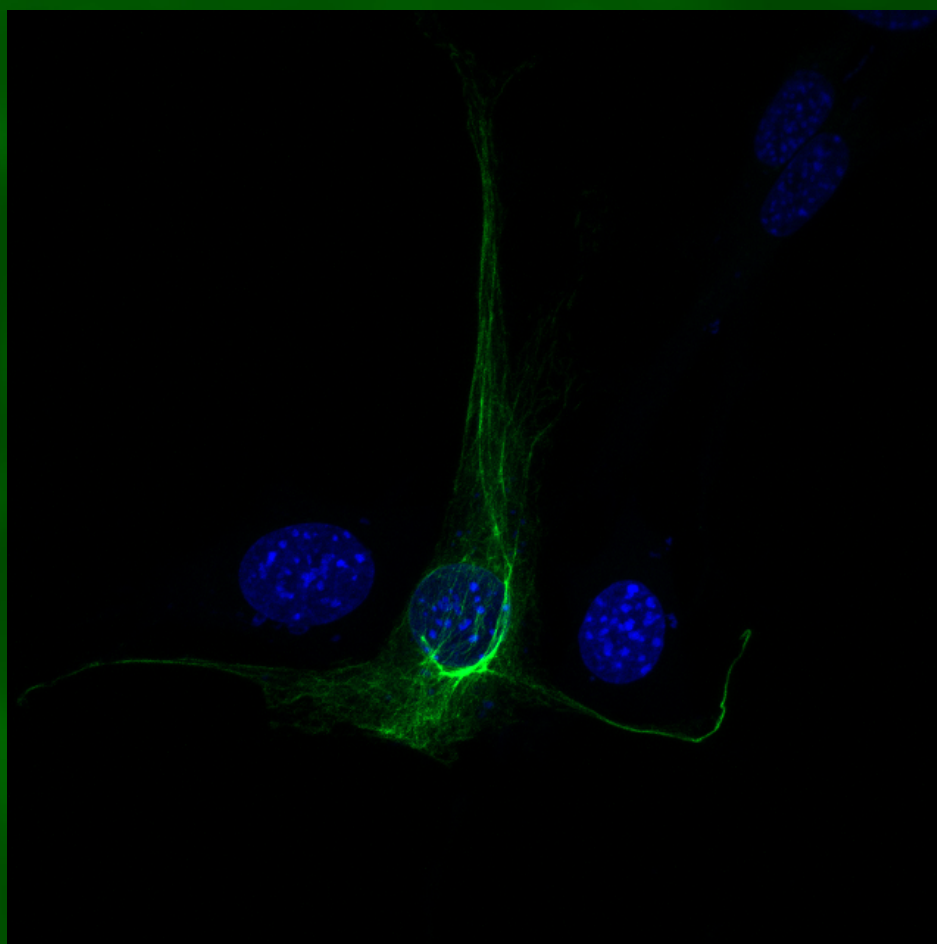


# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLIV. évfolyam 4. szám

2020. december



# 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 4. SZÁM**

**2020. december**

## TARTALOMJEGYZÉK

*Címlapkép: CRISPR-háló. CRISPR/Cas9 technikával létrehozott vimentin-GFP fúziós fehérjét expresszáló egér emlőtumor sejtvonala. A Vimentin-GFP jellegzetes hálózatos struktúrája zöld, a sejtmag DAPI festése kék. A konfokális mikroszkópos képet Bartos Zsuzsa készítette (TTK, Enzimológiai Intézet).*

### AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak ..... 4.

### HAZAI TUDOMÁNYOS MŰHELYEK

Bodai László: Epigenetikai jelenségek és neurodegeneráció vizsgálata az SZTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékén ..... 5.

Szabó Ildikó, Bősze Szilvia: Az aminosav analízis múltja és jelene a Peptidkémiai Kutatócsoport és az ELTE TTK Kémiai Intézet Szerves Kémiai Tanszék Mikroanalitikai Laboratóriumában ..... 12.

### REVIEW

Kulcsár Péter István, Tóth András, Huszár Krisztina, Varga Éva, Krausz Sarah Laura, Tóth Eszter, Welker Ervin: A Nobel-díjat érő genetikai olló ..... 27.

### TUDOMÁNYOS CIKK

Igaz Nóra, Kiricsi Mónika: A fém nanorészecskék és a hiszton-deacetiláz inhibitorok tumorellenes hatásának sokszínűsége ..... 45.

### EGYESÜLETI HÍREK

Bemutatkozik a Magyar Biokémiai Egyesület új Intézőbizottsága ..... 58.

### FELHÍVÁSOK

A 2020. évi kiemelkedő cikkek listájának beküldése ..... 62.

Alapítvány a Tudományos Szemészetért pályázata ..... 63.

*Kellemes karácsonyt és egészségben, sikerekben gazdag, boldog új évet kívánunk!*



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. SZEPTEMBER 15. ÉS 2020. DECEMBER 15.  
KÖZÖTT**

**A Magyar Tudományos Akadémia tudományos osztályainak vezető tisztségeibe** a 2020–2023-as akadémiai ciklusra az MBKE tagjai közül a következők kerültek megválasztásra:

**Ádám Veronika** (akadémikus, Semmelwies Egyetem), Orvosi Tudományok Osztálya, osztályelnök,

**Buday László** (akadémikus, az MBKE elnöke, MTA TTK Enzimológia Intézet), Biológiai Tudományok Osztálya, osztályelnök-helyettes.

Hagyományosan Bolyai-plakettel és emléklappal díjazzák azokat a korábbi ösztöndíjasokat, akik a legkiválóbb beszámolókat nyújtják be a támogatás keretében végzett kutatásaikról. A 184 zárójelentést benyújtó ösztöndíjas közül 14 főnek ítélték oda a Bolyai-plakettet és 80-an kaptak Bolyai-emléklapot.

**MTA Bolyai-plakett** kitüntetésben részesült **Kintses Bálint** (Szegedi Biológiai Kutatóközpont).

**Bolyai-emléklapot** kapott:

**Kereszturi Éva** (Semmelweis Egyetem),

**Kintses Bálint** (Szegedi Biológiai Kutatóközpont),

**Vas Virág** (Természettudományi Kutatóközpont).

**Gratulálunk a kitüntetetteknek!**

## EPIGENETIKAI JELENSÉGEK ÉS NEURODEGENERÁCIÓ VIZSGÁLATA AZ SZTE BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉKÉN

**Bodai László**  
**Szegedi Tudományegyetem, TTIK,**  
**Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék**  
**e-mail: [bodai@bio.u-szeged.hu](mailto:bodai@bio.u-szeged.hu)**

A Szegedi Tudományegyetem (SZTE) Biokémiai és Molekuláris Biológiai tanszékén Bodai László vezetésével működő kutatócsoport érdeklődési területe elsősorban kromatinbiológiai jelenségek, valamint neurodegeneratív folyamatok molekuláris biológiai hátterének vizsgálatára terjed ki. Bodai László 1997-ben az akkori József Attila Tudományegyetemen (JATE, Szeged) szerzett molekuláris biológus és biotechnológus ágazatú biológus diplomát. 1997. és 2000. között doktori képzésben vett részt a JATE Genetikai Tanszékén Dr. Maróy Péter témavezetésével, majd az ösztöndíj lejárta után két évet töltött Dr. J. Lawrence (Larry) Marsh laboratóriumában a University of California, Irvine (UCI) Fejlődés- és Sejtbiológiai Tanszékén. Ez utóbbi helyen végzett munkáján alapult PhD disszertációja, amelyet 2004-ben védett meg az SZTE-n. Ezt követően Szegeden Dr. Boros Imre, illetve Irvine-ban Larry Marsh laboratóriumában töltött posztdoktori évek után az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékén fogott önálló kutatócsoport kialakításába. 2014-ben az SZTE-n habilitált biológia tudományból, ahol azóta egyetemi docens (2018-tól tanszékvezető) beosztásban dolgozik. E kezdeti ismertető után szakítanék caesari, harmadik személyben való tárgyalástól.

A laboratórium alapítása 2008-ra tehető (a bizonytalanság nem véletlen – az SZTE-n formálisan nincsenek a tanszékeknél kisebb működési egységek, így a kutatócsoport „hivatalosan” jelenleg sem létezik), amikor OTKA PD pályázati támogatással önálló kutatási programot tudtam indítani. A csoport kutatási profiljának – epigenetikai jelenségek és neurodegeneráció patomechanizmusainak vizsgálata *Drosophila melanogaster* modellben – kialakulásához vezető út azonban már szakdolgozó koromban megkezdődött, amikor Dr. Gausz János irányításával a *Drosophila* GAGA faktor kromatin szabályozó faktorról, valamint a *Bithorax complex* nevű homeotikus génkomplex egyes cisz-szabályozó elemeivel kölcsönható gének vizsgálatában és azonosításában vettem részt. A labor profiljának neurodegeneratív folyamatok vizsgálatával kapcsolatos ága a UCI-on töltött fiatal kutatói és posztdoktori években gyökerezik. Larry Marsh

laboratóriumában az odakerülesem előtti években hoztak létre a Huntington kór (HD) modellezésére használható *Drosophila* törzseket, amelyek vizsgálatába aztán én is bekapcsolódtam. Ezen kutatások során – többek között – a betegség modellre ható epigenetikai faktorokat is vizsgáltunk és először mutattuk ki HD állat modellben, hogy hiszton deacetiláz enzimek gátlásával a patológiás folyamatok enyhíthetőek [1].

Szegedi laboratóriumunk első kutatási projektjében génaktivációt kísérő hiszton poszttranszlációs módosítások (PTM) jellemzését tűztük ki célul, modellként az ekdizon vedlési hormon indukálta korai géneken bekövetkező kromatin szintű változásokat vizsgáltuk. A kromatinnak – a genom sejtmagban található funkcionális formájának – az alapvető építő egységei a heterooktamer hiszton fehérje magból és az erre tekert DNS-ből álló nukleoszómak. A kromatin e legalapvetőbb szintjének módosításai, így a nukleoszóma pozícionálása, a hiszton fehérjék PTM-ai, hiszton variánsok cseréje a nukleoszóma szabályozó szerepet töltenek be a génkifejeződés során. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy egyes ekdizon indukálta korai gének promóterein a gének aktivációjakor a H3 hiszton K23 lizinjének (H3K23) acetilációja fokozódik, amelyért a *Drosophila* CREB-Binding Protein (dCBP) hiszton acetiltransferáz felelős [2]. További kromatinbiológiai kutatásaink során vizsgáltuk hiszton módosító enzimek, valamint hiszton variánsok funkciót is. Az egyik vizsgálataink tárgyát képező ilyen enzim a Hat1, amely egy konzervált, ún. B-típusú, citoplazmatikus hiszton acetiltransferáz. Bár vizsgálataink szerint ez az enzim kizárólagosan felelős az újonnan szintetizált H4 hisztonokra jellemző K5K12 diacetilációs mintázatért *Drosophila* embriókban, hiánya csak kismértékű életképesség csökkenéshez vezet. *Hat1* null mutáns embriókban nagyszámú (több mint 2100) gén mutatott transzkripció szint változást, minek okaként az enzim által katalizált módosítások hiányában az egyedfejlődési transzkripció programban beálló megcsúszás tudható be [3]. A H4 hiszton egy variánsának, a hiszton génklaszteren kívül kódolt, de a H4-gyel azonos aminosav sorrendű His4r-nek a funkcióját is vizsgáltuk. A His4r – mely a Hat1-hez hasonlóan ugyancsak nem bizonyult az életképesség szempontjából esszenciálisnak – egyes hősokk gének esetében befolyásolja transzkripció aktivitásukat és a szabályozó régióikon kialakuló kromatin szerkezetet.

A neurodegenerációs folyamatok molekuláris biológiai alapjainak vizsgálatát elsősorban a Huntington kór *Drosophila* modelljében végezzük. A Huntington kór egy végzetes következményekkel járó, domináns módon öröklődő neurodege-

neratív megbetegedés, amelyet a *huntingtin* (*HTT*) gén első exonjában található polimorf CAG trinukleotid ismétlődés meghosszabbodása [4] és ennek eredményeként a mutáns Htt fehérjében kialakuló, aggregációra hajlamos hosszú poliglutamin (polyQ) ismétlődés vált ki. Jelenleg további nyolc hasonló, gének kódoló régiójában található CAG ismétlődés meghosszabbodása által kiváltott neurodegeneratív megbetegedést tartanak számon. Bár a HD-nél vannak jóval gyakrabban előforduló, idegsejt pusztulással járó megbetegedések is, mint pl. az Alzheimer- és a Parkinson-kór, ezek gyenge genetikai meghatározottsága miatt nehéz megfelelően megalapozott (valid) állatmodelleket létrehozni. Ezzel szemben HD esetében – annak monogénes domináns volta miatt – genetikailag megalapozott állatmodellek széles köre áll rendelkezésre, amelyek segítségével a betegség patomechanizmusainak feltárásában elért eredményekre alapozva szokták a Huntington kórt esetenként „a leggyógyíthatóbb gyógyíthatatlan idegrendszeri megbetegedés”-nek nevezni. Kísérleteinkben jellemzően a betegség ún. „exon 1”-es *Drosophila* modelljeit alkalmazzuk, melyek patológiás hosszúságú polyQ domént kódoló humán HTT első exonjának idegsejt specifikus expresszióján alapszanak. Vizsgálataink során leginkább a HD-ban megfigyelhető transzkripcionális zavar háttérében álló epigenetikai jelenségek részletesebb megértésére törekszünk, de az évek során a patomechanizmus egyes más összetevőit is tanulmányoztuk. Feltételezésünk szerint a betegségben megfigyelhető transzkripciós zavarért és egyes ezen alapuló jellemző tünetekért, mint pl. a *Drosophila* modellünkben is megfigyelt cirkadián gének transzkripciós aktivitás változásával együtt járó alvászavarért [5] a kromatin szerkezet hibás módosításai felelősek. A betegségre ható kromatin módosító faktorokat vizsgálva kimutattuk, hogy a korábban jellemzett hiszton deacetilázok mellett egyes hiszton acetiltransferázok mutációi is módosító hatással bírnak a mutáns Htt kiváltotta fenotípusokra: míg a *Pcaf/dGcn5* acetiltransferáz csökkent mennyisége súlyosbítja [6], a *Hat1* részleges hiánya csökkenti a neurodegeneráció mértékét [3]. Hiszton metiltransferázokkal és demetilázokkal végzett genetikai interakciós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a fakultatív heterokromatin kialakításában kulcsfontosságú H3K27-es lizin metiláltsági állapotát befolyásoló faktorok specifikus hatással bírnak a mutáns Htt kiváltotta fenotípusokra. Így a Utx trimetilált-H3K27 specifikus demetiláz szintjének genetikai vagy farmakológiai módszerrel történő csökkentése visszaszorítja a neurodegeneráció mértékét és a mutáns Htt aggregátumok mennyiségét [7]. A fenti módszerekkel azonosított hatású hiszton módosító enzimek célpontjait keresve H3 és H4 hisztonok N-terminális farki régiójában található lizin aminosav-maradékok poszt-transzlációs

módosításainak szerepét PTM mimikáló pontmutáns hiszton transzgének segítségével vizsgáltuk. Mind a két hisztonon sikerült olyan pozíciókat azonosítanunk, amelyek kritikusnak tűnnek a HD patogenezise szempontjából. A kromatin központú vizsgálatok mellett jelenleg olyan, a mutáns Htt kiváltotta patológiás folyamatokra ható vagy az által érintett további faktorokat és folyamatokat tanulmányozunk, mint a protein deubiquitinázok, illetve a miRNS diszreguláció szerepe.



**1. ábra. A kutatócsoport a 2020. őszi pandémia idején.** Balról jobbra: Siági Fruzsina (PhD Hallgató), Farkas Anita (PhD hallgató), Faragó Anikó (tudományos segédmunkatárs), Dr. Bodai László (egyetemi docens), Nagy Gábor (tanszéki mérnök), Szalai Szilvia (asszisztens), Krisztin-Németh Alexandra (szakdolgozó), Bodrogi Andrea (szakdolgozó), Dr. Zsindely Nóra (tudományos munkatárs).

A laboratórium kutatási profiljának egy további meghatározó elemét adják a genomikai és funkcionális genomikai kutatások. A Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékre 2013 végén, Dr. Boros Imre tanszékvezetősége idején került HURO pályázati forrásból egy Illumina MiSeq új-generációs DNS szekvenáló (NGS) berendezés. Erre a szekvenátorra és a hozzá kapcsolódó kiegészítő berendezésekre alapozva alakítottuk ki a tanszéken a genomikai laboratóriumot, amelynek vezetői, működtetői feladatait jómagam láttam és látom el. A kezdeti



1-2 évben a labor egyszemélyes formában működött, majd sorra kapcsolódtak be a munkába olyan fiatal munkatársak, akik aztán jártasságot szereztek az NGS alapú genomikai és transzkriptomikai vizsgálatokban. Közülük Dr. Zsindely Nóra és Faragó Anikó a különböző minta preparálási és könyvtár készítési eljárásokra, Nagy Gábor a bioinformatikai analízisre specializálódtak. Ez a csapat az elmúlt évek során jelentős tapasztalatokat szerzett különféle genomikai (vírus, baktérium és gomba genom meghatározás, variáns analízis) [8–12], transzkriptomikai (mRNS és miRNS transzkriptóm analízis) [13–17] és epigenomikai (ChIP-seq, FAIRE-seq, biszulfid szekvenálás) vizsgálatokban; gyakran együttműködésben az SZTE TTIK Biológia Intézet, az SZTE ÁOK, valamint a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai, Genetikai, illetve Növénybiológiai Intézeteinek kutatócsoportjaival.

A kutatócsoport működéséhez – mint ahogy az általánosságban is elmondható – elengedhetetlen a megfelelő gárda és a kutatásokat támogató pályázati források. A laboratóriumban jelenleg két PhD-val rendelkező kutató, egy tudományos segédmunkatárs, két PhD hallgató, egy tanszéki mérnök, egy asszisztens és két szakdolgozó hallgató dolgozik (1. ábra). Az elmúlt évek eredményei elsősorban Faragó Anikó, Farkas Anita, Dr. Varga Júlia és Dr. Zsindely Nóra munkáján alapultak. A kutatásokat az OTKA 72491 és 112294, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00032, GINOP-2.3.2-15-2016-00034 és GINOP-2.3.2-15-2016-00035 pályázatok támogatták. Bodai László MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00522/19/8) támogatásában részesült. Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-5-SZTE-642 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

## Irodalomjegyzék

- [1] Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh, J.L., Thompson, L.M. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, **413**: 739–743.
- [2] Bodai, L., Zsindely, N., Gáspár, R., Kristó, I., Komonyi, O., Boros, I.M. (2012) Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, **7**: e40565.
- [3] Varga, J., Korbai, S., Neller, A., Zsindely, N., Bodai, L. (2019) Hat1 acetylates histone H4 and modulates the transcriptional program in

- Drosophila embryogenesis. *Sci Rep*, **9**: 17973.
- [4] The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**: 971–983.
- [5] Faragó, A., Zsindely, N., Bodai, L. (2019) Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Sci Rep*, **9**: 7174.
- [6] Bodai, L., Pallos, J., Thompson, L.M., Marsh, J.L. (2012) Pcaf modulates polyglutamine pathology in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Neurodegener Dis*, **9**: 104–106.
- [7] Song, W., Zsindely, N., Faragó, A., Marsh, J.L., Bodai, L. (2018) Systematic genetic interaction studies identify histone demethylase Utx as potential target for ameliorating Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **27**: 649–666.
- [8] Papp, C., Kocsis, K., Tóth, R., Bodai, L., Willis, J.R., Ksiezopolska, E., Lozoya-Pérez, N.E., Vágvölgyi, C., Mora Montes, H., Gabaldón, T., Nosanchuk, J.D., Gácsér, A. (2018) Echinocandin-Induced Microevolution of *Candida parapsilosis* Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance. *mSphere*, **3**: e00547-18.
- [9] Huliák, I., Bodai, L., Czepán, M., Kovács, D., Szabó, A., Tiszlavicz, L., Lázár, G., Rakonczay, Z., Hegyi, P., Boros, I.M., Kiricsi, M. (2019) Genetic, epigenetic and transcriptional comparison of esophagus tumor-associated and adjacent normal myofibroblasts. *Oncol Rep*, **41**: 839–852.
- [10] Dunai, A., Spohn, R., Farkas, Z., Lázár, V., Györkei, Á., Apjok, G., Boross, G., Szappanos, B., Grézal, G., Faragó, A., Bodai, L., Papp, B., Pál, C. (2019) Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion. *Elife*, **8**: e47088.
- [11] Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G., Méhi, O., Kintses, B., Számel, M., Jangir, P.K., Csörgő, B., Györkei, Á., Bódi, Z., Faragó, A., Bodai, L., Földesi, I., Kata, D., Maróti, G., Pap, B., Wirth, R., Papp, B., Pál, C. (2019) Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun*, **10**: 4538.
- [12] Papp, C., Bohner, F., Kocsis, K., Varga, M., Szekeres, A., Bodai, L., Willis, J.R., Gabaldón, T., Tóth, R., Nosanchuk, J.D., Vágvölgyi, C., Gácsér, A. (2020) Triazole Evolution of *Candida parapsilosis* Results in Cross-Resistance to Other Antifungal Drugs, Influences Stress Responses, and Alters Virulence in an Antifungal Drug-Dependent Manner. *mSphere*, **5**: e00821-20.

- [13] Chakraborty, T., Thuer, E., Heijink, M., Tóth, R., Bodai, L., Vágvölgyi, C., Giera, M., Gabaldón, T., Gácsér, A. (2018) Eicosanoid biosynthesis influences the virulence of *Candida parapsilosis*. *Virulence*, **9**: 1019–1035.
- [14] Vedelek, V., Bodai, L., Grézal, G., Kovács, B., Boros, I.M., Laurinyecz, B., Sinka, R. (2018) Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. *BMC Genomics*, **19**: 697.
- [15] Jankovics, F., Bence, M., Sinka, R., Faragó, A., Bodai, L., Pettkó-Szandtner, A., Ibrahim, K., Takács, Z., Szarka-Kovács, A.B., Erdélyi, M. (2018) *Drosophila* small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation. *Development*, **145**: dev170639.
- [16] Kovács, D., Igaz, N., Marton, A., Rónavári, A., Bélteky, P., Bodai, L., Spengler, G., Tizslavicz, L., Rázga, Z., Hegyi, P., Vizler, C., Boros, I.M., Kónya, Z., Kiricsi M. (2020) Core-shell nanoparticles suppress metastasis and modify the tumour-supportive activity of cancer-associated fibroblasts. *J Nanobiotechnology*, **18**: 18.
- [17] Szabó, M.R., Gáspár, R., Pipicz, M., Zsindely, N., Diószegi, P., Sárközy, M., Bodai, L., Csont, T. (2020) Hypercholesterolemia Interferes with Induction of miR-125b-1-3p in Preconditioned Hearts. *Intern J Mol Sci*, **21**: 3744.

## AZ AMINOSAV ANALÍZIS MŰLTJA ÉS JELENE A PEPTIDKÉMIAI KUTATÓCSOPORT ÉS AZ ELTE TTK KÉMIAI INTÉZET SZERVEZÉS KÉMIAI TANSZÉK MIKROANALITIKAI LABORATORIUMÁBAN

*Szabó Ildikó és Bősze Szilvia  
ELKH Peptidkémiai Kutatócsoport*

### **Rövid történeti áttekintés: a mérföldkövet jelentő ninhidrin derivatizálást alkalmazó aminosavanalizátorok bemutatása**

A fehérjék neve a görög *proteios* = „elsődleges fontosságú” szóból ered, amely kifejezést a svéd Jörs Jakob Berzelius (1770–1848) 1839-ben használta első ízben, utalva a fehérjék élő szervezetekben betöltött kulcsfontosságú szerepére. Az 1900-as évek elején Emil Fischer (1852–1919) már leírta - és ezen eredményekért 1902-ben Nobel-díjban részesült -, hogy a fehérjék építőkövei az aminosavak, melyek egymáshoz kötődve alkotják a polipeptid láncot [1].

A 20. század első felében a fehérjékkel és aminosavakkal kapcsolatos kutatások két fő irányát figyelhetjük meg: 1) táplálkozásban betöltött szerepükkel, illetve a 2) kémiai összetételük, szerkezetük meghatározásával kapcsolatos kutatásokat. Több évtizedes kísérleti munka vezetett a fehérjéket felépítő hús, természetben előforduló aminosav leírásához és azon felismeréshez, hogy ezen vegyületek felét képes az emberi szervezet előállítani, míg a többi a táplálékkal kerülhet a szervezetbe. Ma már azt is tudjuk, hogy ez a hús aminosav csupán töredéke a természetben előforduló aminosavaknak és származékoknak.

Mind a biokémikusok, mind a táplálkozással foglalkozó kutatók esetében nagy jelentőséggel bírt, hogy meghatározzák az egyes aminosavak jelenlétét, illetve mennyiségét adott fehérjékben. A mennyiségi meghatározások első lépése a peptidkötés megszüntetése, a fehérje építőelemeire, az aminosavakra történő bontása. Ennek legegyszerűbb és leghatékonyabb módja a különböző hidrolízis módszerek (leggyakrabban savas) alkalmazása volt. Az aminosavakra történő bontást követte az aminosavak elválasztása, majd mennyiségi meghatározása. Emil Fischer a pontos aminosav összetétel meghatározásakor frakcionált desztillációt alkalmazott, kihasználva azt a tényt, hogy az aminosav észterek könnyen desztillálhatók. A 20. század elején több kutatócsoportban több-kevesebb sikerrel számos egyéb módszert kipróbáltak (szelektív kicsapás, kolorimetriás analízis, mikrobiológiai tesztek) [2].

Az igazi áttörést az 1940-es évek elején Archer John Porter Martin és Richard

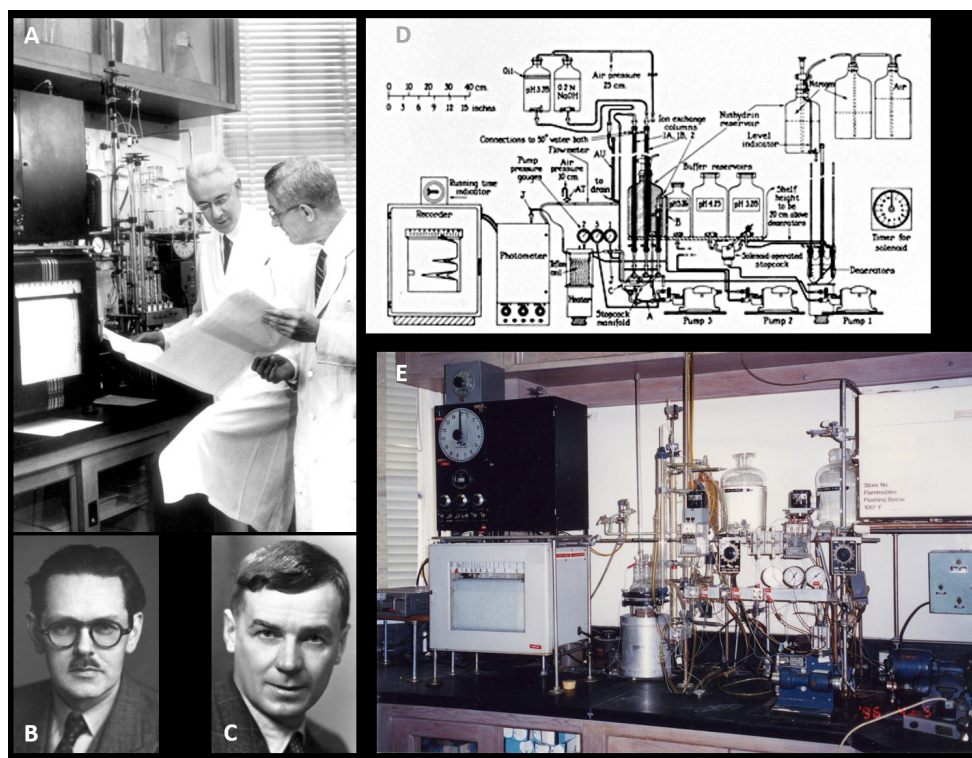
Laurence Millington Syngé módszere hozta (Nobel-díj, 1952; <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1952/summary/>), akik az oszlop-, a megoszlási-, illetve papírkromatográfia bevezetésével lehetővé tették az aminosavak egyszerű elválasztását és egyidejű analízisét [2-4]. Syngé 1944-ben keményítővel töltött oszlopon megoszlási kromatográfia segítségével meghatározta peptidek aminosav szekvenciáját. Ezen munkája vezetett a ciklusos, tíz aminosavból álló gramicidin S szerkezetének meghatározásához [5-8]. Syngé módszerét tovább fejlesztve Frederick Sangernek (Cambridge Egyetem, Egyesült Királyság) sikerült meghatároznia az ötvenegy aminosavból álló inzulin szerkezetét [9], eredményeiért 1958-ban kémiai Nobel-díjjal jutalmazták.

Emil Fischer hallgatója, majd munkatársa Max Bergmann (1884–1944) 1933-ban elhagyva Németországot, csatlakozott az Egyesült Államok Rockefeller Intézetéhez, ahol hamarosan laboratóriumot alapított. Bergmann a legtehetségesebb fiatal, posztdoktor tudósokkal vette körül magát, ezáltal csoportja a fehérjekémiai kutatások egyik fellegvárává vált, az ott lévő kutatók pedig a legjelentősebb fehérjekémikusokká. Közülük is kiemelkedő volt William H. Stein (1911–1980) és Stanford Moore (1913–1982) munkássága (1. ábra).

Bergmann laboratóriumában két fő kutatási irány volt: 1) a proteolitikus enzimekkel kapcsolatos vizsgálatok, illetve a 2) a fehérjék szerkezetével kapcsolatos kutatások. Moore és Stein ez utóbbi munkákban vett részt, feladatuk az aminosavakból származékképzéssel (főként nehezen oldódó aminosav sók előállítás), majd gravimetriás módszerrel történő elválasztásuk továbbfejlesztése, optimálása volt [10-12]. Bergmann 1944-ben bekövetkezett hirtelen halála és a II. világháború befejezése után a kutatások egy részét Moore és Stein vezette tovább és folytatták a mennyiségi meghatározásokhoz kötődő munkákat. Ekkor kezdődött a négy évtizedig tartó szoros együttműködésük, ami az aminosavak mennyiségi elemzéséhez és a folyamatok automatizálásához vezetett.

A háborút követően Moore és Stein olvasta Syngé a *British Biochemical Journalban* megjelent, szabad aminosavak kromatográfiás elválasztásáról szóló munkáját [5, 6], amit azonnal alkalmazni, tökéletesíteni kezdtek. Az oszlopról eluálódó folyadékokat kis frakciókban gyűjtötték, és az egyes frakciók aminosav tartalmának mennyiségi meghatározását az aminosavak és a ninhidrin színreakciójának adaptálásával hajtották végre. A reakció során a ninhidrin

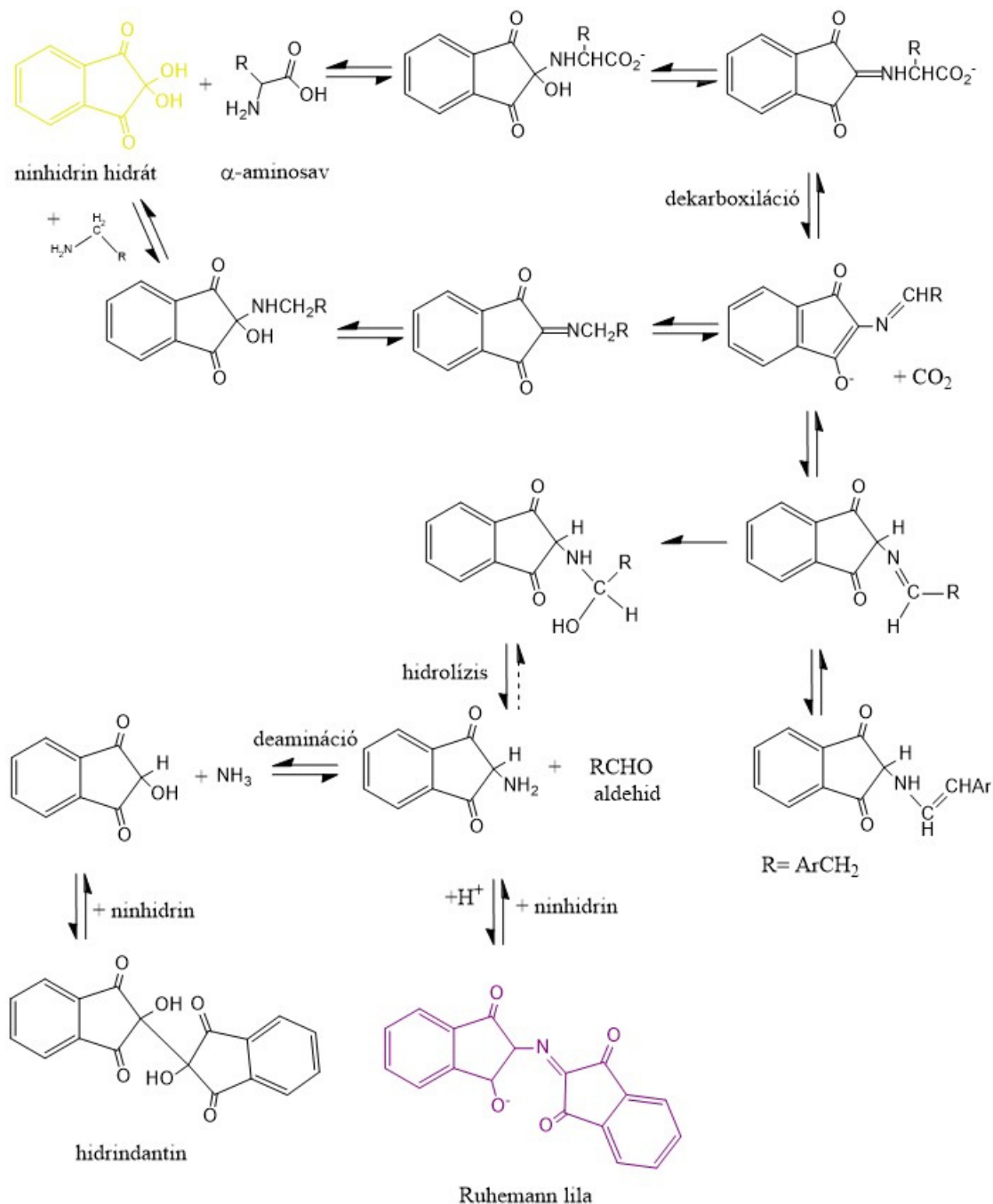
primer aminocsoporttal rendelkező molekulákkal lila színű terméket képez, míg szekunder aminokkal ez a színváltozás nem következik be, nemcsak a kiindulási ninhidrin, hanem a termék színe is sárga. Azonban a két termék különböző elnyelési maximumokkal rendelkeznek, így módon két hullámhosszon detektálható mindkét típusú termék.



**1. ábra. Az aminosav analízis múltja.** A) William H. Stein és Stanford Moore Max Bergmann laboratóriumában az eredményeket értékeli (a kép forrása: <https://www.the-scientist.com/foundations-old/the-first-automated-amino-acid-analyzer-47271>). B, C) A. J. Porter Martin and R. L. Millington Synge (kémiai Nobel-díj 1952) az aminosavak elválasztásához szükséges nélkülözhetetlen első kromatográfiás módszerek kidolgozói. D, E) A Moore és Stein által fejlesztett aminosavanalizátor egyszerűsített vázlata (a forráscikkben szereplő vázlat) és a berendezés fényképe forrás: [https://americanhistory.si.edu/collections/search/object/nmah\\_333356](https://americanhistory.si.edu/collections/search/object/nmah_333356).

A keményítőoszlopok ugyan jól működtek, de nagyon lassúak voltak. Ezért Moore és Stein más lehetőségeket kerestek. Így találtak rá az ioncserélő kromatográfiával kapcsolatos publikációkra [13-16], amelyek közül a fehérje-hidrolizátumokkal kapcsolatos eredmények felkeltették az érdeklődésüket [17]. Ezekből az eredményekből kiindulva intenzív, gondos és szisztematikus vizsgálatok kezdődtek Moore és Stein laboratóriumában C. H. W. Hirs részvételével [18]. A vizsgálatok során feltérképezték az ioncserélő kromatográfia minden aspektusát, és nemcsak a kvantitatív aminosavanalízisben rejlő potenciális lehetőségeket, hanem a szemipreparatív léptékű elválasztásban való alkalmazhatóságát is [19].

1954-ben megkezdődtek a ribonukleáz enzim aktív centrumával kapcsolatos szerkezeti és funkcionális vizsgálatok, amelyek a molekula teljes aminosav-szekvenciájának meghatározására irányultak.



**2. ábra. Ninhidrin reakció menete és a keletkező aminosavszármazékok szerkezete.** A ninhidrinnel való reakcióban az aminosavakból ugyanaz a lila színű termék keletkezik, a termék elnyelési maximuma 570 nm. A prolin (és hidroxiprolin) esetében a teljes molekula részt vesz a reakcióban, a képződő sárga színű termék elnyelési maximuma 440 nm.

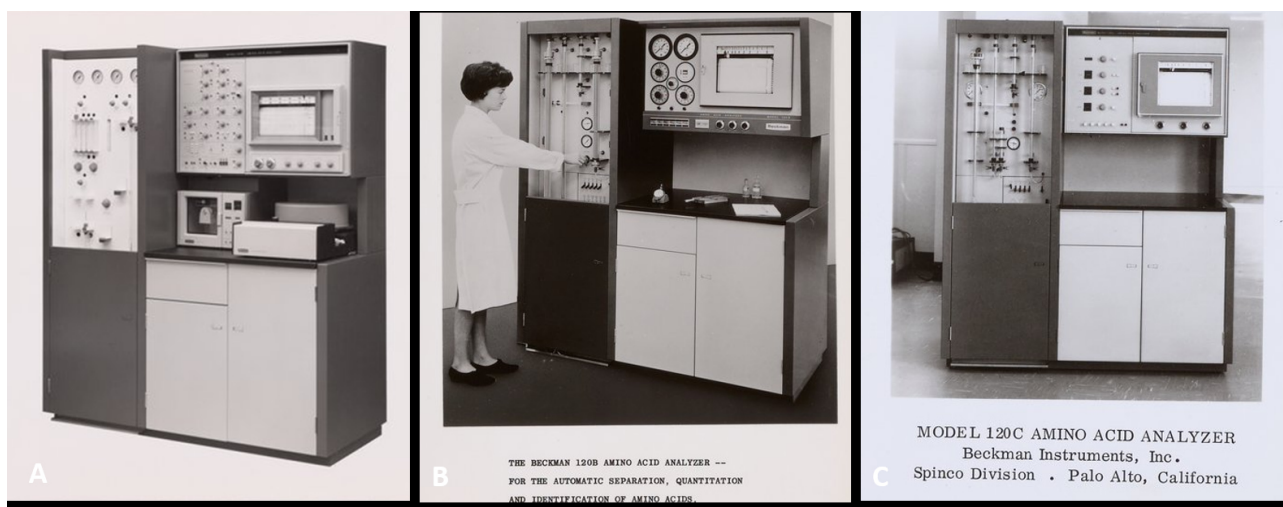
Ezen vizsgálatok során nagyon sok fehérjehidrolizátum analízisét kellett elvégezniük. Ezek a vizsgálatok kezdetben több napig tartottak a manuális

eljárásnak köszönhetően, emiatt fontos volt az elemzési idő csökkentésére, amit automatizálással kívántak elérni. Moore mérnök volt, így elhatározták, hogy körbejárják egy automatizált aminosavanalizátor fejlesztésének lehetőségét. Ebben a munkában új munkatársuk, az 1954-ben szintén mérnökként végzett Darrel H. Spackman vett részt [20]. A fejlesztés két irányban haladt, egyrészt az ioncserélő szeparációs folyamat optimalítása, másrészt az elválasztást és a mennyiségi elemzést lehetővé tevő műszer fejlesztése. Az aminosavak elválasztására kétoszlopos rendszert választottak, amelyben a savas és semleges aminosavak elválasztására egy „hosszú” (150 cm), a bázikus aminosavakra egy „rövid” (15 cm) oszlopot alkalmaztak. A két oszlopon zajló elválasztás oka az volt, hogy a bázikus aminosavak az első, egyoszlopos rendszereken ellaposodott, rosszul elváló kromatográfiás csúcsokat adtak, és az oszlop regenerálása minden esetben lezajlott. Ez nehézkessé tette az eljárást és akadályozta a zökkenőmentes automatizálást. A folyamatos működés lehetőségének biztosítása érdekében két hosszú oszlop került a rendszerbe: míg az egyiket mintát elemeztek, a másikat regenerálták. Ily módon, amikor az egyik elemzési ciklus befejeződött az egyik oszlopon, a második már készen állt a következő mintára. Ezen intenzív kutatások során az elválasztást is tökéletesítették, amely kísérletek többek között a szulfonált polisztirol gyanták kifejlesztéséhez vezettek [21]. Ezek a gyanták lehetővé tették a nagyobb áramlási sebesség alkalmazását anélkül, hogy az elválasztási hatékonyság csökkent volna. Az első prototípus analízátorokban három oszlop volt, amelyeket termosztátban helyeztek el. Reciprok pumpák biztosították az elválasztáshoz és a regeneráláshoz szükséges eluensek, pufferek állandó áramlását. A készülékben két, 570 és 440 nm hullámhosszon működő detektor kapott helyet a frakciók azonosítására. Az oszlopok és a detektor közé beépítettek egy reaktort, amely biztosította az oszlopról eluálódó folyadék folyamatos ninhidrin reagenssel történő keveredését. Ily módon az aminosavak reagáltak a ninhidrinnel, detektálható színes vegyületeket képezve. A berendezés egyszerűsített vázlata, valamint fényképe az 1. ábrán, míg a ninhidrin derivatizálás reakciómenete a 2. ábrán látható. Az analizálandó mintát pipettával, manuálisan juttatták az oszlop tetejére, de ezt leszámítva a teljes művelet felügyelet nélkül, automata vezérléssel történt. A készüléknek köszönhetően a több napos analízis időt sikerült fehérjehidrolizátum esetében egy napra, míg egy összetettebb fiziológiai folyadékminta esetében körülbelül két napra csökkenteni [22, 23].

A fentebb röviden ismertetett munka 1972-ben kémiai Nobel-díjjal végződött, amelyet a ribonukleáz százhuszonnégy aminosav-szekvenciájának leírásáért



vehettek át. Mint Moore megjegyezte: „Némileg eltérő szemlélettel közelítettük meg a problémákat, majd gondolatainkat a közös célra összpontosítottuk” [24]. Noha a csoport munkáiról megjelent cikkek részletesen leírták a készülék felépítését, működését, a fehérjekutatással foglalkozó laboratóriumok közül esetleg néhány tudta volna megépíteni. Emiatt 1958 tavaszán a Spinco (Specialized Instruments Company) cég (még a két fő publikáció [23, 25] tényleges megjelenése előtt) megépítette az aminosav-analizátor első céges prototípusát, az ún. MS-modellt (Moore és Stein fejlesztőkről elnevezve). A készülékkel számos technikai és gyártási problémába ütköztek, így a Beckman Spinco Division céggel (1954-ben a Beckman Instruments megvásárolta a Spinco céget, és Beckman Spinco Division néven működtek tovább) felvették a kapcsolatot. Felhasználva a prototípus felépítésekor összegyűlt tapasztalatokat, egy új gyártási tervvel megépítettek egy következő készüléket. Ezen készülék tesztelése Dr. Spackman segítségével, 1962-től a Washingtoni Egyetemen folytatódott és az analizátor végül „120 Amino Acid Analyzer” néven került gyártásra és kereskedelmi forgalomba (3. ábra).



**3. ábra. Az első Beckman aminosav analizátorok. A)** A Beckman 120 Amino Acid Analyzer (prototípus), illetve a továbbfejlesztett változatai **B)** a 120B, valamint a **C)** 120C modellek (forrás: <https://digital.sciencehistory.org/works/k0698763j>).

A következő években mind a technikát, mind pedig az ioncserélő gyantákat tovább fejlesztették. Ennek köszönhetően lehetővé vált egyetlen oszlop használata és az elemzési idő jelentős csökkentése [26]. Ez a gyakorlatban azt jelentette, hogy egy komplex fiziológiai mintát tizenegy óra alatt elemzett a készülék, az 1958-ban eredetileg szükséges két nap helyett. Egy fehérje-hidrolizátum analízisének ideje pedig kevesebb, mint négy órára csökkent. A következő években a Spinco cég bevezette az aminosav-analizátor további

modelljeit is (120B készüléket 1963-ban és a 120C készüléket pedig 1966-ban). Hamarosan más gyártók is elkezdtek az automata aminosavanalizátorok gyártását. Kiemelkedő jelentőségű ezen műszergyártó cégek között a Hitachi (Japán) cég, amelynek aminosav-analizátora elsősorban Hiroyuki Hatano (1924–1998), a japán Kiotói Egyetem professzorának fejlesztő kutatásain alapult [27].

Az aminosav analizátorok fejlődését és jelentőségét a kutatásban kiválóan szemlélteti, hogy napjainkban az aminosavanalizátorok havonta akár ezer mintát is képesek elemezni. A minta összetettségétől függően minden egyes futtatás tíz perc és körülbelül két-három óra közötti elemzési időt igényel. Mindezeket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy az 1950-es években végzett úttörő munkájukkal Moore és Stein egy teljesen új teret nyitottak meg a biokémikusok számára, amely méltán tekinthető mérföldkőnek a kromatográfia évszázados fejlődésében.

### **Peptidkémiai kutatások az ELTE TTK Szerves Kémiai Tanszékén, illetve a Peptidkémiai Kutatócsoportban**

Ezek a tudományos világban zajló fejlődések és új generációs készülékek viszonylag hamar és jó ütemben épültek be hazánkban az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karához tartozó Szerves Kémiai Tanszék, illetve a Peptidkémiai Kutatócsoport munkájába. Ahogy a fentiekben láthattuk, a 20. században különösen a biológiai vonatkozású szénvegyületek, fehérjék, peptidek vonatkozásában előtérbe kerültek a mennyiségi és kis anyagmennyiséget igénylő mikroanalitikai módszerek. Szerves vegyületekre ezen módszerek tökéletesítése többek között a szintén Nobel-díjas (1923) Fritz Pregl (1869-1930) nevéhez fűződik (4. ábra). A mikroanalitika és ezen belül a peptidek és fehérjék aminosavanalízise azon kevés magyarországi példák közé tartozik, amely módszerek meghonosításában és művelésében követtük a nemzetközi tudományos világot és a legmodernebb műszeres technikák bevezetése sem váratott magára. Ennek fő történeti oka az, hogy Bruckner Győző (1900-1980) meghívásával a Szerves Kémiai Tanszék vezetése (1949) egy olyan kutatóhoz került, aki Pregl grazi laboratóriumában dolgozott és lehetősége volt arra, hogy ezen forradalmi eljárásokat elsajátítsa, valamint jelentőségük voltát felmérve meghonosítsa ezen módszereket és sarkalja ezek továbbfejlesztését. A mikroanalitikai módszerek elsajátítására és a laboratórium létrehozására Medzihradszky-Schweiger Hedvig kapott megbízást (1950), aki innentől kezdve több mint öt évtizeden át vezette és fejlesztette azt, és azt követően is részt vett

a Mikroanalitikai Laboratórium munkájában. A Mikroanalitikai Laboratórium munkájának része volt a szén-, hidrogén-, nitrogén-, halogén-, kén-, alkoxi-, foszfor-, hidrazid-, stb. meghatározásokon kívül az aminosavanalízis is.



**4. ábra. A mikroanalitikai módszerek meghonosítói. A) Friedrich Emich és B) Fritz Feigl osztrák analitikusok, C) Fritz Pregl, a mikroanalízis „atyja” és összefoglaló műve, amely azóta is több kiadásban, angol fordításban is megjelent [28, 29].**

A peptideket, peptidszármazékokat és a fehérjeket érintő aminosavanalitikai módszerek fejlődése azzal a ténnyel is összefügg, hogy a Szerves Kémiai Tanszék munkássága és története, fejlődése szorosan összefonódik a Peptid-kémiai Kutatócsoporttal, amely 1961-ben szintén Bruckner Győző irányításával jött létre [30]. A csoport tevékenysége a kezdetektől kapcsolódott a Szerves Kémiai Tanszéken folyó peptid- és fehérjekémiai kutatásokhoz. Bruckner akadémikus nyugalmába vonulását követően (1972) – az akkori felfogással összhangban – a vezetői teendőket a tanszék vezetője, Kucsman Árpád Széchenyi-díjas egyetemi tanár vette át. Majd 1989-től a kutatócsoport vezetője Medzihradszky Kálmán akadémikus, Állami Díjas egyetemi tanár, a peptid-hormonok nemzetközileg elismert kutatója, az Európai Peptid Társaság alapító tagja (1990) lett. Az MTA 1999-től, nyílt pályázat alapján, határozott időre – a befogadó egyetemek véleményét figyelembe véve – választotta ki a kutatócsoportok vezetőit. Így lett a kutatócsoport vezetője Hudecz Ferenc egyetemi tanár. A csoport munkáját 2017. július 1-től Mező Gábor, az MTA doktora, a csoport korábbi munkatársa irányítja [31].

A rutinmeghatározásokon kívül a laboratórium tudományos vizsgálatokat és módszerfejlesztéseket végzett. A laboratórium munkájában részt vett munkatársként Kajtárné Miklós Judit (1957-72), Kutassiné Kovács Sára (1953-1989, kezdetben technikusként, majd munkatársként), technikusként Dercsényi Miklósné (Marietta, 1961-1996), Lovász Lászlóné (Anni, 1964-2002). A labora-

tórium munkájába 1997-ben kapcsolódott be Bősze Szilvia (aki 2001-től a laboratórium vezetője lett) és asszisztensként Kiskó Mária. A laboratórium munkatársa 2015-től pedig jelen írás másik szerzője Szabó Ildikó is.

### **A Mikroanalitikai Laboratóriumban működő aminosavanalizátorok története, a készülékek összehasonlítása**

A laboratóriumban az első analizátor az angol gyártmányú EVANS készülék volt, beszerzése az 1964-65 években zajlott. A kollégák nagyon szerettek volna egy Beckman analizátort, de arra nem volt elég a rendelkezésre álló keret, így esett a választás erre a készülékre. Az EVANS készülékben az elválasztás két oszlopon történt, a hosszú oszlopon (kb. másfél méter) a savas, semleges aminosavak, a rövid oszlopon a három bázikus aminosav (lizin, hisztidin, arginin és az ammónia). Az igényelt minta aminosavanként 1 mikromól mennyiség volt elméletileg, ennek azonban a tizede is értékelhető kromatográfiás csúcsot adott. A hosszú oszlop két különböző pH-jú (3,25 és 4,25) citrát pufferrel működött, a rövid oszlopon az elválasztás pedig 6,0 pH-jú pufferrel történt. A teljes elválasztáshoz szükséges mérési idő 24 óra volt, az elválasztás szoba-hőmérsékleten és atmoszférikus nyomáson történt. A kiértékelés manuálisan (pontok számolása fél magasságban szorozva a csúcs magasságával) zajlott. Az aminosavak elválasztása a készülékkel tökéletes volt [32].

Az országban Dévényi Tibor (egy évfolyammal járt az egyetemen Schweiger Hedvig felett) foglalkozott azokban az években intenzíven aminosavanalízissel - inkább elméleti szempontból -, de a gyakorlati részhez is kiválóan értett. A Szerves Kémia Tanszéken is gyakran megfordult, jó barátságban voltak és sokat segített az aminosavanalizátor használatában, illetve a módszerek fejlesztésében is számíthattak közreműködésére. A laboratórium következő analizátorát Dévényi Tibor adta át használatra, ami egy JEOL gyártmányú készülék volt. A készüléken már egy oszlopos elválasztás zajlott, magasabb hőmérséklet és nyomás értékeken az elválasztás gyorsítására. A készülékben már némi automatizálást is alkalmaztak, lyukkártya segítségével lehetett programozni néhány paramétert.

Közben megjelent a nemzetközi piacon a Beckman cégnek egy újabb modellje, a Beckman Unichrom rendszer. Ennek a készüléknek megfelelő hazai fejlesztés a Chinoin gyár aminosavanalizátora, a Chinoin Aminochrom. Egy ilyen készüléket is sikerült beszerezni a Mikroanalitikai Laboratórium számára, egy időben a JEOL készülékkel együtt működött. Az elválasztás szintén egy oszlop

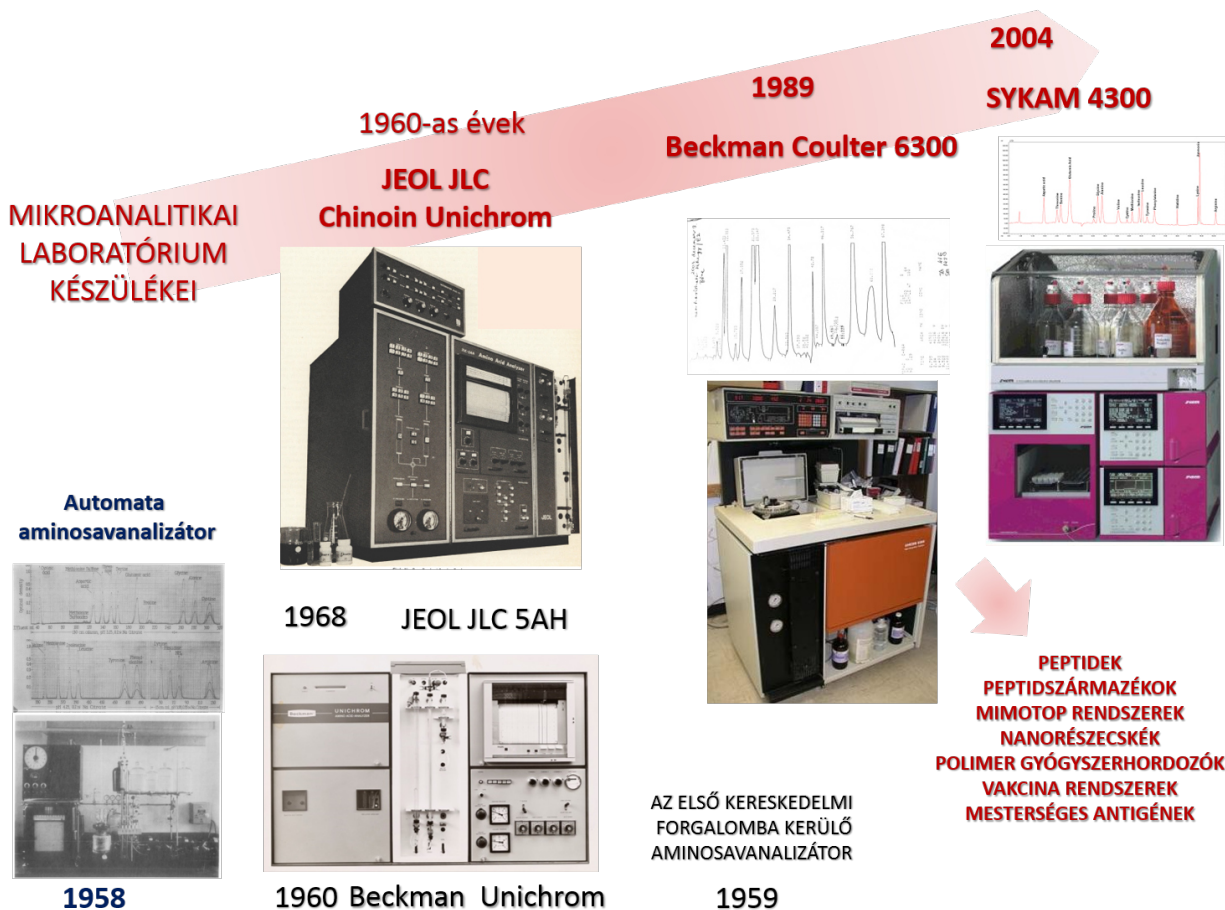
alkalmazásával történt, magasabb hőmérsékleten, magasabb nyomáson, így az analízishez szükséges idő is szignifikánsan lerövidült. A kiértékelés még mindig kézi számolással történt. Mindkét analizátornál az elválasztáshoz szükséges anyagmennyiség is jelentősen csökkent. Az EVANS, a JEOL, valamint az AminoChrom analizátor valamivel több mint húsz esztendőn keresztül biztosították a Tanszék és a Peptidkémiai Kutatócsoport aminosavanalízis szükségletét (5. ábra).

Nagy előrelépést jelentett az 1989-ben beszerezett Beckman gyártmányú analizátor. Az új Lágymányosi ELTE Campus építkezésénél lehetőség nyílt a Beckman 6300 készülék beszerzésére. A készülék segítségével tovább csökkent az elválasztáshoz szükséges idő és minta mennyiség, mikroprocesszor segítségével biztosította a mérések automatizálását, a minták eredményeinek kiértékelését.

Miután ez a Beckman analizátor kiöregedett, 2004-ben sikerült beszerezni a Sykam cég által gyártott készüléket. A Sykam 4300 analizátor az elemzéshez szükséges anyagmennyiséget aminosavanként 1 nmól-ra csökkentette, de ennek a mennyiségnek a tizede is jól értékelhető eredményeket szolgáltat. Az analízishez szükséges idő mindössze 60 perc és mind az analízis menete, mind az eredmények kiértékelése szoftver vezérléssel történik. Az analízishez szükséges idő csökkentését az elválasztás hőfokának, a nyomásnak, valamint a hasonlóan fontos szférikus oszloptöltetnek a megfelelő kombinációja teszi lehetővé. Ennek a három paraméternek a megfelelő egyeztetése minden cég üzleti titka, nagyon komoly kutatás előzi meg a sikert. Az elválasztáshoz használt pufferek pH értéke nagyon fontos, a régebbi készülékek a szakaszos váltást alkalmazták, a Sykam 4300 és (a régebbi Beckman készülék esetében is) már gradiens elució biztosította a tökéletes eredményt (5. ábra).

A Mikroanalitikai Laboratórium életében 2021-től egy új korszak kezdődhet az ELTE Tématerületi Kiválósági Program (Szint+) keretében az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásával. Ezen program részeként lehetőség volt olyan intézményen belüli pályázat összeállítására (ELKH Fehérjemodellező, valamint a Peptidkémiai Kutatócsoportokhoz kapcsolódóan Farkas Viktor, Stráner Pál, Szabó Ildikó és Bősze Szilvia), amely kerethez kapcsolódóan műszerbeszerzés részben vagy egészében támogatható. A Szint+ Kiválósági Programhoz kötődően és annak köszönhetően 2020. év novemberében kiírásra került egy közbeszerzési pályázat, amely a biológiailag aktív vegyületek,

peptidek, fehérjék, valamint származékaik és a segítségükkel fejlesztett különböző konstrukciók kémiai és szerkezeti jellemzését szolgáló műszer-együttes beszerzését teszi lehetővé.



**5. ábra.** Az aminosav analízis automatizálása és a legfontosabb kezdeti mérföldkövek tükrében a Mikroanalitikai Laboratórium készülékeinek áttekintése az 1960-as évektől.

Ennek a csomagnak a része egy, a mai igényeknek minden tekintetben megfelelő aminosavanalizátor beszerzése is. Az alábbiakban a cikk zárásaként pedig azt foglaljuk össze, hogy milyen területen és milyen vegyületek, konstrukciók és felhasználók szempontjából fontos a beszerzendő készülék:

1. Az alkotó aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása peptidek, fehérjék, szintetikus polipeptidek, elágazó láncú polipeptidek, nanogyógyszerhordozók és ezek származékai esetében.
2. Az aminosav összetétel alapján a minta fehérje-, illetve peptid tartalma bemérésre vonatkoztatva meghatározható (a tényleges peptidtartalom, illetve

fehérje tartalom liofilizált és egyéb technikával izolált, az 1. pontban megadott) analizálandó minták esetében.

3. Megfelelő standard alkalmazásával nem fehérje eredetű aminosavak, egyes származékképzők is meghatározhatók (N-karboximetil-cisztein, citrullin, biotin, cukoraminosav stb. tartalom). A hidrolízist követően (savas, enzimes – a mintának megfelelően), gyors információt kapunk az előállítás, izolálás hatékonyságával, a termék homogenitásával kapcsolatban. Elágazó láncú polimerek esetében, mely vegyületek ígéretes hordozó rendszerek, mind hatóanyag célbajuttatási, mind pedig diagnosztikus és vakcinafejlesztési projektekben szintén egyedülálló és nem helyettesíthető lehetőség a készülék alkalmazása az összetétel meghatározására.

4. A peptidkonjugátumok, nanorészecskék (kolloidális hordozó rendszerekben fehérje vagy peptid hatóanyagok), liposzómák fehérje- és peptid tartalma (módosítások szubsztitúció foka) is nagy pontossággal meghatározható. A peptid típusú hatóanyagokat és/vagy hordozót tartalmazó nanorészecskék, liposzómák esetében a peptid komponens mennyiségi meghatározására a módszer nem helyettesíthető.

5. Neutralizáló ellenanyagok esetében a fehérjetartalom meghatározása, az alkotó aminosavak minőségi meghatározása, valamint fehérjék poszttranszlációs módosításainak (pl. foszforiláció) igazolása lehetséges a készülék segítségével, kutatási projektek, valamint céges tevékenységek számára.

6. A készüléket használhatjuk az oktatásban (BSc, MSc, PhD hallgatók; a módszer és alkalmazhatósága - elméleti és gyakorlati képzés -, az előállított vegyületeik analízise).

### **Köszönetnyilvánítás**

A szerzők köszönettel tartoznak Dr. Medzihradzky-Schweiger Hedvignek a Mikroanalitikai Laboratórium vezetőjének (1950-2000) a közös munkáért, mindazokért az átadott tapasztalatokért, valamint adatokért, amelyek nélkül jelen írás nem jöhetett volna létre. Köszönet illeti Őt azért, hogy a Mikroanalitikai Laboratórium 1950 óta folyamatosan, töretlen lelkesedéssel és minőségi szakmai munkát szolgáltatva és azt szolgálva működhet.

**Irodalomjegyzék**

- [1] Helferlich, B. (1961) In: Great Chemists (Farber, E., Ed.), (Interscience, New York) pp. 981-995.
- [2] Greenstein, J.P., Winitz, M. (1961), Chemistry of the Amino Acids, Vol. 2, (Wiley, New York) pp. 1299-1365.
- [3] Martin, A.J.P., Synge, R. L.M. (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J*, **35**: 1358-1368.
- [4] Consden, R., Gordon, A. H., Martin, A.J. (1944) Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem J*, **38**: 224-232.
- [5] Synge, R.L.M. (1944) Analysis of a partial hydrolysate of gramicidin by partition chromatography with starch. *Biochem J*, **38**: 285-294.
- [6] Synge, R.L.M. (1945) 'Gramicidin S': over-all chemical characteristics and amino-acid composition. *Biochem J*, **39**: 363-367.
- [7] Synge, R.L.M. (1964) Nobel Lectures Including Presentation Speeches and Laureates' Biographies — Chemistry 1942–1962, (Elsevier, Amsterdam), pp. 374-387.
- [8] Elsdon, S.R. (1946) The Application of the Silica Gel Partition Chromatogram to the Estimation of Volatile Fatty Acids. *Biochem J*, **40(2)**: 252-256.
- [9] Sanger, F. (1964) Nobel Lectures Including Presentation Speeches and Laureates' Biographies — Chemistry 1942–1962 (Elsevier, Amsterdam) pp. 544-556.
- [10] Bergmann, M., Stein, W.H. (1939) A new principle for the determination of amino acids, and its application to collagen and gelatin. *J Biol Chem*, **128**: 217-232.
- [11] Moore, S., Stein, W.H., Bergmann, M. (1942) Protein Constituent Analysis by the Solubility Method. *Chem Rev*, **30**: 423-432.
- [12] Moore, S., Stein, W.H. (1943) Determination of amino acids by the solubility product method. *J Biol Chem*, **150**: 113-130.
- [13] Taylor, T.I., Urey, H.C. (1938) Fractionation of the Lithium and Potassium Isotopes by Chemical Exchange with Zeolites. *J Chem Phys*, **6**: 429-438.
- [14] Samuelson, O. (1930) *Svensk Kem Tidskr*, **51**: 195-206.
- [15] Samuelson, O. (1939) Über die Verwendung von basenäustauschenden Stoffen in der analytischen Chemie I. *Zeitschrift für analytische Chemie*, **116**: 328-334.



- [16] Johnson, W.C., Quill, L.L., Daniels, F. (1947) Record-Breaking Program Scheduled for Fall ACS Meeting. *Chem Eng News*, **25**: 2494
- [17] Partridge, S.M. (1949) Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins; fractionation of a protein hydrolysate. *Biochem J*, **44**: 521-527.
- [18] Moore, S., Stein, W.H. (1951) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J Biol Chem*, **192**: 663-681.
- [19] Hirs, C.H.W. (1986) In: The Beckman Symposium on Biomedical Instrumentation (Moberg, C.L., Ed), (Rockefeller University New York.), pp: 67-73.
- [20] Spackman, D.H. (1967) Accelerated methods. In: Methods in Enzymology (Academic Press), pp: 3-15.
- [21] Hamilton, P.B. (1958) Ion Exchange Chromatography of Amino Acids: Effect of Resin Particle Size on Column Performance. *Anal Chem*, **30**: 914-919.
- [22] Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc*, **17**: 1107-1115.
- [23] Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H. (1958) Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Anal Chem*, **30**: 1185-1190.
- [24] Moore, S. (1986) In: Biographical Memoirs (National Academy of Sciences U.S., Washington D.C.), pp: 415-439.
- [25] Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958) Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal Chem*, **30**: 1190-1206.
- [26] Hamilton, P.B. (1963) Ion Exchange Chromatography of Amino Acids. A Single Column, High Resolving, Fully Automatic Procedure. *Anal Chem*, **35**: 2055-2064.
- [27] Hatano, H. (1985) Historical Introduction and gel packing materials for HPLC separation of proteins and nucleic acids. *J Chromatography Library*, **32**: 165-178.
- [28] D.G. (1937) Quantitative Organic Microanalysis. *Nature*, **139**: 453.
- [29] Kainz G. (1958) FRIEDRICH EMICH, FRITZ PREGEL, FRITZ FEIGL-Three Austrians as Pioneers in Microanalytical Research. *J Chem Educ*, **32**: 608-611.
- [30] Kucsman, Á. (2004) Hetvenéves az ELTE Szerves Kémiai Tanszéke, (ISBN 963 463 661 6, Eötvös Kiadó és PolgArt Kiadó).

- [31] "Almanach" MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport közleményei 1961-2018 (2019) (ISBN 978-963-508-908-6, Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt.)
- [32] Medzihradzky, K., Bajusz, S. (1968) Biológiaiilag aktív ACTH fragmensek szintézise. In: Kémiai Közlemények – MTA Kémiai Tudományok Osztályának közleményei, pp: 369-386.



**Szabó Ildikó** az ELTE-n végzett 2005-ben okleveles vegyészként. Doktori munkáját Mező Gábor témavezetésével az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végezte, melynek azóta is tagja. Tumorelleses hatású vegyületek célzott sejtbejuttatására alkalmas hordozórendszerek tervezésével, szintézisével, analitikai jellemzésével és funkcionális vizsgálatáva foglalkozik. 2015-től tudományos munkatársként részt vesz a Mikroanalitikai Laboratóriumban folyó munkákban.



**Bősze Szilvia** tanulmányait az ELTE-n 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 Mikroanalitikai Laboratóriumának, 2012-től pedig a Sejtenyésztő és Immunkémiai Laboratóriumának vezetője. Antibakteriális és antitumor hatású vegyületek szerkezet – hatás összefüggéseinek vizsgálatával és a vegyületek szelektív célbajuttatására alkalmas hordozórendszerek tervezésével, kémiai és funkcionális jellemzésével (*in vitro* és *in vivo* rendszerek) foglalkozik. Részt vesz mikronalitikai és peptidanalitikai módszerek kidolgozásában és fejlesztésében.

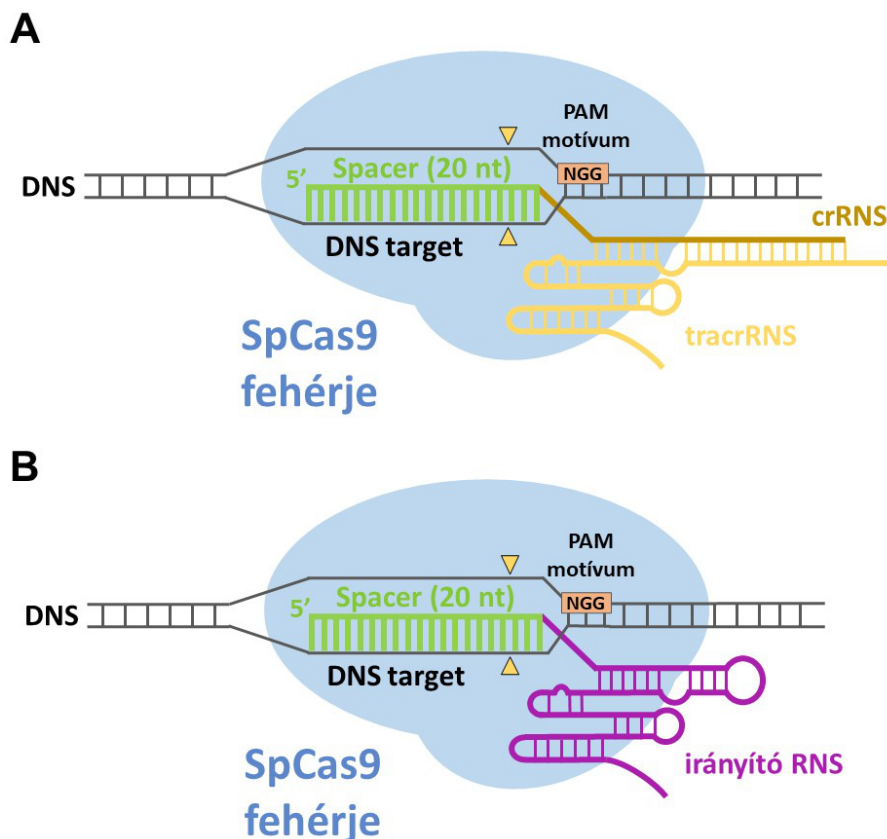
## A NOBEL-DÍJAT ÉRŐ GENETIKAI OLLÓ

**Kulcsár Péter István, Tálas András, Huszár Krisztina, Varga Éva,  
Krausz Sarah Laura, Tóth Eszter, Welker Ervin  
Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest  
Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet, Szeged**

Az 1950-es évektől kezdődően a DNS szerkezetének megismerésével, majd ennek az átírására kidolgozott módszerekkel olyan tudományos fejlődés indult el, mely napjainkban is óriási ütemben folyik. Az egyik, ha nem a legjelentősebb mérföldkövet a CRISPR/Cas rendszer felfedezése és hatékony genommodosító eszközként való használata jelentette, mely robbanásszerű fejlődést hozott a molekuláris biológia és a kapcsolódó tudományterületeken. Fontosságát mi sem bizonyítja jobban, minthogy a 2020-as kémiai Nobel-díjat Emmanuelle Marie Charpentier és Jennifer Anne Doudna kapta a genomszerkesztés módszerének kidolgozásáért. A felfedezéstől a Nobel-díj odaítéléséig az átlagosnál lényegesen kevesebb idő telt el (Doudna és Charpentier 2012-ben, tehát 8 éve publikálták korszakalkotó cikküket [1], ezzel szemben a kémiai Nobel-díj odaítélésének átlaga az eredményt követően ~20 év). Külön érdekesség az is, hogy még sosem fordult elő, hogy a megosztott kémiai Nobel-díjat két nő kapta volna.

De mit is takar tulajdonképpen a CRISPR rövidítés és hogy jutottunk ide? A CRISPR-asszociált endonukleázok (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) vagy röviden Cas nukleázok olyan RNS-vezérelt fehérjék, amelyek egy kiválasztott DNS- [2-4] vagy RNS-szekvencia [5] célzott hasítására képesek. Archaeákban és baktériumokban adaptív immunitást biztosítanak a vírusok, plazmidok és transzpozonok ellen [6, 7]. A CRISPR/Cas rendszereket különböző osztályokba sorolják az alapján, hogy az effektor nukleáz önmagában felelős a célszekvencia megtalálásáért és hasításáért (II-es osztály), vagy ezt a két folyamatot külön fehérjék végzik (I-es osztály). A II-es osztályba tartoznak a leggyakrabban alkalmazott Cas9 (ezen belül is a *Streptococcus pyogenes* Cas9, rövidítése SpCas9 vagy SpyCas9) és Cas12a fehérjék is [8-10]. A Cas9 nukleázok ribonukleoprotein komplexe magából a Cas9 fehérjéből és két Cas9-asszociált RNS-ből áll [CRISPR RNS (crRNS) és a transzaktiváló crRNS (tracrRNS)]. A komplex DNS kötéséhez és a kettősszalú DNS törés létrehozásához két dolog szükséges: egyrészt komplementaritás a cél DNS szekvencia és a crRNS úgynevezett spacer szekvenciája között, másrészt szükség van egy rövid PAM motívum (protospacer-adjacent motif) előfordulására a célszekvencia (target) 3'-végénél (1.A ábra). Az így specifikusan

létrehozott kettősszalú DNS törésnél tudunk irányított genommódosítást végrehajtani a sejt saját hibajavító mechanizmusait felhasználva és manipulálva.



**1. ábra. A target DNS-hez kötött Cas9 nukleáz komplex sematikus ábrája.** A target DNS-hez (szürke) kötött *Streptococcus pyogenes* Cas9 (kék) A) crRNS-sel (CRISPR RNS, barna) és tracrRNS-sel (transzaktiváló crRNS, sárga) komplexben, vagy B) mesterségesen létrehozott irányító RNS-sel (lila) komplexben. Az irányító RNS spacer része minden esetben zölddel van jelölve. A DNS target felismeréshez szükséges NGG PAM motívum a target DNS-től 3' irányban található (protospacer-adjacent motif, narancssárga). A DNS target felismerését követően a hasítás feltehetően a sárga háromszögekkel jelölt pozíciókban történik. A spacer szekvencia tökéletes RNS-DNS hibridet hoz létre a target DNS-sel.

A CRISPR rendszer felfedezése előtt is léteztek módszerek, melyekkel specifikus helyen lehetett DNS kettősszalú törést létrehozni (cink-ujj nukleázok, TALE nukleázok). Mindkét módszer alapja, hogy az adott fehérje képes bizonyos DNS szakaszokat szekvencia specifikusan felismerni. Ezen módszerek óriási hátránya azonban, hogy minden egyes szekvenciára külön létre kell hozni a megfelelő felismerő specificitással rendelkező sokdoménos fehérjét, ezáltal jelentősen drágítva és bonyolítva ezen módszerek alkalmazását. Ezzel szemben a CRISPR/Cas rendszer alkalmazásánál elegendő a crRNS spacer részének megváltoztatása (a fehérje módosítása nélkül) ahhoz, hogy a nukleáz a kívánt új célszekvenciára irányítsuk. Ez jelentős előrelépést jelent a korábbi módsze-

rekhez képest. 2013-ban (nem sokkal Doudna és Charpentier cikkét követően) bizonyították, hogy a Cas9 fehérje emlős sejtekben is alkalmazható genom-módosításra [2-4] és megkezdődött Jennifer Doudna és Emmanuele Charpentier diadalútja a Nobel-díj felé.

A francia származású Emmanuelle Charpentier biokémiai, mikrobiológiai és genetikai tanulmányait a párizsi Pierre és Marie Curie Egyetemen végezte, a mai Sorbonne Egyetem Természettudományi Karán. PhD fokozatát a párizsi Pasteur Intézetben szerezte, ahol az antibiotikum rezisztencia kialakulásának molekuláris biológiai hátterét vizsgálta, majd a Rockefeller Egyetemen (New York, NY, USA) azzal foglalkozott, hogy a *Streptococcus pneumoniae* patogén hogyan használja mobilis genetikai elemeit genomja megváltoztatására és hogyan alakítja ki a vancomycin rezisztenciát. A kétezres évek elején, amikor a Bécsi Egyetem Mikrobiológiai és Genetikai Intézetének laborvezetője lett, akkor kezdett a *Streptococcus pyogenes* baktérium génregulációjának kutatásába, ami később elvezetett a baktérium CRISPR rendszerének vizsgálatához [11].

Az amerikai származású Jennifer Doudna PhD-jét a Harvardon szerezte Jack Szostak (2009, orvosi Nobeldíj a telomeráz felfedezéséért) genetikus vezetése alatt. Doktori munkája során a ribozim szerkezetének vizsgálatán és biológiai funkciójának megértésén dolgozott. Ezután a Coloradói Egyetemen Thomas Cech (1998, kémiai Nobel-díj az RNS katalitikus aktivitásának felfedezéséért) laborjában folytatta munkáját, ahol a ribozim kristályosításán és háromdimenziós szerkezetének meghatározásán dolgozott, majd a kaliforniai Berkeley Egyetemen folytatta kutatásait és sikereket ért el a virális RNS kutatás és az RNS interferencia területén. Jillian Banfield hatására kezdett érdeklődni a CRISPR/Cas rendszer iránt. A 2000-es évek elején különböző baktériumok genetikai anyagának összehasonlításakor konzervált, ismétlődő DNS szekvenciákat találtak, amelyek között egyedi, nem ismétlődő szakaszokat figyeltek meg. Akkor még senki nem tudta, hogyan működhet a rendszer, de a mechanizmus, amit a baktériumok a vírusok semlegesítésére használtak, a Doudna által kutatott RNS interferenciához hasonlónak tűnt. Ekkor azonosították a cas géneket is, amelyek nagyon hasonlítottak olyan fehérjéket kódoló génekre, amelyek a DNS széttekerésére és vágására specializálódtak. Doudna az I-es osztályba tartozó CRISPR/Cas rendszert kutatta, amelyben több, különböző Cas fehérje szükséges a vírusok elleni védekezéshez [12].

Eközben kezdett foglalkozni Emmanuelle Charpentier a svédországi Umea

Egyetemen a *Streptococcus pyogenes* CRISPR rendszerével, amely a II-es osztályba tartozik. Egyik kulcsfontosságú felfedezését 2011-ben közölte, amelyben leírta, hogy a tracrNS kulcsszerepet játszik a crNS érése során, ami a vírusok elleni szekvensspecifikus immunitás alapja [13]. Ezt követően Charpentier és Doudna kollaborációba kezdett. Munkájuk során rájöttek, hogy a tracrNS nemcsak a crNS éréséhez, de a Cas9 fehérje DNS hasításához is szükséges. Továbbá bizonyították, hogy az SpCas9 fehérje *in vitro* rendszerben DNS szekvenciákat képes hasítani, valamint a célzott szekvencia egyszerűen programozható a crNS spacer szekvenciájának megváltoztatásával, valamint létrehozták az úgynevezett irányító (guide) RNS-t a tracr- és crNS-ek összekombinálásával (1.B ábra). Ezen eredmények teremtették meg az alapját a CRISPR/Cas rendszer segítségével történő génszerkesztésnek [1]. Tevékenységük azóta is jelentős a tudományterületen, számos komoly, a témát érintő felfedezés kapcsolódik a nevükhöz és a tudományos közösség szervezésében is jelentős szerepet vállalnak. Különösen Doudna járult hozzá jelentősen a CRISPR/Cas rendszer működésének és a Cas9 fehérje szerkezetének megismeréséhez. Egy Jennifer Doudna által szervezett konferencián lehetőségünk volt találkozni vele személyesen is (2. ábra).



**2. ábra. Csoportkép a 2018-as CRISPR konferencián (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA).** Két szerzőtársunknak, Tólas Andrásnak (bal szélső) és Kulcsár Péternek (Doudna jobb oldalán) lehetősége volt személyesen is találkozni Jennifer Doudnaival (középen).

A Nobel-díj odaítélése után felmerül a kérdés, hogy volt-e még olyan kutató

vagy kutatócsoport, aki(k)nek a munkája elengedhetetlen volt a CRISPR rendszer megismeréséhez és a genetikai olló kifejlesztéséhez. Az sokak számára nem volt kérdés, hogy a génszerkesztés egyszer Nobel-díjat fog érni, az már kevésbé volt egyértelmű, hogy mikor és kinek fogják azt odaítélni. Természetesen nagyon sok kutató munkája volt hatással a tudományág fejlődésére, itt most csak azokat emeljük ki, akik rendkívüli mértékben járultak hozzá a terület fejlődéséhez.

A génszerkesztés megalapozásával kapcsolatban mindenképpen ki kell emelnünk Maria Jasin kutatásait. Jasin bizonyította be 25 évvel ezelőtt, hogy a DNS egy kijelölt helyen történő kettősszalú hasítása (egy restriktív endonukleáz segítségével) kihasználható célzott génbevitelre [14]. Ez teremtette meg az egyik pillért, amin a legtöbb genomszerkesztő technika nyugszik. A következő nagy felfedezés a 2000-es évek elején Dana Carroll laborjában született, amikor a már korábban említett cink-ujj nukleázokat alkalmazták először génedítálásra [15]. Ezen fehérjék már a restriktív endonukleázokkal szemben ugyan korlátozottan, de programozhatóak voltak egy kiválasztott génszekvencia megcélzására. A 2010-es évek elején egy még ígéretesebb technika, a TALE (Transcription Activator-Like Effector) nukleázok segítségével még pontosabbá és könnyebbé vált a DNS szekvenciák hasítása a genomban, melyet a Sangamo biotechnológiai cég használt először genomeditálásra [16], majd Keith Joung és munkatársai tettek egyszerűbben használhatóvá [17].

A CRISPR rendszer felfedezésével kapcsolatban is számos kutatócsoport munkáját érdemes kiemelni, amelyek végül a CRISPR/Cas rendszer génedítálásra való felhasználásához vezettek. Francisco Mojica kutatócsoportja az ezredfordulón felfedezte, hogy baktériumokban a CRISPR lókusz virális szekvenciákat tartalmaz [18], és ők, valamint Eugene Koonin kutatócsoportja vetette fel, hogy ez egy bakteriális immunrendszerként működhet [19]. Érdekes adalék, hogy szintén Mojica-nak köszönhetjük a CRISPR elnevezést, amely egy kollaborátorának a cikkében szerepel először, melynek ő nem is szerzője, csak javaslatot tett az egyszerűbb elnevezésre [20]. 2007-ben Rodolphe Barrangou és Philippe Horvath a Koonin csoport felvetését kísérletesen is bizonyították a Danisco joghurtgyár laboratóriumában [21]. Luciano Marraffini és Erik Sontheimer mutatták meg később, hogy a CRISPR rendszer virális DNS szekvenciákat céloz [22]. Majd ezt követte 2011-ben a korábban már említett publikáció, melyben Emanuelle Charpentier csoportja leírta a tracrNS-t [13]. A Nobel-díjat 2020-ban „egy génszerkesztési módszer kidolgozásáért” kapta Doudna és Charpen-

tier. Ugyan ez elég tág fogalom, de egyértelmű, hogy a díj odaítélésében nagy szerepe volt kettejük közös, első, meghatározó publikációjának [1].

A CRISPR történetének túlzás nélkül egyik legdrámaibb fordulata, hogy egy litván kutatócsoport Virginijus Šikšnys vezetésével ugyanerre a megállapításra jutott, azaz demonstrálta, hogy Cas9 nukleázok a crRNS-sel komplementer szekvenciákat hasítanak és a crRNS szekvenciájának változtatásával tetszőleges DNS szekvenciákra irányíthatók. Publikációjukat hónapokkal Doudna és Charpentier előtt küldték be a Cell folyóiratba, amely azt tudományos értékelésre (peer review-ra) alkalmatlannak minősítette. Második próbálkozásra – még mindig Doudna és Charpentier publikációja előtt 2012 májusában – a PNAS folyóiratba küldték el a cikket. Doudna és Charpentier publikációját a Science júniusban, gyorsított eljárásban a beküldést követően 12 nap alatt fogadta el, így az ő publikációjuk előbb jelenhetett meg, mint a litván csoporté augusztusban [23]. Sok kutató véleménye szerint amennyiben a Nobel-díj a célzott génedítálás egyszerű programozhatóságáért járt, Šikšnys-t is díjazni kellett volna.

Doudna, Charpentier és Šikšnys munkái után több kutatócsoport is meglátta a lehetőséget a CRISPR/Cas rendszerrel történő genomszerkesztésben. Doudna kutatócsoportja a fent említett publikációjuk után nem egészen fél évvel később megmutatta, hogy nemcsak *in vitro*, hanem emlős sejtekben is képesek a genom hasítására [3]. Ebben viszont két csoport is megelőzte őket egy hónappal: Feng Zhang [2], valamint George Church [4] kutatócsoportja egyszerre publikálták eredményeiket a Science folyóiratban. Az elsőbbség a CRISPR/Cas rendszer humán sejtekben való alkalmazásában őket illette meg, viszont a Nobel Bizottság őket sem honorálta. Zhang, Church és Doudna után pár héttel Jin Soo Kim csoportja is hasonló eredményeket mutatott be [24], valamint ezzel egy időben Keith Joung csoportja a zebrahal genomját módosította a CRISPR/Cas rendszer segítségével [25]. Zhang, Church, Doudna, Kim, Joung, valamint Liu csoportja az ezt követő években, élen járó publikációikban az emlős génszerkesztésre fókuszáltak és annak pontosságát, hatékonyságát, valamint egyszerűbb használatát tették lehetővé. David Liu fejlesztette ki 2015-ben a bázisszerkesztés (base editing) [26], valamint 2019-ben a prime editing technikákat [27], melyek a genom rendkívül pontos szerkesztését tették lehetővé annak kettősszalú hasítása nélkül. Ez utóbbi technikák is mind a CRISPR rendszeren alapulnak.



A géneditálásra vonatkozó szabadalmi „háború” 2013-ban robbant ki. Doudna és a Berkeley Egyetem eredeti, 2012-es publikációjukat követően szabadalmat nyújtottak be, míg valamivel később Feng Zhang és a Broad Institute is. A Broad Institute kifizette a szabadalmi hivatalnak a gyorsított eljárási díjat, így az ő szabadalmukat gyorsabban bírálták el, hiába később adták be, mint Doudna és a Berkeley. Így első körben az eukarióta géneditálásra vonatkozó szabadalom a Broad Institute-ot illette meg. A Berkeley erre egy úgynevezett interferencia eljárást kezdeményezett, amely arról szólt, hogy előbb beadott szabadalma átfedésben van az utóbbival. Ezt a szabadalmi hivatal egy hosszú eljárás végén elutasította, mondván a szabadalmak eléggé különböznek. 2018-ban a Berkeley bíróság elé vitte az ügyet, ami a szabadalmi hivatal eredeti döntését megerősítette, de még nem volt végleges. A legutóbbi döntés éppen a Nobel-díjak kiosztása előtt szeptemberben történt, amikor a szabadalmakat tárgyaló fellebbviteli tanács kijelentette, hogy a Broad Institute elsőbbséget élvez az eukarióta géneditálásban, habár a Berkeley-nek (Doudna) és a Bécsi Egyetemnek (Charpentier) ítélte a rendszer egyik komponensére vonatkozó szabadalmat. Ez a döntés sem végleges még, habár a szakértők szerint a Broad Institute helyzete szilárdabb, mint a Berkeley-é és nehéz elképzelni, hogy később másként döntsének. A szabadalmi vita nagyon is érthető, hiszen a CRISPR rendszer gyógymódként való használata már a horizonton van, és az ebből származó óriási bevétel is sejthető. Számos már tőzsdén is jegyzett biotechnológiai vállalat (pl. Editas Therapeutics, Intellia Therapeutics, CRISPR Therapeutics, Beam Therapeutics) azt ígéri, hogy a jövőben ma még gyógyíthatatlan betegségekre fejlesztenek új terápiát a CRISPR/Cas rendszer segítségével.

Ezeknek a génterápiás eljárásoknak az alkalmazási lehetőségei még sok esetben erősen korlátozottak, elsősorban a megfelelő Cas9 beviteli módszer hiánya, a nem 100%-os specificitás és a sok esetben alacsony editálási hatékonyság miatt. Így érthető módon az első fejlesztés alatt álló CRISPR terápiákkal olyan szomatikus sejteket céloznak meg, amelyek könnyebben hozzáférhetőek. Ilyen módon talán hamarosan gyógyíthatóvá válik például a sarlósejtes vérszegénység, a béta-thalassémia (ami súlyos vérzékenységet is okozhat), a számos szervet érintő transthyretin amyloidosis (ATTR), a komoly látási problémákat okozó Leber Congenital Amaurosis 10 (LCA10), illetve CRISPR géneditálás segítségével fejlesztenék tovább a daganatos sejtek CAR-T terápiáját is.

Szomatikus sejtekben a betegséget okozó génváltozatok terápiás célú

megváltoztatása csak az adott személy életére van hatással, így bár sok tekintetben eltérhetnek az eddig alkalmazott terápiás módszerektől, alkalmazásuk nem vet fel újfajta etikai és biztonsági problémákat. A CRISPR-alapú módszerek biztonságosságának növelése és annak pontos megismerése megváltoztathatja a kockázatok és előnyök egyensúlyát, így a nem túl távoli jövőben lehetségessé válhat az életminőséget enyhébben befolyásoló betegségek CRISPR terápiákkal történő gyógyítása is. Ezzel párhuzamosan nem elképzelhetetlen, hogy a géndítálást akár esztétikai célból, például a szem színének megváltoztatására is használják majd. A CRISPR-alapú terápiák elterjedése - jelentős anyagi vonzataik miatt - várhatóan a meglévő társadalmi különbségek növekedésének irányába fog hatni, ami erősítheti a módszer használatával szemben megfogalmazható etikai aggályokat.

A szomatikus sejtek génterápiás módosításával szemben az emberi csíravonal genetikai állományának módosítását célzó CRISPR terápiák alkalmazása generációról generációra öröklődő változásokat hoz létre, amely további komoly etikai problémákat vet fel. Például, generációs szinten maradandó módosításokkal hosszabb távon nem veszélyeztetjük-e a genetikai sokféleség jelentős csökkentése miatt akár az egész emberi faj fennmaradását? Belenyúlhatunk-e az utódaink genomjába az ő hozzájárulásuk nélkül? Egészen végletes, falanszterszerű elképzeléseket látva, ezekben a születendő gyermek emberi méltóságának elvesztését látjuk kockán forogni az egyének tulajdonságainak és személyiségjegyeinek bizonyos szempontú tökéletesítésével. Bár technikailag kivitelezhető az öröklődő génmódosítás alkalmazása emberben, az erre irányuló kísérletezés, az etikai problémák és a rendszer még nem bizonyítottan biztonságos alkalmazhatósága miatt a világ legtöbb országában tiltott vagy erősen korlátozott eljárás (<https://www.coe.int/en/web/bioethics/oviedo-convention>). A megvalósíthatóság és az alapvető emberi kíváncsiság alapján valamennyire mégis várható volt, ugyanakkor sokkolta a világot, amikor 2018-ban bejelentették az első génmódosított csecsemők, egy ikerpár megszületését Kínában [28]. Az eset hatalmas visszhangot váltott ki a tudományos közösségből, megkérdőjelezve a procedúra biztonságosságát, a módosítás szükségességét, időszerűségét és az egész eljárás orvosi és kutatói etikusságát. Azóta számos kutató és szervezet kampányol egy globális egyezmény kialakításáért, amely ugyan nem tiltaná meg véglegesen a csíravonal klinikai módosítást, azonban pontosabban szabályozná azokat a feltételeket, amelyek között ez majd megvalósítható lesz [29].

Természetesen az állatvilágot és növényvilágot érintő génmódosítás esetén is felmerülnek etikai kérdések. Az egyik ilyen fő etikai probléma az ún. *gene drive* rendszerhez kapcsolódik. A módszer során az adott élőlény csíravonalát úgy módosítják, hogy a módosítást több mint 50%-os eséllyel adja tovább az utódainak, így a kívánt változtatás idővel elterjed a populációban, fajban. A malária ezen módszert alkalmazva felszámolható lenne a gazda szúnyog fajok kiirtásával, egy olyan gén elterjesztésével, amely a nőstény szúnyogok sterilitását okozza. Megszüntethető lenne a Lyme-kór olyan mutáns egér fajjal, amely nem képes továbbadni a kórokozót kullancsoknak. Az első esetben állatfajok kiirtásával csökkentjük a biodiverzitást, de mindkét módszernek lehetnek ellenőrizhetetlen, előre nem látott hatásai az egész ökoszisztémára. Bár az ember akaratlan és akaratlagos tevékenységeivel már számos növény és állatfaj kipusztulásához vagy kipusztulás közeli állapotba kerüléséhez hozzájárult, a CRISPR *gene drive* rendszerek növekvő hatékonyságát látva ismét felvetődik a kérdés, hogy belenyúlhatunk-e visszafordíthatatlan és drasztikus módon az ökoszisztémába úgy, hogy nem láthatjuk előre az összes lehetséges következményt.

### **Kutatócsoportunk fontosabb eredményei**

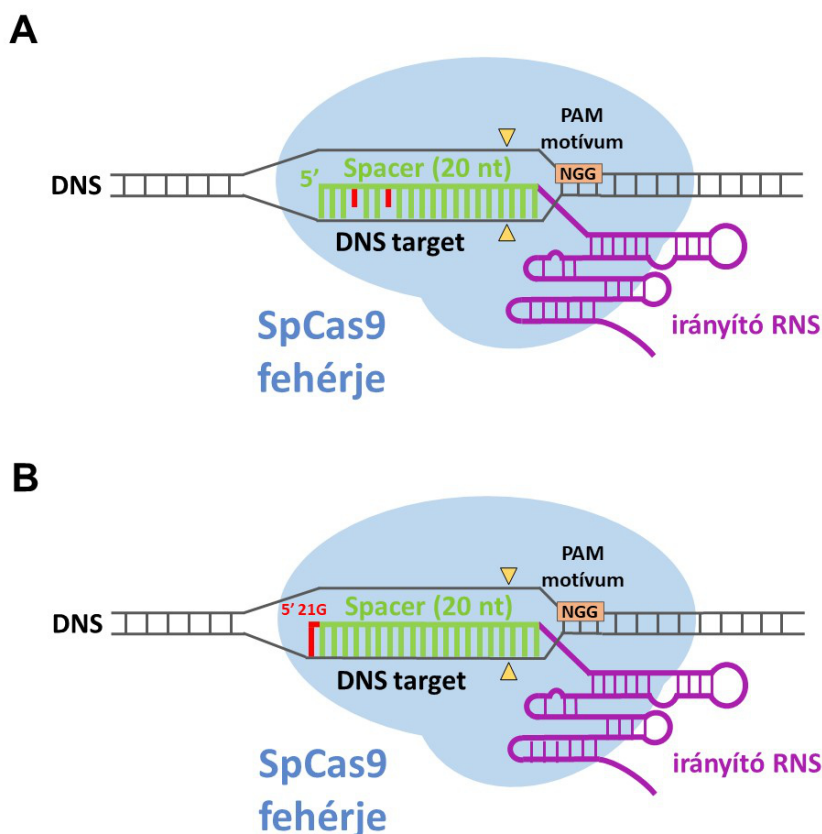
A genomszerkesztésért járó Nobel-díj különösen érdekes kutatócsoportunk számára, ugyanis az elmúlt néhány évben elsősorban a Cas nukleázok hasítási mechanizmusának megértésén és a hatékonyabb, biztonságosabb alkalmazhatóságuk fejlesztésén dolgoztunk.

A CRISPR/Cas9 rendszer nagyon sok szempontból meghaladja a korábbi rendszereket és lényegesen hatékonyabb genomszerkesztést tesz lehetővé, de számos alkalmazásban korlátot jelent változó hasítási hatékonysága és változó, néha alacsony specificitása. Kutatócsoportunk egyrészt a legelterjedtebben használt SpCas9 nukleáz DNS hasítási specificitásának növelésén, azaz az off-target hatásának csökkentésén dolgozik. Off-target hasításnak nevezzük, amikor a nukleáz egy, a célszekvenciával (on-target) csak részleges szekvenciális egyezést mutató szekvenciát is képes elhasítani (3.A ábra). Az off-target szekvenciák száma és az off-target hasítás mértéke targetenként változó, akár 5-6 bázis eltéréssel is rendelkezhetnek az on-targethez képest és egyelőre nehéz őket *in silico* prediktálni. Ez problémát jelent számos kutatási és terápiás felhasználás során, és korlátozhatja a nukleáz terápiás célokra való széleskörű felhasználását is. A specificitás növelésére számos különböző módszert fejlesztettek már ki. Ezek közül az egyik legígéretesebb megközelítés, az úgynevezett

megnövelt pontosságú variánsok létrehozása. Az egyik közelítésben ilyen variánsokat állították elő azoknak az aminosavaknak a mutációjával, amelyek az SpCas9 komplexben kölcsönhatnak a különböző nukleinsavakkal. A Joung csoport a target DNS szállal (SpCas9-HF1) [30] való kölcsönhatást változtatta, a Zhang csoport a nem targetált DNS szállal (eSpCas9) [31], míg a mi csoportunk az irányító RNS 5' végével (Blackjack SpCas9)[32] kölcsönható aminosavakat módosította. Hasonló módon, de eltérő logikát követve Doudna kutatócsoportja a nukleáz domén-domén kölcsönhatásaiban résztvevő aminosavakat változtatta meg (HypaCas9) [33]. A másik megközelítésben szelekciós rendszert használtak a megnövelt pontosságú SpCas9-ek kifejlesztésére: az evoSpCas9 élesztőben [34], a Sniper [35] és HiFi [36] SpCas9-ek pedig *Escherichia coli* baktériumban evolválódtak. Az ezekben a variánsokban található mutációk további kombinálásával számos más megnövelt pontosságú variánst hoztak létre [32, 33, 37]. Eredményeink szerint ezek az SpCas9 variánsok rangsorba állíthatók növekvő pontosságuk, illetve ezzel fordítottan arányosan csökkenő átlagos vágási hatékonyságuk szerint [32, 33, 37]. Ez különösen fontos, mert azt találtuk, hogy a célszekvenciák is rangsorolhatók, aszerint, hogy a pontossági sorrend melyik variánsa képes még hasítani őket. Tehát minden targethez meg kell keresni azt a legnagyobb pontosságú variánst, amely még képes hatékonyan vágni a célszekvenciát, amennyiben az off-target mentes editálás fontos. Úgy gondoljuk, hogy ez egy nagyon lényeges paradigma-váltás lesz, mert korábban minden csoport azt a variánst kereste, amely minden targetet hatékonyan és off-target mentesen tud vágni. Azonban sajnos a targetek hasíthatósági különbségei miatt nem lehetséges ilyen optimális, „szuper” SpCas9 fehérje létrehozása. Ezért előállítottunk egy növekvő pontosságú nukleáz variánsokból álló sort, mely segítségével könnyebb megtalálni az optimális nukleáz variánst mindegyik targethez.

A legtöbb megnövelt pontosságú SpCas9 variáns esetén az egyik komoly akadály a fehérjék lényegesen csökkent hasítási hatékonysága 5'G-vel meghosszabbított irányító RNS-sel (az 5'G a spacer 21. bázisa), ami miatt nem használhatóak rutinszerűen ilyen módosított irányító RNS-ekkel. Ennek azért van jelentősége, mert az irányító RNS expresszáshoz leggyakrabban használt U6 és T7 promóterek az expresszálandó szekvencia 5' végén egy G (esetleg A) kezdő nukleotidot preferálnak a hatékony és pontos átíráshoz. Egy 5'G meghosszabbítással a nem purinnal (C és T) kezdődő targetek is elérhetővé válnak (3.B ábra). Erre kínálnak megoldást a csoportunkban létrehozott Blackjack megnövelt pontosságú SpCas9 fehérjék (jó szívvel ajánljuk a

Blackjack SpCas9, eSpCas9-plus és SpCas9-HF1-plus használatát azoknak, akik alkalmazásaikban a vad típusú, illetve az e- vagy SpCas9-HF1 variánsokat terveznék használni), amelyek leírását idén publikáltuk a Nature Communications szaklapban [32]. A Blackjack mutációk neve a 21. 5'G nukleotidra utal.



**3. ábra. A target DNS-hez kötött Cas9 nukleáz komplex sematikus ábrája.** A) Off-target hasítás esetén a spacer szekvencia részben eltér a target DNS-től, a mismatch-ek pirossal vannak jelölve. B) Az irányító RNS 5' vége egy extra 21.G nukleotidot tartalmaz.

Az SpCas9 rendszer másik komolyabb limitációja, hogy a nukleáz hasítási hatékonysága célszekvenciáról célszekvenciára változik. Jelentős előnnyel szolgálna, ha meg tudnánk jósolni, hogy mely szekvenciákat képes hatékonyan hasítani a Cas9 fehérje. Ezért csoportunk létrehozott egy on-target hasítási hatékonyságot prediktáló algoritmust az SpCas9-HF1 megnövelt pontosságú variáns aktivitásának jóslására. A módszer, amelyet ehhez kifejlesztettünk, lehetővé tette egy, az eddig vizsgált könyvtárakhoz képest jelentősen nagyobb, egymillió célszekvenciát tartalmazó könyvtár vizsgálatát *Escherichia coli* baktériumban egy önmagát vágó irányító RNS variáns használatával [38]. A módszer reményeink szerint széles körben alkalmazható más SpCas9 variánsok és egyéb ortológ fehérjék célszekvencia preferenciájának prediktálására. A

hasítási hatékonyságok célszekvencia függésének jobb megértéséhez fejlesztés alatt áll egy módszerünk *in vitro* környezetben is.

Csoportunk az SpCas9 nukleáz jelenlegi legjobb alternatívájának tekintett Cas12a fehérjével is behatóbban foglalkozik [39, 40]. A Cas12a fehérjék számos előnyük ellenére korlátozottan használhatóak, mert elérhető target szekvenciáik ritkábban fordulnak elő hosszabb, 3-4 nukleotidos PAM szekvenciájuk miatt. Létrehoztuk az improved LbCas12a variánst (impLbCas12a), amely a létező *Lachnospiraceae* baktériumból származó Cas12a variánsok közül a legmegengedőbb PAM szekvenciával rendelkezik, ezáltal a legtöbb célszekvencia hasítására alkalmazható [41]. Aktivitása összemérhető a párhuzamosan fejlesztett enAsCas12a változatával (Joung csoport fejlesztése) [42], emellett azonban átfedő, de részben különböző PAM és célszekvencia preferenciákkal rendelkeznek. Az impLbCas12a használata ugyanakkor előnyösebb hidegvérű fajokban és növényekben, mivel a fehérje más Cas12a ortológokhoz képest alacsony hőmérsékleten is magas aktivitást mutat.

Az elmúlt évek új CRISPR áttörése a base editing [26, 43] és a prime editing [27] módszerek kifejlesztése. Mindkét technika kettősszál törés nélkül képes bázispár pontosságú genom módosításra, bár még sokszor alacsony hatékonysággal és nem elhanyagolható nem kívánatos inszerciók és deléciók (indel) mellett. Nagyszámú új base editor variánst fejlesztettek ki az első publikációt követő rövid időszak alatt a rendszer hatékonyságának és specificitásának növelése céljából [44]. Azonban ezen variánsok hasznosságát szisztematikus összehasonlításuk hiányában nehezen lehet felmérni. Olyan tesztrendszereket hoztunk létre, amelyek fluoreszcencia változáson keresztül mérik a base editor variánsok aktivitását és alkalmasak base editorok nagyszámú célszekvencián történő gyors és szisztematikus összehasonlítására. A kifejlesztett módszerek segítségével jelentősen csökkentett indel háttér mellett is tudunk hatékony bázis editálást (és a legújabb fejlesztésű módszert, prime editálást is) végrehajtani [45].

Ezekben az alapkutatói és módszer fejlesztési munkákban szerzett tapasztalataink transzgenikus sejtmodellek létrehozásában és preklinikai eljárások fejlesztésében is nagyon hasznosnak bizonyultak. Az egyik ilyen általunk létrehozott sejtmodell, az endogén vimentin-GFP fúziós fehérjét expresszálló sejtek fluoreszcens mikroszkóppal készült képe (a fotót Bartos Zsuzsa készítette) látható a Biokémia újság mostani számának címlapján.

Meggyőződésünk, hogy a Nobel-díj odaítélése „egy génszerkesztési módszer kidolgozásáért” nem a vége, hanem még csak az első fejezete a CRISPR és a genomszerkesztés történetének.

### Irodalomjegyzék

- [1] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337(6096)**: 816-21.
- [2] Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339(6121)**: 819-23.
- [3] Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, **2**: e00471.
- [4] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339 (6121)**: 823-6.
- [5] Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Franklin, B., Kellner, M.J., Joung, J., Zhang, F. (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, **358(6366)**: 1019-1027.
- [6] Barrangou, R. (2015) The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr Opin Immunol*, **32**: 36-41.
- [7] Faure, G., Shmakov, S.A., Yan, W.X., Cheng, D.R., Scott, D.A., Peters, J.E., Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2019) CRISPR-Cas in mobile genetic elements: counter-defence and beyond. *Nat Rev Microbiol*, **17 (8)**: 513-525.
- [8] Koonin, E.V., Makarova, K.S., Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, **37**: 67-78.
- [9] Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E.V. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, **13(11)**: 722-36.
- [10] Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2018) Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *CRISPR J*, **1**: 325-336.
- [11] Mangold, M., Siller, M., Roppenser, B., Vlaminckx, B.J., Penfound, T.A., Klein, R., Novak, R., Novick, R.P., Charpentier, E. (2004) Synthesis of group

- A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol Microbiol*, **53(5)**: 1515-27.
- [12] Marino, M. (2004) Biography of Jennifer A. Doudna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101 (49)**: 16987-9.
- [13] Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, **471 (7340)**: 602-7.
- [14] Rouet, P., Smih, F., Jasin, M. (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, **14 (12)**: 8096-106.
- [15] Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., Carroll, D. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, **161 (3)**: 1169-75.
- [16] Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D., Rebar, E.J. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, **29 (2)**: 143-8.
- [17] Reyon, D., Tsai, S.Q., Khayter, C., Foden, J.A., Sander, J.D., Joung, J.K. (2012) FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, **30 (5)**: 460-5.
- [18] Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, **60 (2)**: 174-82.
- [19] Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, **1**: 7.
- [20] Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., Schouls, L.M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, **43 (6)**: 1565-75.
- [21] Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315 (5819)**: 1709-12.



- [22] Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, **322 (5909)**: 1843-5.
- [23] Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109 (39)**: E2579-86.
- [24] Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.S. (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, **31(3)**: 230-2.
- [25] Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., Joung, J.K. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, **31 (3)**: 227-9.
- [26] Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., Liu, D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, **533 (7603)**: 420-4.
- [27] Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., Liu, D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, **576 (7785)**: 149-157.
- [28] Greely, H.T. (2019) CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *J Law Biosci*, **6 (1)**: 111-183.
- [29] Lander, E.S., Baylis, F., Zhang, F., Charpentier, E., Berg, P., Bourgain, C., Friedrich, B., Joung, J.K., Li, J., Liu, D., Naldini, L., Nie, J.B., Qiu, R., Schoene-Seifert, B., Shao, F., Terry, S., Wei, W., Winnacker, E.L. (2019) Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature*, **567 (7747)**: 165-168.
- [30] Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Joung, J.K. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, **529 (7587)**: 490-5.
- [31] Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., Zhang, F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, **351: (6268)** 84-8.
- [32] Kulcsar, P.I., Talas, A., Toth, E., Nyeste, A., Ligeti, Z., Welker, Z., Welker, E. (2020) Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. *Nat Commun*, **11: (1)** 1223.
- [33] Chen, J.S., Dagdas, Y.S., Kleinstiver, B.P., Welch, M.M., Sousa, A.A., Harrington, L.B., Sternberg, S.H., Joung, J.K., Yildiz, A., Doudna, J.A.

- (2017) Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, **550: (7676)** 407-410.
- [34] Casini, A., Olivieri, M., Petris, G., Montagna, C., Reginato, G., Maule, G., Lorenzin, F., Prandi, D., Romanel, A., Demichelis, F., Inga, A., Cereseto, A. (2018) A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat Biotechnol*, **36: (3)** 265-271.
- [35] Lee, J.K., Jeong, E., Lee, J., Jung, M., Shin, E., Kim, Y.H., Lee, K., Jung, I., Kim, D., Kim, S., Kim, J.S. (2018) Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun*, **9: (1)** 3048.
- [36] Vakulskas, C.A., Dever, D.P., Rettig, G.R., Turk, R., Jacobi, A.M., Collingwood, M.A., Bode, N.M., McNeill, M.S., Yan, S., Camarena, J., Lee, C.M., Park, S.H., Wiebking, V., Bak, R.O., Gomez-Ospina, N., Pavel-Dinu, M., Sun, W., Bao, G., Porteus, M.H., Behlke, M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*, **24: (8)** 1216-1224.
- [37] Kulcsar, P.I., Talas, A., Huszar, K., Ligeti, Z., Toth, E., Weinhardt, N., Fodor, E., Welker, E. (2017) Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. *Genome Biol*, **18: (1)** 190.
- [38] Tálás, A., Huszár, K., Kulcsár, P.I., Varga, J., Varga, E., Tóth, E., Welker, Z., Erdős, G., Pach, F., Welker, A., Györgypál, Z., Tusnády, G., Welker, E. (2020-in print) A method for characterizing Cas9 variants via a one-million target sequence library of self-targeting sgRNAs. *Nucleic Acids Res*.
- [39] Toth, E., Weinhardt, N., Bencsura, P., Huszar, K., Kulcsar, P.I., Talas, A., Fodor, E., Welker, E. (2016) Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biol Direct*, **11: 46**.
- [40] Toth, E., Czene, B.C., Kulcsar, P.I., Krausz, S.L., Talas, A., Nyeste, A., Varga, E., Huszar, K., Weinhardt, N., Ligeti, Z., Borsy, A.E., Fodor, E., Welker, E. (2018) Mb- and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants. *Nucleic Acids Res*, **46: (19)** 10272-10285.
- [41] Toth, E., Varga, E., Kulcsar, P.I., Kocsis-Jutka, V., Krausz, S.L., Nyeste, A., Welker, Z., Huszar, K., Ligeti, Z., Talas, A., Welker, E. (2020) Improved LbCas12a variants with altered PAM specificities further broaden the genome targeting range of Cas12a nucleases. *Nucleic Acids Res*, **48: (7)** 3722-3733.

- [42] Kleinstiver, B.P., Sousa, A.A., Walton, R.T., Tak, Y.E., Hsu, J.Y., Clement, K., Welch, M.M., Horng, J.E., Malagon-Lopez, J., Scarfo, I., Maus, M.V., Pinello, L., Aryee, M.J., Joung, J.K. (2019) Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol*, **37**: (3) 276-282.
- [43] Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., Liu, D.R. (2017) Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, **551**: (7681) 464-471.
- [44] Anzalone, A.V., Koblan, L.W., Liu, D.R. (2020) Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, **38**: (7) 824-844.
- [45] Tálas, A., Simon, D., Kulcsar, P.I., Varga, E., Welker, E. (under review) BEAR reveals that increased fidelity variants can successfully reduce the mismatch-tolerance of adenine but not cytosine base editors.



**Kulcsár Péter István** 2013-ban szerzett vegyész MSc diplomát az ELTE-n. 2019-ben *summa cum laude* minősítéssel PhD fokozatot kapott az SZTE AOK Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola hallgatójaként, Welker Ervin témavezetésével. Doktori értekezésének témája az új, megnövelt pontosságú SpCas9 variánsok létrehozása volt. 2020-ban elnyerte a Bolyai János Ösztöndíjat.



**Tálas András** az ELTE TTK-n végzett molekuláris biológusként. Jelenleg a Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskolájában végzős PhD hallgató. Doktori értekezésének témája a Cas9 nukleázok szekvencia specificitásának meghatározása az általa kidolgozott módszerekkel. Jelenlegi kutatási területe a legújabb CRISPR eszközök, a bázisszerkesztés és a prime editing technikák fejlesztése, valamint új detekciós eljárások kidolgozása.



**Huszár Krisztina** az ELTE TTK-n végezte tanulmányait, ahol biológus diplomát szerzett genetika alszakirányon. PhD munkáját az ELTE Biológia Doktori Iskolájában végzi. Kutatási területe a CRISPR/Cas9 rendszer működésének vizsgálatán belül az irányító RNS és a Cas9 fehérje kapcsolatát és a komplex működését befolyásoló tényezők vizsgálata.



**Varga Éva** alap- és mesterképzéses tanulmányait az ELTE Biológia szakán végezte Molekuláris, Immun- és Mikrobiológia szakirányon. Doktori tanulmányait az SZTE AOK Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolájában végzi. A CRISPR/Cas rendszerek fejlesztésével foglalkozik: új Cas12a base editorok fejlesztésével az általa létrehozott rendszerben, valamint mutációt hordozó őssejtek allélspecifikus gyógyításának megvalósításán dolgozik.



**Krausz Sarah Laura** tanulmányait az ELTE biológia alap- és mester (Molekuláris, Immun- és Mikrobiológia szakirány) szakán végezte. 2016-ban nyert felvételt a Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskolájának PhD programjába. PhD témája a Cas9 nukleázok off-target hatásának csökkentése, a munkát Welker Ervin témavezetésével a TTK Enzimológiai Intézetben végzi.



**Tóth Eszter** az ELTE TTK biológus szakán tanult, ahol 2008-ban biológus diplomát szerzett idegtudomány és humánbiológia alszakirányon. 2008-tól állami ösztöndíjasként vett részt az ELTE Biológia doktori iskolájának Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Programjában. Doktori fokozatát 2015-ben szerezte *summa cum laude* minősítéssel, értekezésének címe: „A Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációja és traffic-je”. Jelenleg a CRISPR/Cas12a nukleázok, valamint CRISPR/Cas9 alapú, off-target mentes és allélspecifikus terápiás megoldások fejlesztésén dolgozik.



**Welker Ervin** 1987-ben szerezte PhD fokozatát a humán multidrog rezisztencia fehérje szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata alapján Váradi András és Sarkadi Balázs témavezetésével. Hét évet töltött a Cornell Egyetemen, Harold Scheraga laboratóriumában, a fehérjefeltekeredés kérdéseit vizsgálva. 2006-tól 2010-ig HHMI international scholar volt. Az MTA doktora címet 2008-ban nyerte el, egydoménes fehérjék oxidációs feltekeredéséről írta dokozatát. 2015 óta dolgozik kutatócsoportja a CRISPR nukleázok működési mechanizmusának megértésén és új génedítáló módszerek kifejlesztésén.

## A FÉM NANORÉSZECSKÉK ÉS A HISZTON-DEACETILÁZ INHIBITOROK TUMORELLENES HATÁSÁNAK SOKSZÍNŰSÉGE

*Igaz Nóra és Kiricsi Mónika  
Szegedi Tudományegyetem, TTIK,  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék*

### Összefoglalás

A nanotechnológia fejlődése révén számos új diagnosztikai és terápiás megközelítésre nyílt lehetőség, melyek a jövőben forradalmasíthatják a rákos megbetegedések klinikai kezelését. Terápiás szempontból az arany (AuNP) és az ezüst nanorészecskék (AgNP) különleges tulajdonságai is jól kihasználhatók lehetnek: arany nanorészecskét terápiás molekulák szállítására, radioszenzitivizációra, ezüst nanorészecskét egyedi apoptotikus tulajdonságai miatt alkalmazhatnák a rákos sejtek elpusztítására. A hiszton-deacetiláz enzimek (HDAC) gátlószerei a fehérjék acetilációs mintázatának befolyásolásán keresztül számos sejtbiológiai folyamatot modulálhatnak. A hiszton fehérjék acetilációjának növelésén át nyitottabb kromatin szerkezetet alakítanak ki, mellyel a DNS sebezhetőségét is növelik. Munkánk során AgNP, AuNP és HDAC gátlók kombinációjának tumorelles határait vizsgáltuk *in vitro* sejt kultúrákon. Megállapítottuk, hogy az AgNP és a HDAC inhibitor Trichostatin A szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek életképességét és együttes alkalmazásuk szignifikánsan növeli a DNS kettősszalú törések számát. Az AuNP és a HDAC gátló szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) együttes alkalmazásakor radioszenzitivizáló képességük jelentősen megnő, mivel az így kezelt tumoros sejtek kolóniaformáló képessége csökken, a DNS károsodás mértéke viszont jelentősen megnő irradiációt követően. A HDAC inhibitor által kialakított nyitottabb kromatin szerkezet a DNS-t valószínűleg hozzáférhetőbbé teszi az AgNP által indukált oxidatív stressz és az AuNP segítségével felerősített, az ionizáló sugárzás által okozott károsító hatások számára.

### Bevezetés

Az elmúlt évtizedben jelentős alap- és transzlációs kutatási aktivitás összpontosult a nanoméretű anyagok orvosbiológiai, elsődlegesen diagnosztikai és terápiás alkalmazhatóságának feltérképezésére, ám ezen belül is, a legjelentősebb erőfeszítéseket az onkológiai célú kutatásokba fektették. Ennek háttérében – részben legalábbis – a nanotechnológia jelentős fejlődése áll, mivel új eredményeinek köszönhetően innovatív stratégiák jöttek létre a rákos megbete-

gedések kezelését célzó fejlesztésekben is [1]. A nanotechnológia olyan anyagok szintézisével, kémiai, fizikai, anyagtudományi karakterizálásával foglalkozó diszciplína, melyek a nanométeres mérettartományba esnek. Ebben a mérettartományban (legfőképpen 1-100 nm között) az anyagoknak nem csupán a fizikai-kémiai jellemzői, de a biológiai rendszerekkel kialakított kölcsönhatásai is megváltoznak, ami óriási lehetőségeket rejthet az orvostudomány számára is. Ennek a munkának az eredményeként jónéhány „nano-anyag” és ezt alkalmazó onkoterápiás kezelési eljárás került klinikai vizsgálati fázisba [2]. Annak ellenére, hogy ezek jelentősebb része a liposzómába csomagolt kemoterápiás hatóanyag bejuttatását célozta meg, a közelmúltban több más kémiai összetételű, főként fémalapú nanostruktúra került a figyelem középpontjába, mivel a kísérletes kemoterápiás vizsgálatok alapján ígéretes és hatékony anyagoknak bizonyultak. Ezek közül a vegyületek közül a legszélesebb körben az ezüst (AgNP) és arany (AuNP) nanorészecskéket ismerik. Bár az AgNP-k ismertségüket elsősorban a már bevált antimikrobiális hatásaikkal érdemelték ki [3], ennek ellenére a mikrobiális kórokozók mellett más, akár emlős sejtekkel szemben is egyedülálló citotoxikus aktivitást fejthetnek ki, amely tulajdonságuk megalapozhatja felhasználásukat a tumorterápiában is.

Az ezüst nanorészecskék terápiás potenciálja egyedülálló módon arra a jelenségre támaszkodik, melyet „Trójai faló mechanizmus” névvel illetnek [4, 5]. Ennek hátterében az áll, hogy az AgNP-t főként endocitózissal veszik fel a tumoros sejtek, majd az internalizált részecskék felszínéről a késői endoszómákban, lizoszómákban a savas környezet hatására reaktív ezüst ionok szabadulnak fel, amelyek révén reaktív szabadgyökök termelése indukálódik, és ez végül oxidatív stresszhez és apoptózishoz vezet. Hogy a sejtek a nanorészecskék felvétele során milyen endocitotikus mechanizmust alkalmaznak, az függ a nanorészecskék méretétől, alakjától, felületi töltésétől, hidrofóbicitásától és a részecske felszínére tapadó fehérjéktől, azaz az ún. protein koronától is, és természetesen a kérdéses sejt típusától [6, 7].

Az ezüst részecskékhez képest az arany nanorészecskék (AuNP) gyakorlatilag inertnek tekinthetők, nem mutatnak különösebb citotoxikus hatást az emlős sejteken. Viszont az AuNP-nek, ahogy minden fém nanorészecskének, kis mérete és az extrém nagy fajlagos felülete jól kihasználható lehet az onkoterápiás eljárásokban. A nanorészecskék felszíne ugyanis változtatható, így különböző funkcionizáló és célzó molekulák konjugációjának révén befolyásolhatjuk a nanorészecskék biológiai hatásait. Ezzel a módszerrel nem csupán a

nanorészecskéket irányíthatjuk célzottan a rákos sejtekhez, de a felszínükre kapcsolt kemoterápiás gyógyszermolekulákat is, így növelhetjük a terápia tumorspecifitását [8]. Emellett az „aktív tumor-célzó” hatás mellett, a nanorészecskék „passzívan”, specifikus funkcionálizáló csoport nélkül is, felhalmozódhatnak a tumorokban. A szervezetben keringő, 5-100 nm mérettartományba eső nano-anyagoknak ezt a kivételes farmakokinetikai viselkedését a tumoros szövetek megnövekedett áteresztőképességének és retenciójának, az ún. EPR (enhanced permeability and retention) hatásnak tulajdonítják, melynek háttérében a daganat egyedi vaszkularizációja, a fenesztrált endotél és a bazális membrán sajátos rendellenességei állnak [9, 10].

Ugyan a nano-hordozó funkció igen nagy jelentőséggel bír a kemoterápiás ágensek célbajuttatásakor, egyes fém nanorészecskék, mint az AuNP, a fototermális tumorterápiás eljárásokban is kiválóan felhasználhatók, ahol a kialakuló lokális hipertermia a rákos sejtek eliminálását indukálja [11]. De az arany nanorészecskék radioszenzitizáló jellege is kiaknázzható ionizáló sugárzással kombinációban alkalmazva [12]. Ez utóbbi képesség annak tulajdonítható, hogy irradiáció hatására a nanorészecske arany atomjainak elektrónhéjairól a gerjesztés következtében többféle reaktív elektron léphet ki, melyek más nanorészecskékben is kiválhatnak elektron felszabadulást, ionizációt vagy szabadgyök képződést okozhatnak, így erősítve a sugárkezelés hatását [13, 14].

A hisztonok és más fehérjék reverzibilis poszttranszlációs acetilációs módosítását katalizálják a hiszton-acetiltranszferáz és a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek. A hisztonok esetében leggyakrabban a fehérje N-terminális végén található lizin aminosav oldalláncokon történik acetiláció, mely gyengíti a hisztonok és a DNS közötti elektrosztatikus kölcsönhatást, ezáltal egy lazább, relaxáltabb kromatinszerkezet jön létre. A nyitottabb kromatinszerkezet hozzáférhetőbbé teszi a DNS-t a transzkripció faktoroknak, szabályozó fehérjéknek, de akár a DNS-t károsító hatások számára is [15]. A HDAC enzimek aktivitása viszont az acetil-csoport eltávolítása révén egy szorosabban csomagolt, kompaktabb kromatinszerkezet kialakulásához vezet. A legtöbb HDAC enzim aktív centrumában  $Zn^{2+}$  ionokat köt, ezért olyan vegyületek, mint egyes hidroxámsavak - pl. a szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) és a Trichostatin A (TSA) - nagy  $Zn^{2+}$  ion-kötő affinitásuknak köszönhetően képesek az összes  $Zn^{2+}$  függő HDAC enzimet gátolni [16]. Egyes HDAC inhibitorokról már ismert, hogy csökkentik a tumorok progresszióját, a DNS hibajavítást, és apoptózist indukálnak mitokondriális és oxidatív stressz révén [17, 18]. A HDAC inhibitorok

ideális alkalmazása más kemoterápiás szerekkel kombinációban vagy sugárterápiával kiegészítve képzelhető el leginkább, így más tumorellenes aktivitással rendelkező anyagok, mint a fém nanorészecskék, potenciális terápiás partnerei lehetnek.

Ezért kísérleteink során azt tanulmányoztuk, hogy az ezüst és arany nanorészecskék a HDAC inhibitorokkal kombinációban alkalmazva felerősítik-e egymás tumorellenes hatását és képesek-e növelni a tumorterápia hatékonyságát.

## Módszerek

### *A nanorészecskék szintézise, karakterizálása*

A citráttal stabilizált ezüst és arany nanorészecskéket az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén állították elő többlépésben, kémiai redukciós eljárással, 1%-os ezüst nitrát, illetve hidrogén-tetrakloro-aurát oldat, 0,1%-os nátrium-borohidrid és 1%-os nátrium-citrát oldat felhasználásával. A nanorészecskék morfológiáját, méreteloszlását, felületi töltését és optikai jellemzőit transzmissziós elektronmikroszkóppal (FEI Tecnai G<sup>2</sup> 20 X, FEI Corporate Headquarters, Hillsboro, OR, USA), Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worchester-shire, UK) készülékekkel és UV-Vis spektrofotométerrel (Ocean Optics 355 DH-2000-BAL UV-Vis spektrofotométer, Halma PRC, Largo, FL, USA) tanulmányozták. A karakterizálás eredményeképpen megállapították, hogy egy átlagosan 35 nm nagyságú AgNP-t tartalmazó kolloidot és egy átlagosan 10 nm-es nagyságú arany nanorészecskéket tartalmazó kolloid oldatot kaptak, amely minták spektrális tulajdonságai alátámasztották a nanorészecskék jelenlétét. A részecskék nagyjából gömb alakúak, nagy negatív felületi töltésüknek megfelelően stabilaknak tekinthetők.

### *Sejtkultúra*

Eredményeinket HeLa humán cervikális karcinóma és A549 humán tüdő adenokarcinóma sejteken mutatjuk be, de a kísérleteket elvégeztük U2Os humán oszteosarkóma, 4T1 egér-eredetű emlőkarcinóma, NIH-3T3 egér fibroblaszt, humán prosztatárakos sejtvonalakon (DU-145 és PC-3) és MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken is. A sejtek tenyésztésekor 1 g/l glükóz tartalmú DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) médiumot használtunk (HeLa, U2Os és NIH-3T3 sejtek esetén), amit 5% (HeLa sejtek esetén) vagy 10% borjúsérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 0,01% sztreptomocinnal és 0,006% penicillinnel egészítettük ki. RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial



Institute 1640) médiumban tenyésztettük a 4T1, A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejteket, ezt a tápoldatot 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 0,01% sztreptomocinnal és 0,006% penicillinnel egészítettük ki. A sejteket 37 °C-os inkubátorban 5% CO<sub>2</sub> és 95% páratartalom mellett tartottuk fent.

### *Irradiáció*

Az irradiációt a SZTE Onkoterápiás Klinikáján Dr. Varga Zoltán és Prof. Dr. Hideghéty Katalin végezte. A mintákat 6 MeV energiájú fotonnal sugarzták be, a 2 Gy sugárdózis alkalmazása esetén 1 percre, míg a 4 Gy sugárdózis adása során 2 percre. A fotonokat Primus lineáris gyorsító (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) segítségével állították elő.

### *Viabilitás, kombinációs index*

A kezeletlen, és a nanorészecskével, valamint a HDAC inhibitorral, illetve ezek kombinációjával kezelt sejtek viabilitását MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) módszerrel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) határoztuk meg. A vizsgálathoz 10000 db HeLa sejtet, illetve 5000 db A549 sejtet osztottunk ki 96-lyukú lemezekbe. Másnap 0; 15; 30; 45; 60 nM TSA-val, vagy 0; 2; 4; 6; 8 µM AgNP-vel, vagy a kettő kombinációjával (1:7,5 arányban) 72 órán keresztül, illetve 6,8; 34; 68 µM AuNP-vel, vagy 0,1; 0,5 és 1 µM SAHA-val, vagy a kettő kombinációjával szintén 72 órán át kezeltük a sejteket. Az AuNP/SAHA-kezelt mintákat 24 óra múlva 2 Gy ionizáló sugárzásnak tettük ki. A mintákat mosást követően 0,5 mg/ml MTT reagenssel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 órán át inkubáltuk, a kristályos formazánt dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk, majd a minták abszorbanciáját 570 nm-en megmértük (Synergy HTX, Biotek, Winooski, Vt, USA). A kombinációs kezelések után CompuSyn Szoftver segítségével meghatároztuk a kombinációs indexeket az effektív dózis (ED) 50, ED75, ED90 és ED95 értékeknél kapott indexek átlaga alapján.

### *DNS károsodás detektálása γH2AX immunfestéssel*

A 6 µM AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt HeLa sejtekben, valamint a 6,8 µM AuNP-vel, 0,1 µM SAHA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt, 2 Gy sugárdózisnak kitett A549 sejtekben vizsgáltuk a DNS károsodás mértékét γH2AX immunfestéssel. A foszforilált H2AX hiszton (γH2AX) a DNS kettősszalú törések megjelenésekor alakul ki, ezért a DNS károsodás egyik markerének tekinthető. A mintákat a besugárzást követően 1 órával fixáltuk 4%-os formaldehidben. A sejteket γH2AX elsődleges antitesttel

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 1:300 hígítás) majd Alexa 488 fluorofór konjugáltatott másodlagos ellenanyaggal (Invitrogen, 1% BSA-ban 1:600 arányban hígítva) inkubáltuk. A sejtmagokat DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 300 nM) vagy Hoechst 33342 festékkel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3,25  $\mu\text{M}$ ) tettük láthatóvá, és Olympus FV10i (Olympus, Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Meghatároztuk egyrészt a  $\gamma\text{H2AX}$ -pozitív sejtek arányát, másrészt a pozitívan festődő sejteken belül a  $\gamma\text{H2AX}$  fókuszok számát. A statisztikai analízist GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük.

### *Kolóniaformáló képesség*

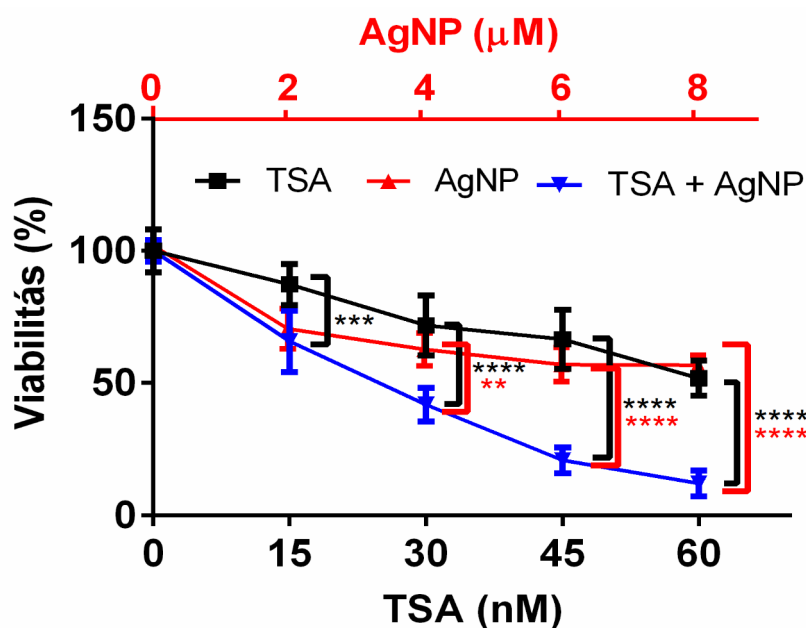
Az irradiáció hosszú távú károsító hatásainak, és az AuNP és a SAHA radioszenzitizáló képességének megállapítása céljából a sejtek kolóniaformáló képességét detektáltuk. Ennek érdekében  $6 \times 10^5$  db sejtet osztottunk ki sejtenyészítő flaskába, majd 6,8  $\mu\text{M}$  AuNP-vel, 0,1  $\mu\text{M}$  SAHA-val vagy a kettő kombinációjával kezeltük. 24 óra múltán a kultúrákat 0, 2 vagy 4 Gy dózisu irradiációnak vetettük alá. Másnap, tripszin kezelést követően, mintánként 700 db sejtet osztottunk ki 6-lyukú lemezekbe. A sejteket 10% FBS tartalmú tápfolyadékban tartottuk. A kialakuló kolóniákat nőni hagytuk, majd egy hét múlva metanol-aceton (7:3) elegyében fixáltuk. A kolóniákat 25%-os metanolban oldott kristályibolyával festettük, számoltuk és az adatokat a nem-irradiált kezeletlen kontrollhoz viszonyítottuk. A statisztikai analízist GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük.

### **Eredmények**

Mind az ezüst, mind az arany nanorészecskéket a tumorsejtek felveszik és a HDAC gátlók is bejutnak a sejtekbe. A nanorészecskék jelenléte nem befolyásolja a HDAC gátlók működését, azok hatására nagy mennyiségű acetylált-lizin detektálható és megnő a poszttranszlációsan acetylált H3, illetve H4 fehérjék aránya mind a HeLa, mind pedig az A549 sejtekben [19, 20]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HDAC gátlók jelenlétében valóban egy nyitottabb, támadhatóbb kromatin szerkezet alakul ki ezekben a tumorsejtekben.

MTT módszerrel vizsgáltuk az AgNP és a TSA kezelés hatását HeLa sejtek viabilitására. A nanorészecske és a HDAC gátló minden kombinációban (4  $\mu\text{M}$  AgNP + 30 nM TSA, vagy 6  $\mu\text{M}$  AgNP + 45 nM TSA, vagy 8  $\mu\text{M}$  AgNP + 60 nM TSA) szignifikánsan csökkentette a HeLa sejtek életképességét a kontrollhoz és a csak AgNP- vagy a csak TSA-kezelt sejtekéhez képest (1. ábra). Meghatároz-

tuk az  $IC_{50}$  értékeket, mely azt a koncentrációt adja meg, amellyel történő kezelés hatására a sejtek életképessége 50%-ra csökkent. Az AgNP esetében az  $IC_{50}$  8,15  $\mu\text{M}$ , míg TSA esetében 63,91 nM volt 72 órás kezelést követően. Megállapítottuk a kombinációs indexet (CI) is, mely 0,33-nak bizonyult, ami erős szinergizmusra utal az AgNP és a TSA hatása között. A további kísérleteinkben az AgNP-t 6  $\mu\text{M}$ , a TSA-t 45 nM koncentrációban alkalmaztuk 24 órás kezelésekkorán HeLa sejteken.

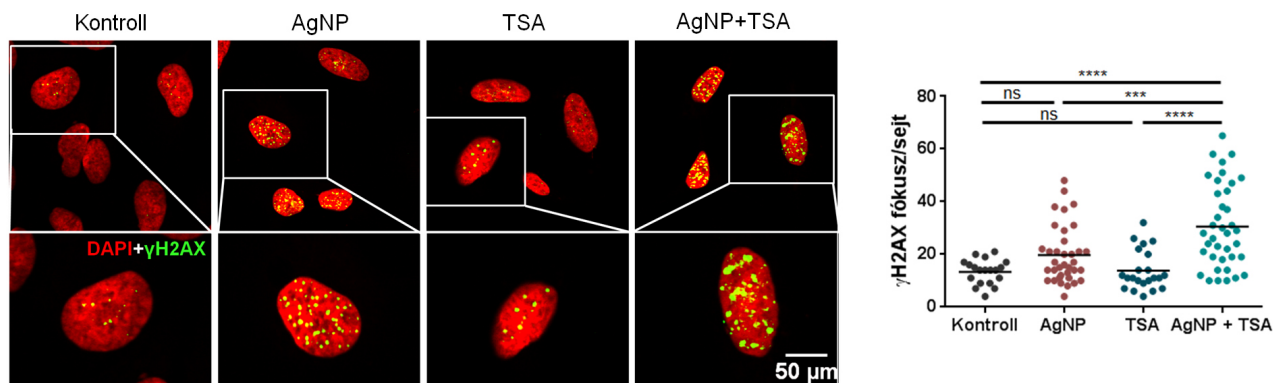


**1. ábra. Az ezüst nanorészecskék (AgNP) és a Trichostatin A (TSA) hatása a HeLa sejtek viabilitására.** Az AgNP és a TSA kombinációjával kezelt HeLa sejtek viabilitása szignifikánsan csökkent az AgNP és a TSA külön-külön történő alkalmazásához viszonyítva. Kétszemponos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, \*\*: P érték < 0,01; \*\*\*: P érték < 0,001; \*\*\*\*: P érték < 0,0001.

A DNS károsodás mértékét  $\gamma\text{H2AX}$  festéssel vizsgáltuk az AgNP-vel, TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt HeLa sejtekben. Az AgNP hatására kis mértékben megnőtt a  $\gamma\text{H2AX}$  fókuszok száma a pozitívan festődő sejtekben a kontroll mintához képest, viszont a TSA önmagában nem váltott ki jelentősebb DNS károsodást. Viszont ha a HeLa sejteket AgNP és TSA együttesével kezeltük, az szignifikánsan megnövelte a  $\gamma\text{H2AX}$  fókuszok számát nem csupán a kontrollhoz, de az AgNP, vagy TSA kezeléshez képest is (2. ábra). Feltehetőleg a DNS jobban támadható az AgNP felszínéről leváló ezüst ionok és a keletkező reaktív oxigén gyökök számára a HDAC gátló TSA hatására kialakuló nyitottabb kromatin szerkezet miatt, amely DNS kettősszalú töréseket eredményez és apoptotikus sejthalált indukál.

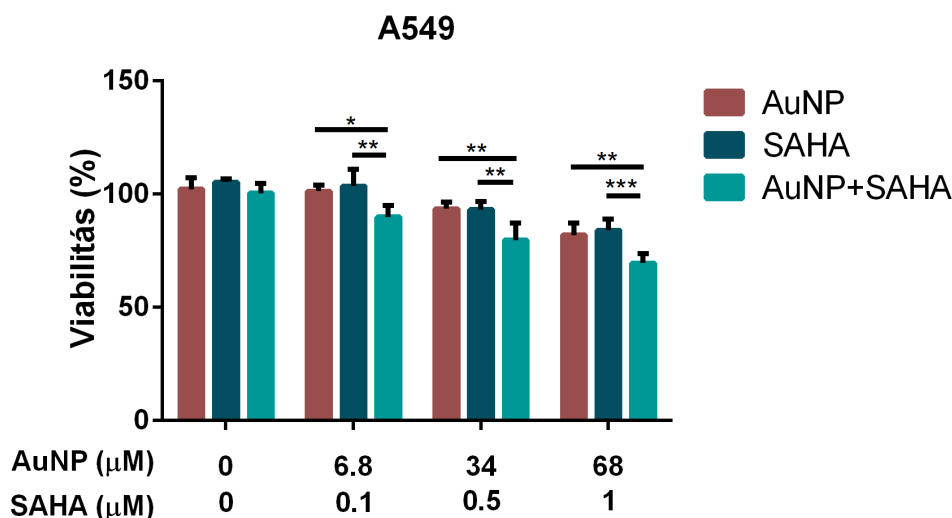
A másik nanorészecske és HDAC gátló, azaz az AuNP és a SAHA hatásait is megvizsgáltuk irradiáció mellett és anélkül A549 sejteken. A besugarazatlan

minták esetén sem az AuNP, sem a SAHA, sem a kettő kombinációja nem okozott viabilitás csökkenést az alkalmazott koncentrációkban 72 óra inkubációt követően.



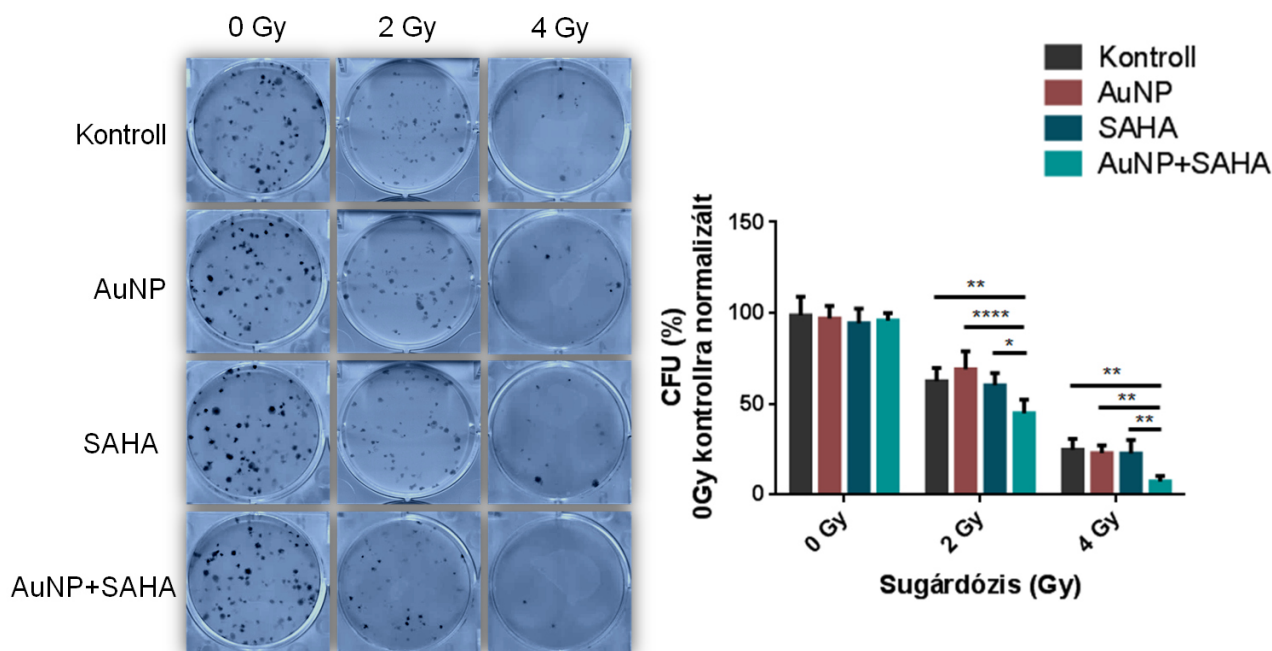
**2. ábra. Az ezüst nanorészecskék (AgNP) DNS károsító hatása Trichostatin A-val (TSA) kombinációban történő alkalmazás esetén.** Bal oldal: Reprezentatív képek a kezelések hatására kialakuló DNS kettősszalú törések számának változásáról. Piros: DAPI festés, mely a sejtmagokat jelöli, zöld:  $\gamma$ H2AX fókuszok, melyek a DNS kettősszalú töréseket jelölik. Scale bar: 50  $\mu$ m. Jobb oldal: A  $\gamma$ H2AX fókuszok száma szignifikánsan nagyobb az AgNP és TSA együttes alkalmazását követően, mind a kezeletlen mintához, mind a TSA-val, illetve az AgNP-vel kezelt sejtekhez képest. Egyszempontos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás \*\*\*: P érték = 0,0006; \*\*\*\*: P érték < 0,0001.

Viszont amennyiben sugárterápiával (2 Gy dózis) is kombináltuk az AuNP és SAHA expozíciót, akkor az AuNP+SAHA kezelt A549 sejtek szignifikánsan alacsonyabb viabilitást mutattak az AuNP-, illetve a SAHA-kezelt mintákéhoz képest (3. ábra).



**3. ábra. Az arany nanorészecskék (AuNP) és a szuberoil-anilid-hidroxiámsav (SAHA) kombinációs kezelés hatása a tumoros sejtek viabilitására irradiációt követően.** A 2 Gy sugárdózisnak kitett, AuNP+SAHA kezelésben részesült sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb volt a csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, besugarazott mintákhoz képest. Kétszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, \*: P érték < 0,05; \*\*: P érték < 0,01; \*\*\*: P érték < 0,001; \*\*\*\*: P érték < 0,0001.

CompuSyn szoftver segítségével meghatároztuk az A549 sejteken mért viabilitási adatok alapján az AuNP+SAHA párra a CI értéket, mely 0,41-nek bizonyult. Ez az 1-nél jóval kisebb értékű CI érték különösen erős szinergizmusra utal.

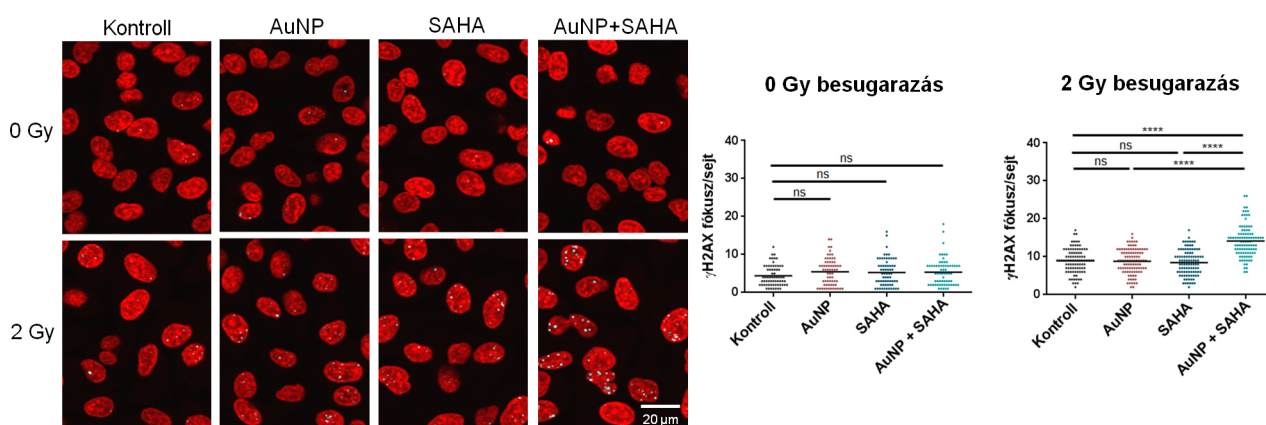


**4. ábra. Az aranynanorészecskék (AuNP) és szuberoil-anilid-hidroxiámsav (SAHA) kombinációjának radioszenzitizáló hatása A549 sejteken.** A 2 Gy vagy 4 Gy sugárdózisnak kitett, AuNP és SAHA kombinációjával kezelt sejtek kolóniaképző képessége szignifikánsan csökken a besugarazott kezeletlen, az AuNP, illetve a SAHA kezelésben részesülő sejtekhez képest. Kétutas ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, \*: P érték < 0,05; \*\*: P érték < 0,01; \*\*\*\*: P érték < 0,0001.

Azt, hogy az AuNP és SAHA kezelés radioszenzitizáló hatást fejt-e ki, az A549 sejtek kolóniaképző képességének vizsgálatával és a DNS kettősszálú törések mértékének meghatározásával tanulmányoztuk. Ahogy az várható volt, irradiáció nélkül a 6,8  $\mu\text{M}$  AuNP vagy 0,1  $\mu\text{M}$  SAHA kezelésben részesült és az ezek kombinációjának kitett (AuNP+SAHA) A549 sejtek által képzett kolóniák száma nem mutatott jelentősebb eltérést a kezeletlen mintában kialakult kolóniák mennyiségéhez képest. Amint a sejtek a kemoterápia mellett 2 Gy vagy 4 Gy sugárdózisban részesültek, a kolóniaképző képességük nagymértékben csökkent, elsősorban abban az esetben, mikor az AuNP-t és a SAHA-t együtt alkalmaztuk az A549 sejteken (4. ábra). Viszont egyik sugárdózis mellett sem tapasztaltunk radioszenzitizációt akkor, ha a 6,8  $\mu\text{M}$  AuNP-t és a 0,1  $\mu\text{M}$  SAHA-t nem kombinációban, hanem önmagában alkalmaztuk.

Az AuNP, a SAHA és a kettő szer kombinációjával kezelt A549 sejtekben  $\gamma\text{H2AX}$

festéssel vizsgáltuk az irradiáció DNS károsító hatásának mértékét, és meghatároztuk a  $\gamma$ H2AX pozitív sejteken belül a  $\gamma$ H2AX fókuszok számát. Itt is azt tapasztaltuk, hogy az AuNP+SAHA kettős kezelések hatására a mintákban a  $\gamma$ H2AX fókuszok száma szignifikánsan magasabbnak adódott az irradiációnak kitett, ám csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, illetve a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (5. ábra).



**5. ábra. Az arany nanorészecskék (AuNP) és szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) alkalmazásának és az irradiációnak az együttes DNS károsító hatása A549 sejteken.** Bal oldal: Reprezentatív képek a sejtekben keletkező DNS kettősszalú törések kialakulásáról a kezeléseket követően, irradiációt követően. Piros: sejtmag, Kék:  $\gamma$ H2AX fókuszok, scale bar: 20  $\mu$ m. Jobb oldal: Ionizáló sugárzás nélkül az AuNP, SAHA és a kettő kombinációja nem okozott jelentős mennyiségű DNS kettősszalú törést, viszont 2 Gy sugárdózis hatására azokban a sejtekben, melyeket nanorészecskékkel és HDAC gátlóval is kezeltünk szignifikánsan több  $\gamma$ H2AX fókuszot számoltunk a kezeletlen és a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt mintákhoz képest. Egyszempontos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás \*\*\*\*: P érték < 0,0001.

## Eredmények megbeszélése

A klinikai gyakorlatban igen nagyszámú, eltérő kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szert, emellett leggyakrabban immunterápiát és sugárkezelést alkalmaznak a daganatos betegek kezelése során. A hatóanyag fejlesztéseken túl, a tumorelles anyagok hatékonyabb célba juttatása, a tumorterápia specifitásának növelése, a nem kívánatos mellékhatások kiküszöbölése vagy csökkentése rendkívül intenzív nemzetközi kutatási aktivitás célpontja. A HDAC inhibitorok, több támadási ponton képesek a tumoros sejtek sejtbológiai folyamatait befolyásolni. A kromatin szerkezet modulálásán túl számos fehérje aktivitását, stabilitását, fehérje-fehérje és fehérje-DNS kölcsönhatásaik erősségét is befolyásolják, ezáltal hatással vannak a génexpresszióra, a sejtek differenciációjára, proliferációjára, és több útvonalon keresztül képesek apoptózist indukálni. A HDAC gátlók ideális kombinációs partnerek lehetnek a kemoterápiás hatóanyagok számára, hiszen az általuk kialakított nyitottabb kromatin szerkezeten keresztül, vagy az indukált apoptotikus folyamatok révén, tovább fokozhatják ezen kemoterápiás hatóanyagok DNS károsító vagy

apoptózist kiváltó hatását.

A nanorészecskék alkalmazása is jelentős mértékben növelheti a tumorellenes terápia hatékonyságát, mivel a részecskék képesek passzívan feldúsulni a tumoros szövetben. Ha a részecskéket hatóanyaghordozóként alkalmazzuk, akkor általuk növelhető a kemoterápiás szerek koncentrációja a daganatban, de az eleve citotoxikus sajátságú nanoanyagok, mint amilyenek az ezüst nanorészecskék, a felhalmozódásukat követően kifejthetik tumorellenes aktivitásukat, vagy akár növelhetik a sugárterápia hatékonyságát radioszenzitizáló tulajdonságuk révén (pl. AuNP).

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a fém nanorészecskék és a HDAC gátlók együtt jelentősen csökkentették a tumoros sejtek életképességét, kolóniaformáló képességét, jelentős mértékű oxidatív stresszt és DNS kettős-szálú törést indukáltak, mely a rákos sejtek halálához vezetett [19, 20]. Eredményeink arra utalnak, hogy a hiszton-deacetiláz gátlók és a fém nanorészecskék kombinációban történő alkalmazása ígéretes tumorterápiás lehetőséget nyújt. Mindamelllett, hogy külön-külön alkalmazva is hatékonyak, a két szer egymás hatását kiegészíti, felerősíti. A HDAC gátlók egyik támadáspontja a kromatint alkotó fehérjék acetilációja, melynek következtében a DNS sokkal kiszolgáltatottabbá válik a különböző károsító hatásoknak. Ezeknek a károsító hatásoknak a jelentős mértékű fokozása megvalósítható ionizáló sugárzás alkalmazásával, más hatásmechanizmusú és kémiai szerkezetű kemoterápiás hatóanyagok, vagy akár biológiailag reaktív fém nanorészecskék segítségével is. A HDAC gátlók és a fém nanorészecskék egymást potencírozó hatása úgy is értelmezhető, hogy már önmagában a fém nanorészecskék hatására igen jelentős mértékben felerősödhet a reaktív oxigéngyökök képződése (pl. AgNP kezelés során), vagy AuNP jelenlétében ionizáló sugárzás alkalmazása mellett, de az így kialakított tumorsejt apoptózis vagy radioszenzitizáció is még tovább növelhető HDAC inhibitorok használatával.

### Irodalomjegyzék

- [1] Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A. (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **93**: 52-79.
- [2] Rudramurthy, G.R., Swamy, M.K. (2018) Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *J Biol Inorg Chem*, **23(8)**: 1185-1204.

- [3] Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W., Gurunathan, S. (2016) Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*, **17(9)**: 1534.
- [4] You, F., Tang, W., Yung, L.Y.L. (2018) Real-time monitoring of the Trojan-horse effect of silver nanoparticles by using a genetically encoded fluorescent cell sensor. *Nanoscale*, **10(16)**: 7726-7735.
- [5] Park, E.J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Park, K. (2010) Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol Vitro*, **24(3)**: 872-8.
- [6] Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, **377(Pt 1)**: 159-69.
- [7] Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y., Xie, L. (2019) Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, **14**: 4247-4259.
- [8] Jeong, E.H., Jung, G., Hong, C.A., Lee, H. (2014) Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch Pharm Res*, **37(1)**: 53-9.
- [9] Sharma, H., Mishra, P.K., Talegaonkar, S., Vaidya, B. (2015) Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov. Today*, **20(9)**: 1143-51.
- [10] Das, R.P., Gandhi, V.V., Singh, B.G., Kunwar, A. (2019) Passive and Active Drug Targeting: Role of Nanocarriers in Rational Design of Anticancer Formulations. *Curr Pharm Des*, **25(28)**: 3034-3056.
- [11] Song, C.W. (1984) Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: A review. *Cancer Res*, **44(10 Suppl)**: 4721s-4730s.
- [12] Chithrani, D.B., Jelveh, S., Jalali, F., Van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R.G., Hill, R.P., Jaffray, D.A. (2010) Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res*, **173(6)**: 719-28.
- [13] Kobayashi, K., Usami, N., Porcel, E., Lacombe, S., and Le Sech, C. (2010) Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutat Res*, **704(1-3)**: 123-31.
- [14] Liu, Y., Zhang, P., Li, F., Jin, X., Li, J., Chen, W., Li, Q. (2018) Metal-based NanoEnhancers for future radiotherapy: Radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells. *Theranostics*, **8(7)**: 1824-1849.
- [15] Drazic, A., Myklebust, L.M., Ree, R., Arnesen, T. (2016) The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*, **1864(10)**: 1372-401 .



- [16] Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., Pavletich, N.P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401(6749)**: 188-93.
- [17] Manal, M., Chandrasekar, M.J.N., Gomathi Priya, J., Nanjan, M. J. (2016) Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg Chem*, **67**: 18-42.
- [18] Shao, Y., Gao, Z., Marks, P.A., Jiang, X. (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, **101(52)**: 18030-5..
- [19] Igaz, N., Kovács, D., Rázga, Z., Kónya, Z., Boros, I.M., Kiricsi, M. (2016) Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **146**: 670-7.
- [20] Igaz, N., Szőke, K., Kovács, D., Buhala, A., Varga, Z., Bélteky, P., Rázga, Z., Tizslavicz, L., Vizler, C., Hideghéty, K., Kónya, Z., Kiricsi, M. (2020) Synergistic radiosensitization by gold nanoparticles and the histone deacetylase inhibitor SAHA in 2D and 3D cancer cell cultures. *Nanomaterials*, **10(1)**: 158.



**Igaz Nóra** 2014-ben szerzett biológia alapszakos, majd 2016-ban biológus mesterszakos diplomát az SZTE TTK-n. Az SZTE Biológia Doktori Iskolájában 2020-ban szerzett abszolutóriumot, a munkája során a fém nanorészecskék és hiszton-deacetiláz gátlók tumorelles hatását vizsgálta Dr. Kiricsi Mónika témavezetése mellett. Összesen 14 nemzetközi folyóiratban megjelent tanulmány szerzője, ebből négynek elsőszerzője.



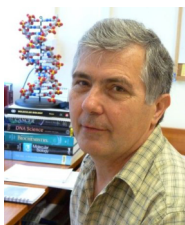
**Kiricsi Mónika** a JATE-n végzett okleveles vegyészként, középiskolai kémia szakos tanárként, valamint olasz nyelvtanárként. PhD fokozatát az SZTE Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolájában szerezte 2005-ben. PhD tanulmányai alatt 2,5 évig az Albertai Egyetem Biokémia Intézetében (Edmonton, Kanada) dolgozott. 2005-ig a SZTE AOK Biokémia Intézetének, majd ezt követően a TTK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékének munkatársa, ahol azóta is dolgozik egyetemi adjunktusként. 2019-ben Bolyai Kutatási Ösztöndíjat és Bolyai Plusz Ösztöndíjat nyert el. Kutatási területe a tumorbiológia, experimentális kemoterápia és nanomedicina területe. Témavezetésével két PhD hallgató szerzett eddig fokozatot, és további 4 hallgatója áll védés előtt.

## A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET (MBKE) 2020. DECEMBER 7.-I TISZTÚJÍTÓ KÖZGYŰLÉSÉN 2021-2025. ÉVEKRE MEGVÁLASZTOTT VEZETŐSÉGE



### **Buday László, elnök**

Buday László 1963-ban született, általános orvos, a TTK Enzimológiai Intézet igazgatója, a Semmelweis Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet részállású egyetemi tanára, az MTA rendes tagja. 1992-1994 között FEBS posztdoktori ösztöndíjjal Londonban, Nagy-Britanniában dolgozott. Hazatérte után elsőként nyerte el a FEBS Long-term Fellowship Follow-up támogatást. 2000-ben Gergely Pállal megalakították az MBKE Jelátviteli Szakosztályát. 2006. január 1-től 2010. december 31-ig az MBKE főtítkáráként tevékenykedett, 2011. január 1. és 2014. december 31. között pedig tagja volt a FEBS Fellowships Committee-nek. 2012 szeptemberében meghívott előadója volt a FEBS ösztöndíjasok első találkozójának (1st FEBS Fellows Meeting) Cadiz-ban, Spanyolországban. 2013 júniusában Budapesten ő szervezte meg az ösztöndíj bizottság esedékes ülését. 2011. és 2015. között az MBKE egyik alelnöki, míg a 2016-2020 között az MBKE elnöki posztját töltötte be.



### **Boros Imre, alelnök**

Boros Imre 1978-ben végzett a JATE biológus szakán. 1985-ben szerzett kandidátusi fokozatot, 2000-ben MTA doktora címet. Pályakezdésétől az SZBK Biokémiai Intézet munkatársa. 2002-től a Szegedi Egyetem egyetemi tanára, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék és a Biológus Tanszékcsoporthoz, majd Intézet vezetője volt 2019-ig. Több alkalommal dolgozott hosszabb időn át az Egyesült Államokban. Érdeklődése pályakezdésétől a génműködés transzkripció szinten megvalósuló szabályozása. Tudományos munkája során előbb erős bakteriális promótereket izolált és jellemzett, később humán retrovírus enhancer és fehérjék kölcsönhatását írta le. Az utóbbi két évtizedben munkacsoportja az SZBK Biokémiai Intézetében és az SZTE Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszéken a kromatin szerkezet és hisztonok módosításaival megvalósuló epigenetikai hatások transzkripciót szabályozó szerepét vizsgálja. A tudományával közéletben egyebek mellett az OTKA Élettudományos Kuratórium elnökeként, számos OTKA zsűri tagjaként és az elmúlt ciklus során, az MBKE IB tagjaként, mint alelnök vett részt.



### **Kovács Mihály, alelnök**

Kovács Mihály az ELTE Biokémiai Tanszékének tanszékvezető egyetemi tanára, az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Programjának vezetője, az MTA közgyűlési képviselője. 2001 óta tagja Egyesületünknek. Rendezvényeinken több tucatnyi alkalommal mutatta be csoportjának munkáját. Szekcióvezetőként, illetve szervezőbizottsági tagként 2009 óta vesz részt MBKE Vándorgyűlések, FEBS3+ és Hungarian Molecular Life Sciences konferenciák szervezésében. 2011 óta tagja az Egyesület Felügyelő Bizottságának és az Intéző Bizottságnak. A 2016-2020 közötti ciklusban az Egyesület főtítkáráként szolgált.



### **Virág László, alelnök**

Virág László 1995 óta tagja az MBKE-nek, amelynek hazai és nemzetközi rendezvényein rendszeresen részt vesz és előad. Két ízben szervezett FEBS kurzust: 2003-ban Debrecenben „Poly(ADP-ribosyl)ation in Health and Disease” címmel elméleti és 2010-ben Debrecen-Budapest helyszínnel „Techniques in Free Radical Biology” címmel gyakorlati kurzus szervezője és előadója volt. Előadóként részt vett 2006-ban a Granadában (Spanyolország) rendezett „Biology and Pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation” című FEBS kurzuson is. Az előző ciklusban az MBKE alelnökeként részt vett az Egyesület szervezésében, illetve társszervezésében megvalósult konferenciák előkészítésében.



### **Lontay Beáta, főtítkár**

Lontay Beáta a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetének docense. Kutatócsoportjával a fehérjék reverzibilis foszforilációjának és metilációjának szerepét vizsgálja normál és patológiás sejtfolyamatokban, illetve különböző betegségek modelleken. 1998 óta tagja az Egyesületnek, amelynek hazai és nemzetközi rendezvényein rendszeresen részt vesz, eredményeiről négy alkalommal előadás formájában is beszámolt. Több nemzetközi konferencia szervezőbizottságának tagja, a FEBS Europhosphatase 2019: „From molecular mechanisms to system-wide responses” Advanced Lecture Course-nak pedig

főszerzője volt. A MTA Molekuláris Biológia, Genetika és Sejtbiológia tudományos bizottság titkára 2014 óta.



#### **Tóth Szilvia Zita, főtktár helyettes**

Tóth Szilvia Zita PhD fokozatát a Genfi Egyetemen szerezte 2006-ban, majd a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézetében kezdett el dolgozni. 2012-ben Humboldt vendégkutatói ösztöndíjat nyert, amelynek köszönhetően két évet töltött a potsdami Max Planck Növénybiológiai Intézetben. 2014-ben tért vissza, majd Lendület kutatócsoportot alakított. Csoportja jelenleg 11 tagú és a biofizika, biokémia és a molekuláris biológia eszköztárát egyaránt használva kutatja az aszkorbát (C-vitamin) bioszintézisét és eddig ismeretlen élettani szerepeit növényekben és zöldségben, valamint a zöldség hidrogéntermelését. 2019-ben a Sümegen megrendezett 49. Membrán-Transzport Konferencia

Szervezőbizottságának elnöke volt.



#### **Csikász-Nagy Attila, budapesti területi képviselő**

Csikász-Nagy Attila biomérnöként végzett a BME-n, ugyanitt szerzett PhD fokozatot a sejtek osztódási ciklusának matematikai modelljeit leíró dolgozatáért. Egy rövid amerikai poszt-doktori állás után a BME-n kezdett oktatni. Utána csoportvezető volt öt évig a Microsoft Research és a Trentoi Egyetem közös rendszerbiológiai kutatóintézetében, majd három évig az Edmund Mach Alapítvány kutatóintézetében, mindkettő Olaszországban. 2012 óta a King's College London rendszerbiológus docense és 2015-ben emellett elkezdett a Pázmány Péter Katolikus Egyetem (PPKE) Információs Technológiai és Bionikai Karán is oktatni. Kutatásai a biológiai hálózatok dinamikai viselkedésének mate-

matikai és számítási vizsgálatára fókuszálnak, valamint vezet egy élesztővel foglalkozó rendszerbiológiai kutatólaborot. 2019 óta egyetemi tanár és kutatási dékánhelyettes a PPKE-n.



#### **Szatmári István, debreceni területi képviselő**

Szatmári István formálisan 2001-től munkatársa a Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológia Intézetének, de TDK és doktorandusz hallgatóként már ezt megelőzően is bekapcsolódott az ott folyó biokémiai vizsgálatokba. Kutatásának fő profilja az immunsejtek fejlődésének transzkripciószabályozása. Nagy László munkacsoportjában végzett genomszintű kutatásai révén, sikerült feltérképeznie a lipid aktivált transzkripciószabályozó faktorok szerteágazó szerepét dendritikus sejtekben. Az utóbbi években érdeklődése az embrionális őssejtekben kiinduló transzkripciószabályozó faktor alapú sejtprogramozás irányába terelődött. 2018-

tól vezeti a Biokémiai és Molekuláris Biológia Intézet égisze alatt működő Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumot. Szatmári István 1996 óta tagja az MBKE-nek, az elmúlt periódusban ő látta el az Egyesület debreceni területi képviselői feladatát. Az utóbbi években intenzíven részt vett az Egyesület munkájában, többek között közreműködött a Biokémiai vándorgyűlések, illetve a Molekuláris Élettudományi Konferenciák összejt szekciók szervezésében.



#### **Bognár Zita, pécsi területi képviselő**

Bognár Zita 2002-óta dolgozik a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében, jelenleg egyetemi docens. Általános orvosi és MBA diplomákkal rendelkezik, PhD fokozatát 2007-ben szerezte, 2019-ben habilitált. PhD hallgatóként kezdett el foglalkozni az amiodaron és metabolitja biokémiai hatásaival, leírta direkt mitokondriális, valamint iszkémia-reperfúzió modellben mutatott hatásait. Jelenleg a dezetil-amiodaron tumor ellenes hatásának vizsgálatával foglalkozik, mely témában USA, EU szabadalommal és pályázattal rendelkezik. Felsőfokú szaknyelvi vizsgája van német és angol nyelvből, három nyelven oktat, négy tantárgy tantárgyfelőse és jelentős feladatot vállal az oktatásszervezésben, a PhD hallgatók irányításában is. Az Erasmus+ program keretében többször volt vendégkutató Németországban és Ausztriában. Több ízben vett részt és számolt be eredményeiről az MBKE rendezvényein (melynek 15 éve tagja), közreműködött az International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) Pécsi találkozójának szervezésében. A 2020-ban elmaradt, de 2022-re tervezett Biokémiai Vándorgyűlés egyik pécsi szervezője.



### Csont Tamás, szegedi területi képviselő

Csont Tamás több mint 2 évtizede végez kutatómunkát a Szegedi Tudományegyetem AOK Biokémiai Intézetében. A PhD fokozat megszerzését követően 2 és fél éves posztdoktori tréningben részesült az Albertai Egyetemen Kanadában, majd 2003-ban tért vissza Szegedre. Számos ösztöndíjban részesült (pl. AHFMR Post-doctoral Fellowship, Békésy György Posztdoktori Ösztöndíj, Bolyai Ösztöndíj). Aktívan részt vesz az utánpótlás-nevelésben, valamint a biokémia tárgy oktatásában orvos, gyógyszerész és PhD hallgatók részére. Tudományos munkái során vizsgálta a szívizomban végbemenő élettani és biokémiai változásokat különböző stressz-állapotokban és betegség modellekben, mint például iszkémia-reperfúzió, hőstressz, gyulladás, diabétesz, hiperlipidémia, szívelégtelenség, veseelégtelenség során. Ugyancsak foglalkozott a szívizom endogén stressz-adaptációs folyamatainak megértésével és a szívizomkárosodás farmakológiai befolyásolásának vizsgálatával. Több ízben vett részt és számolt be eredményeiről az MBKE rendezvényein, az Egyesület Intéző Bizottsága tagjaként az elmúlt ciklusban szegedi területi képviselő volt.

## FELÜGYELŐ BIZOTTSÁG



### Sarkadi Balázs, elnök

Sarkadi Balázs, orvos, biológus, az MTA rendes tagja, több évet töltött poszt-doktorként, majd kutatóként az USA és Kanada vezető egyetemén és kutató-intézeteiben. Jelenleg a Természettudományi Kutatóközpont emeritusz professzora, a Semmelweis Egyetem kutatóprofesszora. Számos nemzetközi tudományos társaságnak tagja, a FEBS volt elnöke, az Academia Europaea tagja. Kutatási területe elsősorban a biológiai membránok szerkezete és működése, kiemelten az ABC típusú transzporterek szerepének vizsgálata a daganatokban, az őssejtekben és a gyógyszer-metabolizmusban. Több mint 250 közleménye jelent meg nemzetközi folyóiratokban, amelyekre mintegy 15.500 hivatkozás érkezett (h-indexe 66). Témavezetésével végzett PhD hallgatóinak száma 21, számos nemzetközi oltalommal védett szabadalma került gyakorlati alkalmazásra is. Az MBKE-nek 1974 óta tagja, több évig az elnökség tagja (1989-1996), majd a felügyelő bizottság (2012-2020) elnöke volt.



### Bugyi Beáta, tag

Bugyi Beáta a PTE ÁOK Biofizikai Intézetének egyetemi docense. 2014 – 2020 között az MBKE Felügyelő Bizottságának tagi tisztségét tölti be. Érdeklődési területe az aktin sejtvázas és szabályozó fehérjék funkcióiban meghatározó molekuláris mechanizmusok vizsgálata. A PhD fokozat megszerzését követően, 2006–2010 között posztdoktor időszakot töltött az aktin kutatás egyik vezető biokémiai műhelyében (CNRS, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Franciaország). Több ösztöndíj és pályázat nyertese (EMBO long-term fellowship, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, PTE junior Szentágothai Díj, PAB Tudományos Díj). Kutatócsoportja rendszeresen vesz részt és mutatja be eredményeit a Magyar Biokémiai Egyesület és a FEBS rendezvényein.



### Tózsér József, tag

Tózsér József, biokémikus, az MTA doktora, a Debreceni Egyetem ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének intézetvezető professzora (2013-), a Debreceni Egyetem egyik rektorhelyettese (2017-). 130 közleménye jelent meg nemzetközi folyóiratokban, melyekre eddig mintegy 5400 hivatkozást kapott, h-indexe 41 (Google Scholar adatok). Témavezetésével eddig 11 hallgató szerzett PhD fokozatot. 1985 óta MBKE tag, 1995-2006 között az IB tagja volt, mint területi képviselő. Részt vett az 1993-ban Debrecenben megrendezett első nemzetközi MBKE konferencia és a 2007-es Vándorgyűlés szervezésében, a 2014-es Vándorgyűlés főszervezője volt. 2015-2020 között az MBKE felügyelő bizottságának tagja.

## ETIKAI BIZOTTSÁG

**Fésüs László, elnök**

Fésüs László Széchenyi díjas biokémikus, egyetemi tanár, a DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének az igazgatója 2013-ig, az MTA rendes tagja, az MTA Biológiai Osztály elnöke (2014-2020). Az egyetem egyesítések után létrejött Debreceni Egyetem első rektora. 1985-től az MBKE vezetőségi tagja, 2005-től 2010-ig az Egyesület elnöke. 2012-2020 között a FEBS „Executive Committee” tagja és a „Publication Committee” elnöke. Az MTA Tudományetikai Bizottság elnöke 2008-2014 között. Az All European Academies (ALLEA) Tudományetikai Bizottság tagja 2010-től, a „European Code of Conduct for Research Integrity” egyik szerkesztője.

**Ovádi Judit, tag**

Ovádi Judit, biokémikus, az MTA doktora. 1967-ben a Karolina úti Straub Intézetben kezdett dolgozni; kutatómunkája mindvégig az MTA Enzimológiai Intézethez kötötte. Több évet töltött posztdoktorként és vendégprofesszorként az USA, Spanyol- és Olaszország egyetemein. A 80-as években alapította meg Sejtarchitektúra Kutatócsoportját, melyet jelenleg professzor emerita-ként vezet. Kutatási területe: „Microtubule-Associated Proteins with Regulatory Functions by Day and Pathological Potency at Night”. Több nemzetközi kutatás résztvevője és irányítója; számos európai és tengerentúli országban rendezett kongresszus meghívott előadója. Évtizeden át a FEBS Letters és más nemzetközi folyóirat editorja. BSc, MSc és PhD hallgatóinak száma mintegy 50. Közleményeinek száma: 212, melyekre 5500 hivatkozást kapott (h-indexe 41). 2015-ben az MTA elnöke Eötvös koszorúval (életmű díj) tüntette ki. Megalakulása óta tagja az MBKE-nek.

**Vígh László, tag**

Vígh László 1986-tól vezet önálló kutatócsoportot (Molekuláris Stresszbiológia Csoport) az SZBK Biokémiai Intézetében. 1991-ben védte meg a biológiai tudományok doktora címet. 1994-2003 között az SZBK Biokémiai Intézetének igazgatója. Vendégprofesszor volt a párizsi Pierre és Marie Curie Egyetemen, a Texasi Állami Egyetemen Austinban, az Okazaki National Institute of Basic Biology kutató központban Japánban, illetve legutóbb a Kaliforniai Egyetemen, Santa Cruzban (UCSC). 2004-től az MTA levelező, majd 2010-től rendes tagja. 2005-ben a Szegedi Tudományegyetemen címzetes egyetemi tanár kinevezést kapott. 1997-2003 között egy amerikai-magyar gyógyszerkutató-fejlesztő vállalat (Biorex Rt.) Igazgatóságának tagja. 1998-ban Vígh László nevéhez köthető az ún. „membrán termoszenzor” hipotézis megalkotása, illetve számos, azt igazoló tudományos eredmény publikálása. 2012-ben Gábor Dénes Díjban, 2018-ban az MBKE Tankó Béla életmű díjában részesült.

**FELHÍVÁS**

A Biokémia folyóirat szerkesztőbizottsága fontosnak tartja, hogy az MBKE tagjai értesüljenek tagtársaik kiemelkedő tudományos eredményeiről. A korábbi évekhez hasonlóan a márciusi lapszámban megjelentetjük a kiemelkedő közlemények listáját. Kérjük, hogy küldjék be:

***a 2020-ban a FEBS Letters, FEBS Journal, FEBS Open Bio, Molecular Oncology, TIBS, IUBMB Life, FASEB Journal újságokban megjelent, valamint IF > 8 (a 2019/2020-as SCI szerinti) cikkek listáját.***

**Beküldési határidő:  
2021. február 15.**

A listát Szűcs Mária főszerkesztőnek kérjük beküldeni a [szucs.maria@brc.hu](mailto:szucs.maria@brc.hu) e-mail címre.

## ALAPÍTVÁNY A TUDOMÁNYOS SZEMÉSZETÉRT FELHIVÁSA

Az alapítvány célja a szemészeti biokémia, illetve retinakutatás terén kifejtett tudományos tevékenység segítése, további eredmények elérésének ösztönzése továbbá a tudományos eredményt elért orvosok és kutatók elismerése pénzjutalommal és emléklappal.

Az alapítvány nyitott, a csatlakozók vagyoni hozzájárulásukkal, támogathatják az alapítványt.

A díjra pályázni lehet biokémiai vagy szemészeti élettani kutatómunka, illetve retinakutatás alapján készített, az elmúlt évben megjelent magyar vagy idegen nyelven publikált tudományos dolgozattal. A pályázó a pályázati határidő lejártakor nem lehet több 35 évesnél.

A beérkező pályázatokat a Kuratórium elbírálja és 2021-ben 2 díjat oszt ki: **szemészeti (retinakutatás) és biokémiai témában**. A díjakat és az okleveleket a Magyar Szemorvostársaság Kongresszusán adjuk át.

**A pályázatok beadási határideje: 2021. április 30,  
Prof. Dr. Janáky Márta, SZTE ÁOK Szemészeti Klinika,  
6720 Szeged, Korányi fasor 10-11 címre.**

*Prof. Dr. Janáky Márta  
az Alapítvány a Tudományos Szemészetért  
Kuratórium elnöke*