] Linder, S. (2009). Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, **122**: 3009–3013.
- [15] Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, **17**: 107–117.
- [16] Oser, M., Dovas, A., Cox, D., Condeelis, J. (2011). Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *European Journal of Cell Biology*, **90**: 181–188.
- [17] Burger, K.L., Learman, B.S., Boucherle, A.K., Sirintrapun, S.J., Isom, S., Díaz, B., et al. (2014). Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells. *The Prostate*, **74**: 134–148.
- [18] Li, C.M-C., Chen, G., Dayton, T.L., Kim-Kiselak, C., Hoersch, S., Whittaker, C.A., et al. (2013). Differential Tks5 isoform expression contributes to

- metastatic invasion of lung adenocarcinoma. *Genes & Development*, **27**: 1557–1567.
- [19] Mao, L., Whitehead, C.A., Paradiso, L., Kaye, A.H., Morokoff, A.P., Luwor, R.B., et al. (2017). Enhancement of invadopodia activity in glioma cells by sublethal doses of irradiation and temozolomide. *Journal of Neurosurgery*, **129**: 598–610.
- [20] Blouw, B., Patel, M., Iizuka, S., Abdullah, C., You, W.K., Huang, X., et al. (2015). The Invadopodia Scaffold Protein Tks5 Is Required for the Growth of Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE*, **10**: e0121003.
- [21] Ribeiro, Ribeiro, A.L., da Costa, N.M.M., de Siqueira, A.S., Brasil, da Silva, W., da Silva, Kataoka, M.S., Jaeger, R.G., et al. (2016). Keratocystic odontogenic tumor overexpresses invadopodia-related proteins, suggesting invadopodia formation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, **122**: 500–508.
- [22] Peláez, R., Morales, X., Salvo, E., Garasa, S., Solórzano, C.O. de., Martínez, A., et al. (2017).  $\beta 3$  integrin expression is required for invadopodia-mediated ECM degradation in lung carcinoma cells. *PLOS ONE*, **12**: e0181579.
- [23] Szeder, B., Tárnoki-Zách, J., Lakatos, D., Vas, V., Kudlik, G., Merő, B., et al. (2019). Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells. *Cells*, **8**: 1343.
- [24] Dongre, A., Weinberg, R.A., (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**: 69–84.
- [25] Horejs, C-M. (2016). Basement membrane fragments in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition. *European Journal of Cell Biology*, **95**: 427–440.
- [26] Cichon, M.A., Radisky, D.C. (2014). ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- $\kappa$ B-dependent activation of Snail. *Oncotarget*, **5**: 2827–2838.
- [27] Kim, Y.M., Cho, M. (2014). Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells. *Cellular Signalling*, **26**: 784–796.
- [28] Song, J., Wang, W., Wang, Y., Qin, Y., Wang, Y., Zhou, J., et al. (2019). Epithelial-mesenchymal transition markers screened in a cell-based model and validated in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*, **19**: 680.

- [29] Clapéron, A., Mergey, M., Nguyen, Ho-Boulidoires, T.H., Vignjevic, D., Wendum, D., Chrétien, Y., et al. (2014). EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Hepatology*, **61**: 325–332.
- [30] Cheng, J-C., Auersperg, N., Leung, P.C.K. (2012). EGF-Induced EMT and Invasiveness in Serous Borderline Ovarian Tumor Cells: A Possible Step in the Transition to Low-Grade Serous Carcinoma Cells? *PLOS ONE*, **7**: e34071.
- [31] Jiao, L., Li, D-D., Yang, C-L., Peng, R-Q., Guo, Y-Q., Zhang, X-S., et al. (2016). Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer. *Tumor Biology*, **37**: 8413–8423.
- [32] Jung, S-H., Kim, S-M., Lee, C-E. (2016). Mechanism of suppressors of cytokine signaling 1 inhibition of epithelial-mesenchymal transition signaling through ROS regulation in colon cancer cells: suppression of Src leading to thioredoxin up-regulation. *Oncotarget*, **7**: 62559–62571.
- [33] Liu, Y-J., Liu, X-G., Wang, L., Dina, C., Yan, H., Liu, J-F., et al. (2008). Genome-wide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Human Molecular Genetics*, **17**: 1803–1813.
- [34] Dülk, M., Kudlik, G., Fekete, A., Ernszt, D., Kvell, K., Pongrácz, J.E., et al. (2016). The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages. *Scientific Reports*, **6**: 34280.
- [35] Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., et al. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death & Differentiation*, **23**: 1128–1139.
- [36] Medina-Gomez, G., Gray, S.L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell M., et al. (2007). PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism. *PLOS Genetics*, **3**: e64.
- [37] Vas, V., Háhner, T., Kudlik, G., Ernszt, D., Kvell, K., Kutí, D., et al. (2019). Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. *Cells*, **8**: 831.
- [38] Oikawa, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Uehara, S., Udagawa, N., Saya, H., et al. (2012). Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell–cell fusion. *Journal of Cell Biology*, **197**: 553–568.

- [39] Oikawa, T., Matsuo, K. (2012). Possible role of IRTKS in Tks5-driven osteoclast fusion. *Communicative & Integrative Biology*, **5**: 511–515.
- [40] Murphy, D.A., Diaz, B., Bromann, P.A., Tsai, J.H., Kawakami, Y., Maurer, J., et al. (2011). A Src-Tks5 Pathway Is Required for Neural Crest Cell Migration during Embryonic Development. *PLOS ONE*, **6**: e22499.
- [41] Cejudo-Martin, P., Yuen, A., Vlahovich, N., Lock, P., Courtneidge, S.A., Díaz, B. (2014). Genetic Disruption of the Sh3pxd2a Gene Reveals an Essential Role in Mouse Development and the Existence of a Novel Isoform of Tks5. *PLOS ONE*, **9**: e107674.
- [42] Vas, V., Kovács, T., Körmendi, S., Bródy, A., Kudlik, G., Szeder, B., et al. (2019). Significance of the Tks4 scaffold protein in bone tissue homeostasis. *Scientific Reports*, **9**: 5781.
- [43] Bendon, C.L., Fenwick, A.L., Hurst, J.A., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Wall, S.A., et al. (2012). Frank-ter Haar syndrome associated with sagittal craniosynostosis and raised intracranial pressure. *BMC Medical Genetics*, **13**: 104.
- [44] Zrhidri, A., Jaouad, I.C., Lyahyai, J., Raymond, L., Egéa, G., Taoudi, M., et al. (2017). Identification of two novel SH3PXD2B gene mutations in Frank-Ter Haar syndrome by exome sequencing: Case report and review of the literature. *Gene*, **628**: 190–193.
- [45] Ratukondla, B., Prakash, S., Reddy, S., Puthuran, G.V., Kannan, N.B., Pillai, M.R. (2020). A Rare Case Report of Frank Ter Haar Syndrome in a Sibling Pair Presenting With Congenital Glaucoma. *Journal of Glaucoma*, **29**: 236–238.
- [46] Iqbal, Z., Cejudo-Martin, P., de Brouwer, A., van der Zwaag, B., Ruiz-Lozano, P., Scimia, M.C., et al. (2010). Disruption of the Podosome Adaptor Protein TKS4 (SH3PXD2B) Causes the Skeletal Dysplasia, Eye, and Cardiac Abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **86**: 254–261.
- [47] Aktas, Z., Karaca, E.E., Dogan, N., Çakmak, T., Unlu, M., Tok, L., et al. (2014). Congenital glaucoma as an ophthalmic manifestation of Frank-Ter Haar syndrome. *International Ophthalmology*, **34**: 351–354.
- [48] Saeed, M., Shair, Q.A., Saleem, S.M. (2011). Frank-Ter Haar Syndrome. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*, **21**: 252–253.
- [49] Femitha, P., Joy, R., Gane, B.D., Adhisivam, B., Bhat, B.V. (2012). Frank-Ter Haar Syndrome in a Newborn. *The Indian Journal of Pediatrics*, **79**: 1091–1093.



- [50] Wallerstein, R., Scott, C.I., Nicholson, L. (1997). Extended survival in a new case of ter Haar syndrome: Further delineation of the syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, **70**: 267–272.
- [51] Köse, T.E., İşler, C., Şenel, Ş.N., Şitilci, T., Özcan, İ., Aksakallı, N. (2015). Frank–ter Haar syndrome—additional findings? *Dentomaxillofacial Radiology*, **45**: 20150119.



**Szeder Bálint** az ELTE-n végzett 2014-ben Molekuláris- Immun- és Mikrobiológia szakirányon. 2014-től PhD hallgató az ELTE Szerkezeti biokémia programban. 2013-tól a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetének Jelátviteli és Funkcionális Genomikai Kutatócsoportjában dolgozik.



**Kudlik Gyöngyi** 2010-ben és 2012-ben szerzett biológus BSc és MSc diplomát a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán, majd a PhD fokozatot a Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományi Doktori Iskolájában 2015-ben érte el Dr. Uher Ferenc témavezetésével. Témája a mezenchimalis őssejtek immunszuppresszív aktivitásának felderítése volt. 2014 óta a Természettudományi Kutatóközpontban Dr. Buday László kutatócsoportjában dolgozik és a Tks4 állványfehérje különböző sejtbiológiai folyamatokban betöltött szerepét vizsgálja.



**Takács Tamás** 2017-ben az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen végzett Biológia BSc képzésen, majd ugyanitt folytatta tanulmányait és 2019-ben Biológus MSc diplomát szerzett Molekuláris- Immun- és Mikrobiológia szakirányon. 2019 szeptemberétől tudományos segédmunkatársként dolgozik a Természettudományi Kutatóközpontban, a Jelátviteli és Funkcionális Genomika Kutatócsoportban, ahol 2020 szeptemberétől, már az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskola doktorandusza. Témája a Tks4 fehérjék által szabályozott szignálútvonalak kutatása.



**Kurilla Anita** az ELTE Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola Genetika Program végzős doktorandusza. Doktori munkáját a gödöllői Mező-gazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont RNS Biológia Csoportjában végezte, kutatási témája a génextpressziót szabályozó mechanizmusok vizsgálata volt. Jelenleg az Enzimológiai Intézet Jelátviteli és Funkcionális genomika csoport munkatársa.



**Koprivanacz Kitti** 2013-ban végzett a BME Vegyész és Biomérnöki Karán, oklevés biomérnöként. Az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskola doktorandusza. Doktori értekezésének témája a Caskin1 állványfehérje lipid kötésének vizsgálata.



**László Loretta** 2018-ban a Debreceni Egyetem Orvostudományi Karán, Orvosi laboratóriumi és képződiagnosztikai analitikus Bsc diplomát szerzett, majd 2020-ban a Molekuláris biológus mesterképzést fejezte be szintén a Debreceni Egyetem Orvostudományi Karán. 2020 szeptemberétől az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskola doktorandusza, Buday László laborjában. Témája a Tks4 fehérje szerepe a normál és daganatsejtek jelátvitelében.



**Vas Virág**, biológus, PhD fokozatát a SOTE-n szerezte 2006-ban. Három évig volt posztdoktori kutató Németországban, az ulmi egyetemen. Kutatási területe a leukémiás- és a vérképző-össejtek öregedése volt. Magyarországra visszatérve a SZIE-n kapott Marie Curie ösztöndíjat, majd posztdoktori helyet kapott Buday László laborjában a TTK-n. Témavezető az ELTE doktori iskolájában, kutatási területe a zsírsejtek és a csontsejtek differenciációja.



**Buday László**, orvos-biokémikus, az MTA Széchenyi-díjas rendes tagja. Jelenleg a Természettudományi Kutatóközpont megbízott főigazgatója, az Enzimológiai Intézet igazgatója, illetve a Semmelweis Egyetem részállású egyetemi tanára. A Magyar Biokémiai Egyesület elnöke, a Magyar Akkreditációs Bizottság tagja, a MAB Doktori Kollégiumának elnöke. Az általa vezetett kutatócsoport elsősorban a tirozinkináz receptorokkal működő jelpályákat vizsgálja, azon belül is az ún. állványfehérjék működésének sajátosságaira fókuszál.

*Fehér, A., Weber, I.T., Bagossi, P., Boross, P., Mahalingam, B., Louis, J.M., Copeland, T.D., Torshin, I.Y., Harrison, R.W. and Tózsér, J. (2002) Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. Eur J Biochem, 269: 4114–4120.*

## **AZ ANTIRETROVIRÁLIS TERÁPIÁBAN KIALAKULÓ GYÓGYSZERREZISZTENCIA ÚJ MECHANIZMUSÁNAK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA**

**Tózsér József**

**Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet**

A közlemény alapvetően két kutatócsoport, a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének Retrovirális Biokémia Kutató Laboratóriuma (RBKL) és Irene T. Weber (Atlanta, GA, USA) csoportjának együttműködéséből született. A csoportunk OTKA támogatása mellett NIH AIDS FIRCA Grant támogatás is segítette a kutatásunkat. Ekkor már tíz éve dolgoztunk itthon a retrovirális proteázok specificitásának feltérképezésén. Ezen kutatások egyik megalapozó cikke [1] még posztdoktori munkám során született a Frederick-i Molekuláris Virologiai és Karcinogenezis Laboratóriumában, Oroszlán István (1927-2020) irányításával. Ez volt az egyik első olyan közlemény mely a HIV-1 és HIV-2 proteáz virális hasítási helyeinek összehasonlító kinetikai vizsgálatát írta le, oligopeptid szubsztrátok felhasználásával.

Első itthoni kutató munkatársam Bagossi Péter lett (1966-2011), később csatlakozott hozzánk Boross Péter. Oroszlán István laborja – emeritusi státuszba kerülésével - 1994-ben megszűnt, „jogutódja” Terry D. Copeland csoportja lett, mellyel folytattuk az együttműködést.

A 2000-es évek elejére már nagyon részletes információkat szereztünk a retrovirális proteázok különleges, szekvenciakörnyezet-függő specificitásáról, valamint a proteázban az inhibitorok hatására kialakuló mutációk molekuláris következményeiről is, melyek a terápiában használt specifikus inhibitorokkal szembeni rezisztencia kifejlődéséhez vezettek [2-4]. Kollaborációs munkáinkhoz nagy segítséget jelentett a John M. Louis által kidolgozott HIV proteáz expressziós és mutagenézis technológia. Az első olyan közlemény, mely a proteáz inhibitorokkal szembeni rezisztencia esetén Gag hasítási hely mutációkat is azonosított, 1996-ban jelent meg [5]. Mivel a mutációk a sebességmeghatározó lépéseket tartalmazó hasítási helyeken történtek, felmerült annak lehetősége,

hegy ez egy kompenzációs mechanizmus része: a gyógyszerrezisztens proteáz mutációk rontják az enzim hatékonyságát, amit a vírus a hasítási helyek kedvezőbb szekvenciára történő mutációjával kompenzál. Ehhez a feltételezéshez szolgáltunk kísérleti bizonyítékokkal ebben a tanulmányban. A szubsztrát-kötő régióban egyszeres mutációkat tartalmazó gyógyszerrezisztens proteáz variánsokat teszteltük az addig ismert összes, a kinetikát várhatóan befolyásoló hasítási hely mutációra, valamint molekuláris modellezés segítségével értelmeztük is a kapott kinetikai eredményeket. Fehér Anita többek között ennek a közleménynek a felhasználásával szerezte meg a PhD fokozatát 2004-ben. A közleményt eddig 63-szor idézték, 2020-ban is van rá több független citáció. A HIV proteáz inhibitorokkal szemben kialakuló rezisztencia során kialakuló Gag mutációk molekuláris hatását a továbbiakban mi nem vizsgáltuk. Az atlantai kollaboráció keretében inkább az egyedi gyógyszerrezisztens mutációk részletes, molekuláris alapú értelmezésén dolgoztunk [6-10], míg a kutatócsoportunk érdeklődése más retrovírus proteázok, illetve azok összehasonlító vizsgálata felé fordult [11-14], mely kutatások reményeink szerint jelentősen hozzájárultak e különleges enzim működésének jobb megértéséhez.

#### Irodalomjegyzék

- [1] Tőzsér, J., Bláha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991) Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett*, **281**: 77-80.
- [2] Tőzsér, J., Bagossi, P., Weber, I.T., Louis, J.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1997) Studies on the symmetry and sequence context dependence of the HIV-1 proteinase specificity. *J Biol Chem*, **272**: 16807-16814.
- [3] Boross, P., Bagossi, P., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Louis, J.M. and Tőzsér, J. (1999) Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. *Eur J Biochem*, **264**: 921-929.
- [4] Mahalingam, B., Boross, P., Wang, Y.F., Louis, J.M., Fischer, C.C., Tőzsér, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2002) Combining mutations in HIV-1 protease to understand mechanisms of resistance. *Proteins*, **48**: 107-116.
- [5] Doyon, L., Croteau, G., Thibeault, D., Poulin, F., Pilote, L., and Lamarre, D. (1996) Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J. Virol*, **70**: 3763-3769.
- [6] Mahalingam, B., Wang, I.F., Boross, P., Tőzsér, J., Louis, J.M., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2004) Crystal structures of HIV protease V82A and L90M

- mutants reveal changes in indinavir binding site. *Eur J Biochem*, **271**: 1516-1524.
- [7] Tie, Y., Boross, P., Wang, Y.F., Gaddis, L., Liu, F., Chen, X., Tözsér, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2005) Molecular basis for substrate recognition and drug resistance from 1.1-1.6 Å resolution crystal structures of HIV-1 protease mutants with substrate analogs. *FEBS J*, **272**: 5265-5277.
- [8] Liu, F., Boross, P.I., Wang, Y.F., Tözsér, J., Louis, J.M., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2005) Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J Mol Biol*, **354**: 789-800.
- [9] Tie, Y., Kovalevsky, A.Y., Boross, P., Wang, Y.F., Ghosh, A.K., Tozser, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2007) Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir. *Proteins*, **67**: 232-242.
- [10] Wang, Y.F., Tie, Y., Boross, P.I., Tözsér, J., Ghosh, A.K., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2007) Potent antiviral GRL-98065 shows similar inhibition and structural interactions with drug resistant mutants and with wild-type HIV-1 protease. *J Med Chem*, **50**: 4509-4515.
- [11] Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., and Tözsér, J. (2004) Narrow substrate specificity and sensitivity towards ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus protease. *J Biol Chem*, **279**: 27148-27157.
- [12] Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P. and Tözsér, J. (2005) Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol*, **79**: 4213-4218.
- [13] Kádas J., Boross P., Weber, I.T., Bagossi, P., Matúz K. and Tözsér J. (2008) C-terminal residues of mature human T-lymphotropic virus type 1 protease are critical for efficient dimerization and for catalytic activity. *Biochem J* **416**: 357-364.
- [14] Eizert, H., Bander, P., Bagossi, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Boross, P., Weber, I.T. and Tözsér, J. (2008) Amino acid preferences of retroviral proteases for amino-terminal positions in a type 1 cleavage site. *J Virol*, **82**: 10111-10117.



**Tózsér József** a Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének intézetvezető egyetemi tanára, a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium és a Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola vezetője. Fő kutatási területe a retrovírusok életciklusának és a virális fehérjék funkcióinak vizsgálata. Vegyész diplomát szerzett a debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetemen 1983-ban. Kandidátusi és akadémiai doktori címet 1994-ben, illetve 2002-ben kapott, ez utóbbi évben habilitált is a Debreceni Egyetemen. Több mint 130 idegen nyelvű lektorált közlemény szerzője, illetve társszerzője. H-indexe 40, közleményeire kapott hivatkozások száma 5364 (Google Scholar szerint).