

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLV. évfolyam 3. szám

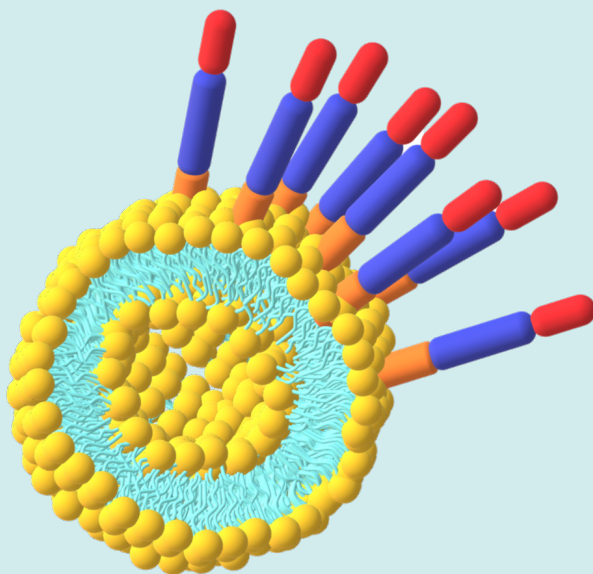
2021. szeptember

TFR123-epitóp

N-terminális

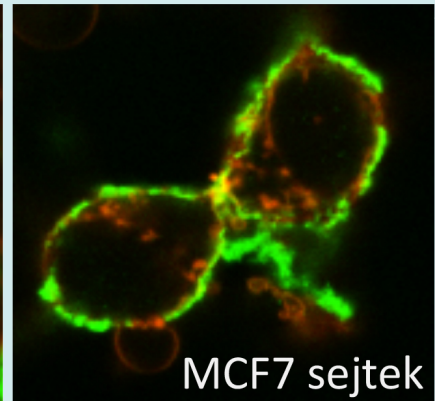
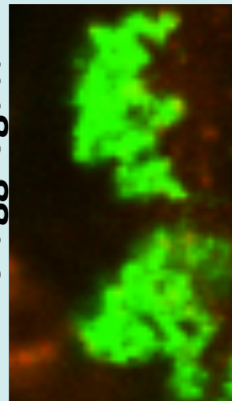


C-terminális



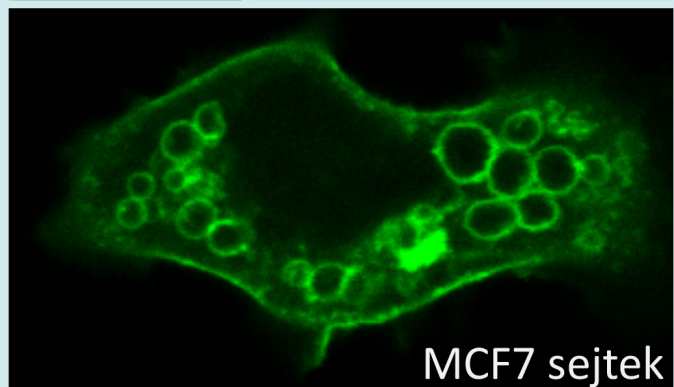
Liposzóma + TFR123-epitóp polimer

TFR123 aggregátum



TFR123-polimer

MCF7 sejtek



TFR123-GFP

MCF7 sejtek

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

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

Főszerkesztő:

Szűcs Mária

szucs.maria@brc.hu

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter

info@remekdesign.hu

XLV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM

2021. szeptember

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: A TFR123-Covid immunizációs platform. TFR123-epitóp: A TFR123 domén szerkezete, LBD: Lipidkötő Domén, OD: Oligomerizációs Domén, -GG-= Glicin-Glicin. TFR123-polimer: A TFR123 irányított oligomerizációja liposzómák és MCF7 sejtek felszínén. TFR123-GFP: A TFR123-pEGFP-N3 konstrukció transzdomináns expressziója MCF7 sejtekben. TFR123 aggregátum: A TFR123 polimerizáció gátlása a hidrofób módosítás mellőzésekor (lásd Tapodi cikk, 9. ábra, 21. oldal).

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak 3.

HAZAI TUDOMÁNYOS MŰHELYEK

Szatmári István: Immunsejtek újratervezése transzkripciós faktorokkal
- álom vagy valóság? 4.

REVIEW

Tapodi Antal: Extrém rövid antigén epitópok prezentációjára alkalmas
új immunizációs platformok fejlesztése és COVID-19 vakcinációra
történő tesztelése 14.

TUDOMÁNYOS CIKK

Bognár Zita: Dezetil-amiodaron: egy antiaritmiás gyógyszer
metabolitjának tumor-terápiás hasznosítási lehetősége 29.

ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL

Felhívás 46.

Lista 47.

Közlemények 54.

KONFERENCIA FELHÍVÁS

HADDOCK Workshop, Budapest, 2022. 64.

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 2021. JÚNIUS 15. ÉS 2021. SZEPTEMBER 15. KÖZÖTT

A **Magyar Érdemrend tisztikeresztje polgári tagozata** kitüntetést kapta **Székács András** vegyész-mérnök, az MTA doktora, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettudományi Intézetének igazgatóhelyettese, Környezetanalitikai és Környezettechnológiai Tanszékének vezetője, a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézetének igazgatója, tudományos tanácsadója a Magyarországon kapható élelmiszerek GMO-mentességének fenntartása érdekében végzett kiemelkedő munkája, a mezőgazdasági technológiák kémiai és genetikai biztonságát érintő kutatói, valamint jelentős oktatói és tudományos-szakmai közéleti tevékenysége elismeréseként.

Az **Élettani Tudományok Nemzetközi Szövetsége** (International Union of Physiological Sciences, IUPS) 2021-ben alakult akadémiaja, az IUPS Academy of Physiology első 30 tagja közé választotta **Hunyady Lászlót**, az MTA rendes tagját.

Nemzetközileg kimagasló teljesítményű fiatal kutatók kezdhetik meg az MTA Lendület Programjának támogatásával áttörő eredményeket ígérő kutatásaikat hazai kutatóhelyeken.

Lendület I. támogatást (38 évnél fiatalabb, kiemelkedő és folyamatosan növekvő teljesítményt mutató kutatók) kapott:

- **Horváti Kata** (ELTE) Peptid alapú vakcinák: új formulációs stratégiák

Lendület II. támogatást (nemzetközileg is elismert, tartósan kiemelkedő és növekvő teljesítményű vezető, 45 évnél fiatalabb kutatók):

- **Szöllősi Gergely János** (ELTE) Genomok mint a nagy evolúciós átmenetek dokumentumai

Az **MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj** nyertesei:

- **Balogi Zsolt** PTE, AOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

- **Bognár Zita** PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

- **Csizmadia Tamás** ELTE, TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődés biológiai Tanszék

- **Lőrincz Péter** ELTE, TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

IMMUNSEJTEK ÚJRATERVEZÉSE TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROKKAL - ÁLOM VAGY VALÓSÁG?

Szatmári István
Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
szatmari@med.unideb.hu



1997-ben a Kossuth Lajos Tudományegyetemen szereztem biológus (molekuláris biológia szakirány) diplomát. Szakdolgozóként és PhD tanulmányaim során is a DOTE/Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben Aradi János témavezetésével dolgoztam. Jánossal új telomeráz mérési módszereket fejlesztettünk ki. A PhD fokozat megszerzését

követően 2001-től tanársegédként, majd adjunktusként ugyanebben az Intézetben Nagy László Endokrinológiai Munkacsoportjában folytattam a kutatást, ahol a PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) és retinsav receptorok hatásait tanulmányoztuk immunsejteken. Posztdoktori kutatásaimat Michael Kyba Laboratóriumában (University of Minnesota, USA) folytattam 2007 és 2010 között. Michael munkacsoportjában a Hox gének hatásait teszteltük pluripotens őssejtekből származó vérképző sejteken. 2010-ben tértem haza Magyarországra a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetbe, ahol lehetőséget kaptam az Őssejt Munkacsoport megalapítására. Kutatócsoportunk leginkább a pluripotens őssejtekből létrehozott immunsejtek transzkripciós átprogramozását vizsgálja. 2012-től egyetemi docensnek neveztek ki; 2016-tól tagja vagyok a Magyar Biokémiai Egyesület Intéző bizottságának mint debreceni területi képviselő. Mindezen túlmenően 2018-tól irányítom az Intézetünk által működtetett Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumot.

Sejtsorsok átírása

Az általam vezetett munkacsoport tehát immunsejtek fejlődésének módosításával, divatos kifejezéssel a sejtek átprogramozásával foglalkozik. Elsőként felvázolom, mit értünk a sejtek átprogramozása alatt, ezen a téren meddig jutott a tudomány. Az utóbbi évtizedben lehetővé vált emlős sejtek részleges vagy teljes átalakítása, aminek során gyakorlatilag meg lehet „hackelni” a sejtek fejlődését és specificitását. Ennek a koncepciónak - túl azon, hogy feszegeti a fejlődésbiológia határát – komoly gyakorlati haszna is van, hiszen a módosított sejtek eszközei lehetnek a sejterápiának. Erre példa az úgynevezett CAR-T-sejtek, melyek mesterségesen létrehozott kiméra antigén receptorokat (CAR)

hordoznak, melyek segítségével a receptorra specifikus antigént tartalmazó sejtekhez kötődnek. A célsejtekhez kapcsolódást követően a kiméra receptor aktiválni fogja magát a citotoxikus tulajdonságú CAR-T-sejteket, melyek így képesek szelektíven eliminálni az antigént tartalmazó sejteket. A klinikai gyakorlatban CD19 ellenes CAR-T-sejtekkel a CD19 antigént hordozó B-sejteket sikerült hatékonyan elpusztítani, ezáltal gyógyíthatóvá vált a B-sejtes limfómák több altípusa [1]. Ennél a példánál a citotoxikus sejtek specificitását a kiméra antigén receptor beépítésével lehetett megváltoztatni.

Ugyanakkor, bizonyos transzkripciós faktorokkal radikálisabban is át lehet alakítani a sejtek tulajdonságait. Ismert, hogy sejtvonalspecifikus transzkripciós faktorok szabályozzák a sejtek differenciálódását és identitását. Ha ezeket a faktorokat reaktiváljuk, vagy valamilyen génexpressziós rendszerrel visszakapcsoljuk, akkor az adott sejt fejlődése és tulajdonságai módosíthatók. Ennek a koncepciónak a legismertebb példája a pluripotens őssejtek létrehozása differenciált szomatikus sejtekből. Shinya Yamanaka munkacsoportja kimutatta, hogy négy őssejt specifikus transzkripciós faktor bekapcsolásával differenciált emlőssejtek (pl. fibroblasztok) visszaalakíthatók indukált pluripotens őssejteké (iPS sejtekké), melyek a klasszikus embrionális őssejtekhez (ES sejtekhez) hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek [2]. Az így létrehozott iPS sejtekből tetszőleges szomatikus sejt típus, például szívizom, máj- vagy akár idegsejtek is differenciálthatók. A későbbiekben mások azt is leírták, hogy nemcsak vissza lehet alakítani a szomatikus sejteket (dedifferenciáció), hanem más kulcs transzkripciós faktorokkal az emlős sejtek egymásba át is alakíthatók (transzdifferenciáció) [3]. Megfelelő génszabályozó faktorokkal például fibroblaszt sejtek közvetlenül átkonvertálhatók szívizomsejtekké, idegsejtekké vagy akár májsejtekké is. Ezek a felfedezések teljesen új perspektívát hoztak a fejlődésbiológiában, napjainkra az emlős sejtek normál fejlődése nagymértékben átírható vagy akár vissza is fordítható. Ugyanakkor ezen a területen számos ellentmondásos (nehezen reprodukálható) kutatási eredmény is született. Továbbá, részletes genomikai vizsgálatokkal az is kiderült, hogy az átalakított emlőssejtek génexpressziós mintázata nem teljesen azonos az élő szervezetben megtalálható hasonló típusú sejtekével, többek között olyan gének is aktív állapotban maradhatnak, melyek a kiindulási sejtekre jellemzőek [4]. Mindezek miatt a sejtprogramozás továbbra is kihívást jelent a kutatók számára, semmiképp nem tekinthető lezárt és befejezett történetnek. A következő alfejezetben azt fogom bemutatni, hogy a posztdoktori kutatásaim miként sodortak a sejtprogramozás irányába.

Sejtek fejlődésének szabályozása hormonreceptorokkal és Hox génekkel

2001-ben a PhD fokozat megszerzését követően Nagy László munkacsoportjába kerültem, ahol a nukleáris hormonreceptorok (magreceptorok) tanulmányozásába kapcsolódtam be. A magreceptorok ligandfüggő transzkripciós faktorok, számos anyagcsere folyamatot képesek szabályozni, de bizonyos immunsejtek differenciációját és aktivitását is modulálják. Kutatómunkám során perifériás vérből származó dendritikus sejtek (DC-k) differenciálódását tanulmányoztuk PPARgamma és retinsav receptorok (RAR) aktivitásának szabályozásán keresztül. A DC-k az immunrendszer karmesterei, több-kevesebb sikerrel tumorelles immunterápiában is használják őket, mivel képesek elindítani a daganat antigének ellen az immunválaszt. Ugyanakkor ezen immunsejtek aktivitása és immunmoduláló hatása számtalan külső és belső tényezőtől függ, többek között magreceptorok is képesek ezt befolyásolni. A monocita eredetű DC-k kialakulása során bekövetkező génexpressziós változásokat mRNS transzkriptek szintjén próbáltuk nyomon követni. Ebben hatalmas segítséget jelentett a DNS CHIP technológia elterjedése, éppen ebben az időszakban kerültek bevezetésre az Affymetrix microarray-ek, melyekkel fel lehetett térképezni e primer sejtek globális génexpressziós profilját. Ezek a vizsgálatok számos új célgén és útvonal azonosításához vezettek, s közben sikerült feltárni, hogy e receptorok hogyan befolyásolhatják a humán DC-k immunogenitását [5].

2007 végétől lehetőségem nyílt az Egyesült Államokban, Michael Kyba laboratóriumában (University of Minnesota) folytatni a kutatómunkámat, ahol szintén a sejtek differenciálódását vizsgáltuk, de a fókuszterület itt már az embrionális őssejtekből keletkező vérképző sejtek fejlődése volt. Michael laboratóriumában leginkább a Hox (homeobox) gének hatásait teszteltük kémiai indukálható egér ES sejt vonalak felhasználásával. Ezek a transzgenikus sejtek úgy működnek, hogy tetraciklin vagy doxiciklin kezelést követően a beépített gén kifejeződik (Tet-On rendszer), ezáltal szabályozott módon tetszőleges proteinek tudunk a sejtekben termelni. E munka során a Hox gének és a retinsav receptorok kapcsolatát vizsgáltam, illetve itt is részt vettem globális génexpressziós elemzésekben [6, 7].

Mindezzel a háttérrel 2010-ben lehetőséget kaptam a Debreceni Egyetemen az Őssejt Kutatócsoport megalapítására. Az újonnan létrejött laboratóriumban megpróbáltuk ötvözni a korábbi témaköröket, fő célkitűzésünk DC-k előállítása

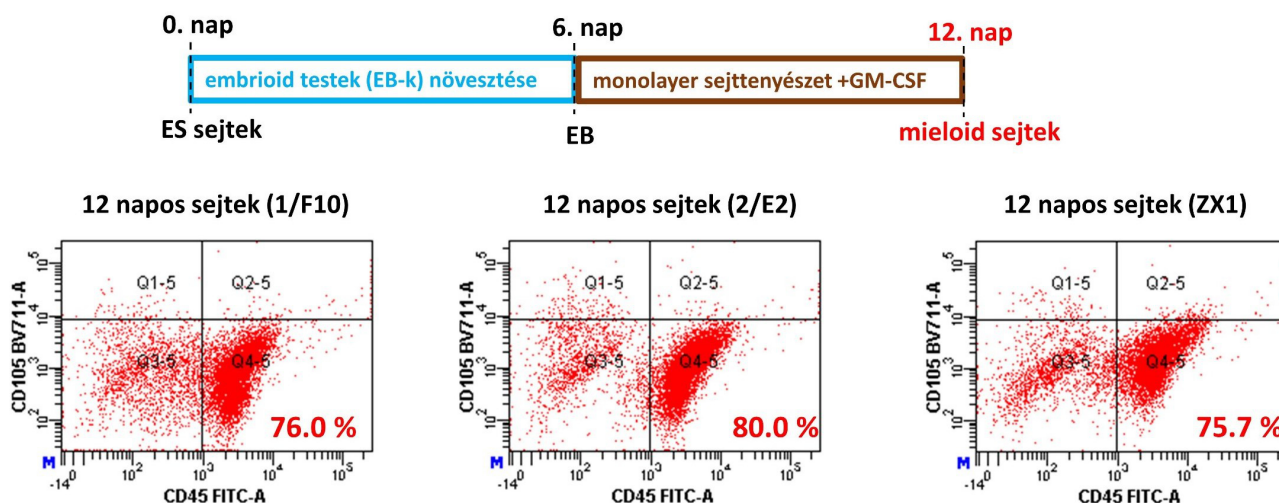
pluripotens őssejtekből, s közben tanulmányozzuk a kulcs transzkripciós faktorok hatásait.

Dendritikus sejtek generálása pluripotens őssejtekből

A kétezres évek elején több olyan publikáció is megjelent, melyben sikerrel differenciáltattak ex vivo DC-eket ES sejtekből [8]. A korlátlan osztódási kapacitással rendelkező pluripotens ES sejtekből kiindulva nagy mennyiségű DC-t lehet kitermelni, ami fontos szempont az ilyen sejtek terápiás alkalmazása során. Ugyanakkor az is kiderült, hogy a pluripotens őssejtekből létrehozott DC-k antigén prezentáló képessége, illetve T-sejt aktiváló kapacitása nem mindig egyenértékű a felnőtt sejtforrásból (monocitákból vagy csontvelői sejtekből) differenciáltatott sejtekkel. Munkacsoportunk is megfigyelte, hogy az ES sejtekből létrehozott DC populációban LPS (lipopoliszacharid) kezelés hatására lényegesen alacsonyabb volt a CD80, CD86 és a MHCII (major histocompatibility complex II) pozitív sejtek aránya, ami azt jelzi, hogy ezek a sejtek kevésbé tekinthetők érett, funkcionális formáknak [9]. Emellett az találtuk, hogy az Spi-b (Spi-1/Pu.1 related gene), Irf4 (interferon regulatory factor 4) és Runx3 (Runt-related transcription factor 3) transzkripciós faktorok expressziója alacsonyabb volt az ES sejtekből differenciáltatott DC-kben, összevetve a csontvelő eredetű progenitorokból létrehozott sejtekkel. Mindez arra utal, hogy a pluripotens őssejt eredetű immunsejtekből néhány kulcsfaktor hiányzik, vagy legalábbis kevésbé expresszálódik, ami befolyással lehet a sejtek tulajdonságaira. Feltételezhető, hogy ha reaktiváljuk a hiányzó transzkripciós faktorokat, akkor tovább lehet fokozni a DC-k aktivitását és immunogenitását. Munkatársaimmal megpróbáltuk indukálni a különféle DC specifikus transzkripciós faktorokat az ES sejtekből létrehozott prekurzorokban és meghatározni, hogy ezek jelenlétében hogyan változik a sejtek fenotípusa. Mi tehát nem terveztük a sejtek differenciálódását teljesen átírni, csak finomhangolni szerettük volna az átalakulási folyamatokat. Ennek a megvalósításához a korábban már említett, doxiciklinel indukálható, genetikailag módosított egér ES sejt vonalakat használtunk. Ezekből olyan ES sejt klónokat hoztunk létre, melyek DC specifikus transzkripciós faktorokat fejeznek ki doxiciklin kezelés hatására. Ez az expressziós rendszer elvileg úgy működik, hogy az összes sejtben kifejeződik a transzgén, ha a kémiai induktorral kezeljük a sejteket. A gyakorlatban viszont kiderült, hogy a beépített transzgén indukálhatósága közel sem 100%-os, ezt a jelenséget GFP (zöld fluoreszcens protein) és mCherry reporter géneket indukálni képes sejtklónokon is megfigyeltük. A heterogén expressziót a transzgenikus régió repressziója

(silencing), illetve folyamatos antibiotikum szelekció nélkül a nem transzgenikus sejtek túlnövése okozhatja. Mindezek miatt utólagos kémiai szelekcióval optimalizáltuk ezt az indukálható rendszert, a megfelelő mértékű transzgen expresszió elérése céljából [10].

A szuboptimális génindukción túlmenően, sok gondunk volt a vérképző sejtek fejlődésének alacsony hatásfoka miatt is. A korábban már leírt, általunk is használt OP9 dajka sejtek segítségével végrehajtott ES sejt differenciálási protokoll [11] esetén a sejteknek csak kis százaléka alakult át vérképző formává. Emiatt az utóbbi években kidolgoztunk egy OP9 sejtektől független differenciálási eljárást, mely során elsőként háromdimenziós sejtaggregátumokat (embrioid testeket) növesztettünk, majd az ezekből kinyert sejteket differenciáltattuk tovább mieloid sejtek fejlődését elősegítő tápfolyadékban. Ezzel a protokollal 5-30% helyett a kiindulási sejtek 30-90%-a alakult át mieloid vérképző sejtekké (1. ábra).



1. ábra. Mieloid sejtek hatékony differenciálása egér pluripotens őssejtekből. Az általunk nemrégiben kidolgozott protokoll során az ES sejtekből hat nap alatt embrioid testek jönnek létre. Ezt követően a sejteket kinyerjük és továbbtenyésztjük GM-CSF (granulocita-makrofág kolonia-stimuláló faktor) tartalmú tápfolyadékban. Ezzel az eljárással különféle ES sejtklónokból (1/F10, 2/E2, ZX1) kiindulva, hasonlóan magas arányban kaptunk CD45+ mieloid sejteket.

Természetesen az optimalizálásokkal párhuzamosan intenzíven teszteltük a különféle DC specifikus transzkripciós faktorok hatásait. A legizgalmasabb eredményeket a Runx3, illetve a Zbtb46 (zinc finger and BTB domain containing 46) proteinek jelenlétében kaptuk, a következőkben ezeket az adatokat ismertetem.

Két protein, kétféle hatás: Runx3 és Zbtb46

A Runx3 transzkripciós faktor többféle immunsejt fejlődését szabályozza, többek

között ez a faktor szükséges a citotoxikus CD8+ T-sejtek létrejöttéhez. Szintén ez a fehérje nélkülözhetetlen egy speciális DC altípus, az úgynevezett Langerhans sejtek kialakulásához [12]. Ahogy korábban említettem, megfigyeltük, hogy a Runx3 lényegesen kisebb mennyiségben van jelen az ES sejt eredetű DC-kben összevetve a felnőtt csontvelőből létrehozott sejtekkel. Emiatt ez a gén is benne volt abban a szűkített listában, melyről feltételeztük, hogy módosítani tudja a DC-k sajátságait. Vizsgálataink feltárták, hogy Runx3 indukciója esetében a CD80/MHCII dupla pozitív sejtek aránya jelentősen megemelkedett, továbbá azt találtuk, hogy az LPS-sel kezelt mintákon a CD86 pozitív sejtek aránya is magasabb volt a Runx3-al átprogramozott sejtekben [9]. Fontos kiemelni, hogy nem csak a sejtfelszíni markerek mintázata változott meg: a Runx3 aktivált DC-k erőteljesebb migrációs képességgel is rendelkeznek. A sejt vándorlás fontos tulajdonsága a DC-knek, hiszen a begyűjtött antigénekkal együtt a perifériáról el kell jutniuk a nyirokcsomókba, ahol ki tudják váltani a naiv T-sejtek aktivációját. Ezzel összhangban azt is megfigyeltük, hogy a Runx3-mal átprogramozott DC-knek emelkedett T-sejt aktiváló kapacitásuk van [9]. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a Runx3 transzkripciós faktor pozitívan befolyásolja ES sejtekből létrehozott DC-nek mind a fenotípusát, mind a funkcionális tulajdonságait. Ha ezt a transzgént bekapcsoljuk, akkor olyan antigén prezentáló sejtek keletkeznek, melyek erőteljesebben képesek az immunválaszt fokozni, így feltételezhetően terápiás célból is hasznosíthatók lehetnek.

A DC fejlődés módosításához természetesen nemcsak a Runx3 proteint teszteltük, hanem számos más DC, illetve makrofág specifikus transzkripciós faktort is. Arra számítottunk, hogy a többi alacsony expressziót mutató transzkripciós faktor is hasonló pozitív hatást fog kifejteni a DC fejlődésre. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb géntermék túltermelése negatív hatással volt a sejt differenciációra, különösen a mieloid sejtek kialakulása szenvedett zavart. Ez a megfigyelés nem teljesen meglepő, hiszen az indukált sejtekben egy-egy transzkripciós faktor viszonylag magas szinten termelődik, ami számos endogén génregulációs szabályozó kört módosíthat, ezáltal a sejtfejlődés blokkolódhat, vagy más irányba terelődik. A szupresszív sajátságot mutató transzkripciós faktorok közül a Zbtb46 protein mutatta a legerőteljesebb gátló hatást. A Zbtb46 proteinnél kimutatták, hogy a konvencionális DC-k specifikus markere. Viszont az is kiderült, hogy ez a protein nemcsak DC-kben, hanem endotél sejtekben, továbbá eritroid progenitorokban is expresszálódik [13]. Ez arra utalhat, hogy ez a transzkripciós faktor a korai vérképzés

szabályozásában is szerepet játszhat. Mindemellett erre a proteinre is igaz, hogy alacsony expressziót mutat az ES sejtekből létrehozott DC-kben, illetve ezek előalakjaiban. Ezek a megfigyelések arra sarkalltak minket, hogy tüzetesen megvizsgáljuk ennek a faktornak a hatásait az ES sejtek differenciálódása során. Megfigyeltük, hogy Zbtb46 indukció hatására jelentősen lecsökkent a CD45/CD11b pozitív mieloid sejtek aránya, sőt az ES sejtek differenciálódásának korai fázisában a mezodermális sejtfejlődés is zavart szenvedett. Ezen túlmenően Zbtb46 jelenlétében lassabbá vált a sejtek osztódása. Ezzel lehet összefüggésben az a megfigyelésünk, hogy a Zbtb46-tal átprogramozott sejtekben megváltozott a sejtciklus profilja, megemelkedett a G2/M fázisban lévő sejtek aránya [14].

Annak érdekében, hogy feltérképezzük milyen transzkripciós hatást fejt ki a Zbtb46, genomikai megközelítést alkalmaztunk. Összehasonlítottuk a Zbtb46 indukció jelenlétében és anélkül a mieloid fejlődési irányban elindított mezodermális sejtek globális génexpressziós profilját RNS szekvenálással. Összhangban a gátló hatással, lényegesen több transzkript represszálódott, mint amennyi indukálódott. A negatívan szabályozott gének között nagy számban voltak jelen a vérképzést és az immunsejtek fejlődését szabályozó gének. Ezek közül fehérje szinten is megvizsgáltuk az Irf8 (interferon regulatory factor 8) transzkripciós faktort, aminek a termelődése erőteljesen gátlódott Zbtb46 jelenlétében [14]. Az Irf8 transzkripciós faktor fontos szabályozója a mieloid immunsejtek fejlődésének. Ez arra utalhat, hogy ennek a proteinnek a negatív szabályozása közvetlenül hozzájárulhat a mieloid sejtek csökkent képződéséhez. Ugyanakkor felmerül a kérdés, ha nem mieloid irányba differenciálódnak a sejtek, akkor mi történik velük. Érdekes módon azt is megfigyeltük, hogy a felnőtt vörösvérsejtekre jellemző béta-hemoglobin gén (Hbb-B1) erőteljesebben expresszálódik a Zbtb46-al átprogramozott korai progenitorokban. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy nagyobb számú eritroid sejt kolónia képződött vörösvérsejtek képződését is elősegítő médiumban tenyésztve a sejteket [14]. Mindez arra utal, hogy Zbtb46 jelenlétében az eritropoezis kerül előtérbe az ES sejtekből létrehozott hematopoetikus előalakokban, miközben a mieloid sejtek fejlődése represszálódik. A fokozott eritroid fejlődést az is alátámasztja, hogy a Zbtb46 indukált korai progenitorokban magasabb volt a CD105+ sejtek aránya. A CD105 (Endoglin) eritroid progenitorokban is expresszálódik, illetve mások kimutatták, hogy ES sejtéből differenciáltatott mezodermális sejtekben a CD105 indukció esetében fokozódik a vörösvérsejtek képződése [15]. Feltételezhető, hogy Zbtb46

radikálisan megváltoztatja a korai vérképző sejtek ex vivo fejlődését és elősegíti a felnőtt vörösvérsejtekre jellemző hemoglobin termelését.

Korlátok és kitörési pontok a sejtprogramozás során

Az előzőekben ismertetett két példa illusztrálja, hogy akár egyetlen transzkripciós faktoral is jelentősen módosítani lehet az ES sejtek differenciálódását. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a legtöbb DC specifikus transzkripciós faktor bekapcsolását követően alig láttunk változást. Nyilván azt is figyelembe kell venni, hogy a sejtekben egyszerre rengeteg transzkripciós faktor működik. A humán gének 8%-a kódol transzkripciós faktorokat, ebből az 1600-1800 proteinből sejt típusonként több száz fejtheti ki a hatását. Ráadásul a tesztelni kívánt faktor hatása attól is függ, mennyire nyitott vagy zárt az adott kromatin régió, illetve függ a sejtekben jelenlévő génszabályozó fehérje komplexek (pl. koaktivátor, korepresszor, illetve kromatin átalakító komplexek) milyenségétől és arányától. Mindezek miatt az eddig leírt sejt konverziók leginkább több transzkripciós faktor együttes kifejeződése esetén dokumentálhatók [3]. Az általunk használt ES sejt vonalakba is be lehet építeni policisztronikus DNS elemeket, amivel akár több transzgen is indukálható (a Runx3-at már sikerült más proteinnel együtt expresszálni). Ugyanakkor ma még szinte lehetetlen megjósolni, hogy mely faktorok kombinációja fog additív vagy esetleg szinergista hatásokat kiváltani. Virális vektorrendszerek sokkal alkalmasabbak kombinatorikus vizsgálat sorozat kivitelezésére, mint az általunk használt helyspecifikus rekombinációval létrehozott, kémiai indukálható sejtek. A sokféle kombinációs lehetőség kipróbálása helyett jelenleg inkább egy-egy faktor hatását próbáljuk feltérképezni, még annak árán is, hogy a detektált változás kevésbé radikális. Mivel ezek az ES sejt vonalak szinte bármilyen irányban képesek fejlődni, ha nincs eltérés a vizsgált differenciáció során, akkor más citokinek, illetve egyéb szignál molekulák jelenlétében tanulmányozzuk az adott transzgen indukciót. Sőt arra is lehetőség van, hogy teljesen más irányú differenciáltatás (pl. neurogenesis) esetén monitorozzuk a kiválasztott fehérje hatását.

A transzgenek túltermelése esetén felmerülhet, hogy a megfigyelt hatások nem fiziológiasak, illetve az így kapott eredményeknek nem sok közük lehet a normál sejtfejlődéshez. Ez részben igaz, ugyanakkor a szabályozott génexpresszió során a doxiciklin dózissal is tudjuk modulálni a protein szintet, ami ezáltal hasonlóbb lehet az endogén expresszióhoz. További lehetőségként időben késleltetve csak a sejtfejlődés adott fázisában bekapcsolva a transzgent közelebb juthatunk a normál folyamatok mimikálásához. Másrészt a sejtek

átprogramozása során nem kell feltétlenül utánozni az in vivo folyamatokat. Napjainkban az immunterápia céljából egyre merészebb sejtátalakításokat, illetve egyre szofisztikáltabb kimérareceptorokat terveznek, ezeknek nem sok köze van a fiziológias sejtműködéshez, de terápiás célból az ilyen sejtek is hatásosak lehetnek.

Végezetül választ kellene adni a címben feltett kérdésre: tudunk-e funkcionális sejteket újratervezni transzkripciós faktorokkal? Tetszőleges tulajdonsággal rendelkező sejtek, szövetek, organoidok tervezése és gyártása inkább álom, mint valóság. A legtöbb sejtátalakítás sok-sok protein tesztelése során véletlenszerűen kapott transzkripciós faktor kombináció segítségével valósítható meg. Ráadásul alig ismerjük a génszabályozó faktorok által iniciált sejtátalakulás folyamatának a molekuláris és epigenetikai mechanizmusát. Ugyanakkor az általunk használt egyfaktoros sejtprogramozás relatív egyszerűsége miatt alkalmasabb lehet a molekuláris mechanizmusok feltárásához, különösen transzkriptomikai, illetve egyéb omikai vizsgálatok igénybevételével. A mechanizmusok jobb megértését követően racionálisabban tudunk majd kiválasztani olyan proteineket, melyekkel terápiás potenciállal bíró sejteket lehet majd létrehozni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom három mentoromnak, akik megtanították és megszerettették velem a kutatómunkát. Aradi János (vegyész), Nagy László (kutatóorvos), Michael Kyba (biológus) kicsit más-más szemlélettel mutatták meg a tudományos kutatás alapjait és kifutásait. Továbbá hálás vagyok tanítványaimnak és munkatársaimnak, akikkel sikerült létrehozni és működtetni az Őssejt Laboratóriumot. Külön kiemelném Simó Emília, Botó Pál, Takács Erika, Gerzsenyi Tímea, Lengyel Adél és Mező Irén munkáját, akiknek oroszlánrészük volt az itt bemutatott eredmények létrehozásában.

Irodalomjegyzék

- [1] Lim, W.A., June, C.H. (2017) The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*, **168**: (4) 724-740.
- [2] Yamanaka, S. (2012) Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, **10**: (6) 678-684.
- [3] Xu, J., Du, Y., Deng, H. (2015) Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell*, **16**: (2) 119-34.
- [4] Cahan, P., Li, H., Morris, S.A., Lummertz da Rocha, E., Daley, G.Q., Collins,

- J.J. (2014) CellNet: network biology applied to stem cell engineering. *Cell*, **158: (4)** 903-915.
- [5] Szatmari, I., Nagy, L. (2008) Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J*, **27: (18)** 2353-62.
- [6] Iacovino, M., Chong, D., Szatmari, I., Hartweck, L., Rux, D., Caprioli, A., Cleaver, O., Kyba, M. (2011) HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol*, **13: (1)** 72-8.
- [7] Szatmari, I., Iacovino, M., Kyba, M. (2010) The retinoid signaling pathway inhibits hematopoiesis and uncouples from the Hox genes during hematopoietic development. *Stem Cells*, **28: (9)** 1518-29.
- [8] Senju, S., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Nishimura, Y. (2011) Immunotherapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. *Semin Immunopathol*, **33: (6)** 603-12.
- [9] Takacs, E., Boto, P., Simo, E., Csuth, T.I., Toth, B.M., Raveh-Amit, H., Pap, A., Kovács, E.G., Kobolak, J., Benkő, S., Dinnyes, A., Szatmari, I. (2017) Immunogenic dendritic cell generation from pluripotent stem cells by ectopic expression of Runx3. *Journal of Immunology*, **198: (1)** 239-248.
- [10] Bencsik, R., Boto, P., Szabo, R.N., Toth, B.M., Simo, E., Balint, B.L., Szatmari, I. (2016) Improved transgene expression in doxycycline-inducible embryonic stem cells by repeated chemical selection or cell sorting. *Stem Cell Res*, **17: (2)** 228-234.
- [11] Senju, S., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Masuda, M., Uemura, Y., Araki, K., Yamamura, K., Nishimura, Y. (2003) Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood*, **101: (9)** 3501-8.
- [12] Boto, P., Csuth, T.I., Szatmari, I. (2018) RUNX3-Mediated Immune Cell Development and Maturation. *Crit Rev Immunol*, **38: (1)** 63-78.
- [13] Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Murphy, K.M. (2012) Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med*, **209: (6)** 1135-52.
- [14] Boto, P., Gerzsenyi, T.B., Lengyel, A., Szunyog, B., Szatmari, I. (2021) Zbtb46-dependent altered developmental program in embryonic stem cell-derived blood cell progenitors. *Stem Cells*, **39: (10)** 1322-1334.
- [15] Baik, J., Borges, L., Magli, A., Thatava, T., Perlingeiro, R.C. (2012) Effect of endoglin overexpression during embryoid body development. *Exp Hematol*, **40: (10)** 837-46.

EXTRÉM RÖVID ANTIGÉN EPITÓPOK PREZENTÁCIÓJÁRA ALKALMAS ÚJ IMMUNIZÁCIÓS PLATFORMOK FEJLESZTÉSE ÉS COVID-19 VAKCINÁCIÓRA TÖRTÉNŐ TESZTELESE

Tapodi Antal

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet
antal.tapodi@aok.pte.hu

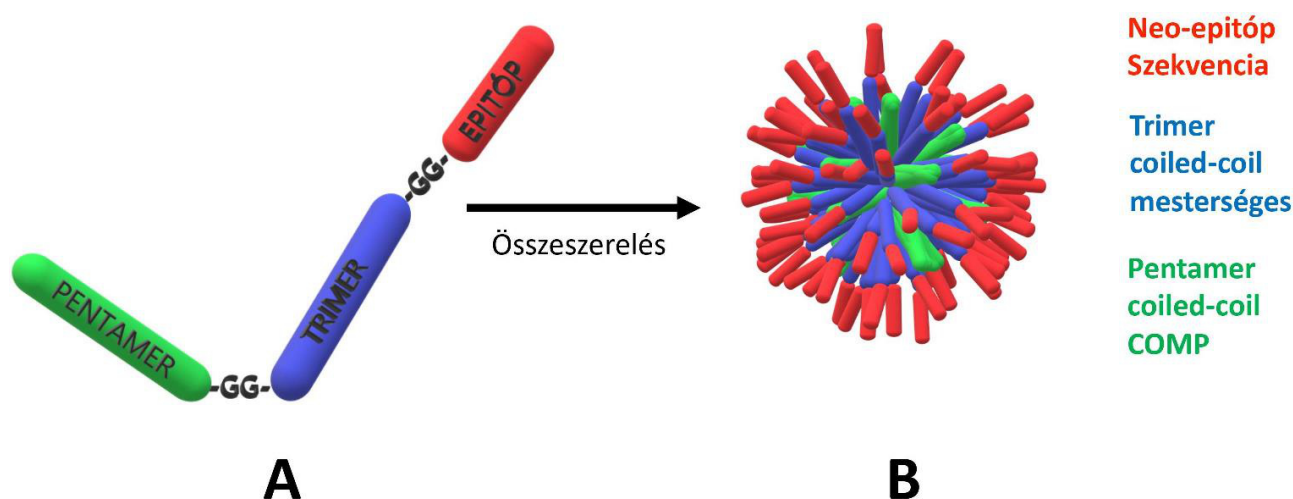
Összefoglaló

A SARS-CoV-2 koronavírus (súlyos akut légzési szindróma-koronavírus-2) okozta megbetegedések új kihívásokkal állítják szembe a tudományos közösséget. A jól bevált vakcina típusok mellett számos új immunizációs platform jelent meg a közelmúltban. Az első generációs COVID-19 vakcinákat - a gyengített koronavírus tartalmazókat leszámítva - szinte kizárólag, ugyanakkor magától értetődően, a SARS-CoV-2 vírus teljes tüskefehérjéje ellen fejlesztették, hiszen az elérni kívánt vírusneutralizációs hatás, a tüskefehérje ACE2 (angiotenzin konvertáló enzim 2) receptorhoz való kötődésének gátlásával valósulhat meg kellően hatékony módon. Kutatócsoportunk új, saját fejlesztésű, immunizációs platformok segítségével hatékony immunválaszt képes indukálni extrém rövid epitóp szekvenciák (9-24 aminosav) ellen. Az aktuális patogén az infekció szempontjából meghatározó, ugyanakkor immunizációs szempontból túlságosan rövid és alul reprezentált szakaszai hatalmas immunogén réteget alakítanak ki az általunk fejlesztett platformok felületén. Az új platformokat természetesen a legaktuálisabb patogén, a SARS-CoV-2 tüskefehérje legrelevánsabb szakaszaival teszteltük sikeresen.

Bevezetés

A kutatócsoport egyik érdeklődési területe az intermediális filamentumok (IF). Ennek a népes sejtváz-alkotó fehérjecsaládnak számos, alaposan vizsgált tagja van: keratinok [1-2], Dezmin [3-4], Vimentin [5-6], laminok [7-8], neuro-filamentumok [9-10]. Ugyanakkor a VI. típusú intermediális filamentumokra, pl. a Filensinre [11-12] Phakininre [13-14] és Nesprinre [15-16] vonatkozó ismereteink jóval limitáltabbak. A Filensin proteolitikus hasítási helyeinek meghatározása, a hasításokért felelős proteázok azonosítása és az így képződött fehérje fragmentumok szerepének feltárása volt korábbi vizsgálataink célja [17-18]. A kevésbé ismert Filensin fehérje kimutatásához szükséges antitestek nem reprezentálták magukat a piacon széles körben, ezért saját, poliklonális anti-Filensin antitesteket készítettünk. A Filensin proteolitikus hasítási mechanizmusának vizsgálatához ún. „neo-epitóp” antitestekre volt szükség. Az ezen

epitóp szekvenciák ellen termelt antitestek lehetőséget biztosítottak a számunkra, hogy a Filensin proteolízisének időbeliségét tanulmányozhassuk [17]. A rövid, „neo-epitóp” szekvenciákat kollaborációs partnerünk által rendelkezésünkre bocsájtott, önmagát összeszerelő „coiled-coil” struktúrájú fehérje nanopartikulumhoz (NP) fuzionáltuk (1.A ábra) [19-20]. A fúziós fehérjék egy „ikozahedron” formájú, vírus-szerű struktúrává oligomerizálódnak speciális pufferek dialízisével (1.B ábra). Ez a fúziós NP-platform, viszonylag nagy mennyiségben, és szerkezetének köszönhetően stabilan exponál „neo-epitóp” szekvenciákat a felületén (1. ábra). Ezzel a fúziós NP-mal immunizáltunk nyulakat és állítottunk elő poliklonális, „neo-epitóp-szelektív” anti-Filensin antitesteket [17]. A hatékonyabb antigén-prezentáció érdekében módosítottuk a NP platform aminosavösszetételét. A módosított NP-platformot NPV370-nek neveztük el, majd a módosításokat szabadalmi oltalommal láttuk el. A NP-platform egy mesterséges peptidből és a humán COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) egy rövid szakaszából áll [19] (1. ábra). Az autoimmunitást elkerülendő, egy új, saját fejlesztésű immunizációs platformot is alkottunk, melynek segítségével bármely testi sejt, vagy mesterséges liposzóma kiemelkedően stabil, antigén-prezentáló felületet biztosít az immunizáció során, a kívánt immunogén hatás elérésének érdekében. Az új platformot TFR123-nak neveztük el (9. ábra). Az új platformot szintén szabadalmi oltalom alá helyeztük.



1. ábra. NPV370 sematikus szerkezete. A) Az eredeti, Peter Burkhard által fejlesztett peptid nanopartikulum (NP) monomer sematikus képe. B) Az összeszerelt NP sematikus képe. COMP: Cartilage oligomeric matrix protein, -GG-: dupla glicin „zsánér” szekvencia.

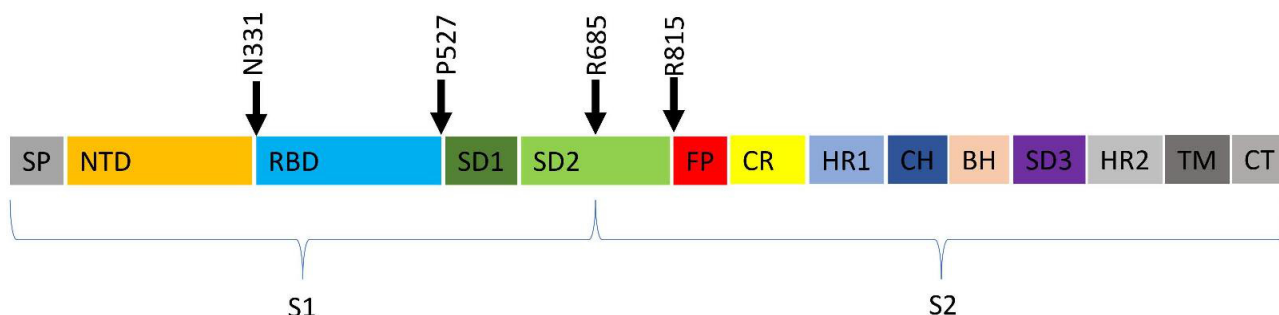
A COVID-19 okozta pandémia kapcsán jöttünk rá, hogy az általunk használt univerzális, immunizációs platformok nem kizárólag alapkutatói célokat szolgálhatnak, hanem potenciálisan új vakcinák fejleszthetők belőlük. A szabadalom megóvása és az újdonságrontás elkerülése érdekében az

immunizációs platformok pontos szekvenciájának megadása helyett egyszerűsített ábrákkal magyarázzuk el a saját fejlesztésű vakcinák működési mechanizmusát. Ennek megfelelően, most eredményeinknek kizárólag egy kis részét tudjuk csak közreadni.

A kísérletek rövid áttekintése

A SARS-CoV-2 tüskefehérje

Az eredeti, Vuhan-ban (Kína) azonosított SARS-CoV-2 koronavírus tüskefehérjéje (Spike = S) két részből, S1- és S2-fehérjéből áll (2. ábra) [21-22]. Az S-fehérje-trimer alkotja a jellegzetes korona struktúrát a lipid-membránba csomagolt RNS vírus körül [21]. A tüskefehérje RBD (receptor kötő domén) segítségével dokkol a tüdő sejtek ACE2 receptorához (3, 4. ábra) [26], majd proteolitikus hasítást (TMPRSS2: transmembrane protease, serin 2) követően felnyílik [24], externalizálva ezáltal az S2 fehérjén elhelyezkedő ún. FD (Fúziós Domén: S816-F823) szakaszt (2, 3. ábra), amely folyamat aktiválja a vírus penetrációját a tüdősejtekbe.



2. ábra. A SARS-CoV-2 koronavírus domén szerkezete. SP: Signal Peptid, NTD: N-terminális Domén, RBD: Receptor Kötő Domén, SD1: Szubdomén-1, SD2: Szubdomén-2, FP: Fúziós Peptid, CR: Kapcsolódó régió (connecting region), HR1: Heptád ismétlődő szakasz 1, CH: Központi hélix, BH: Béta hajtú, SD3: Szubdomén-3, HR2: Heptád ismétlődő szakasz 2, TM: Transzmembrán szakasz, CT: Citoplazma szakasz (cytosolic tail). N331: A RBD kezdete, P527: a RBD vége, R685: S1S2' hasítási hely, R815: S2' hasítási hely és FD kezdete.

Az S1S2' proteolízise Furin proteázok által szintén elengedhetetlen feltétele a vírus tüdősejtekbe való bejutásához (2, 3. ábra) [25]. Az S1 fehérjén azonosították azt a 14 aminosavnyi szakaszt (A475-C488: RBM = receptor kötő motif) (3, 4. Ábra) [26], mely a közvetlen interakciót biztosítja az ACE2 receptor és az S1 fehérje között (4. ábra). A SARS-CoV-2-RBM sokkal nagyobb affinitással illeszkedik az ACE2 receptorhoz, mint a korábbi SARS járvány kapcsán megismert SARS-CoV-1-RBM [26] (4. ábra). A SARS-CoV-2 S-fehérje nagymértékben glikozilált (22 N-glikozilációs helyet azonosítottak eddig) (5. ábra) [27]. Ezek a poszt-transzlációs módosítások „maszkolhatják” a neutra-

lizáló antitestek kötődését, ami csökkentheti a COVID-19 vakcinák hatékonyságát [28].

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
 FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQTS
 LLIVNNATNVVIKVFCEFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQP
 FLMDEGKQGNFKNREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPOGFSALEPLVDLPIG
 INITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNENGTITDAVD
 CALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPPGGEVFNATRFA
 SVYAWNRRKRSNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDE
 VRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLSDKVGNYNYLYRFLRKSNLKPE
 ERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPA
 TVCGFKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQ
 TLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYST
 GSNVFQTRAGCLIGAHEVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNsprrarSVASQSI IAYT
 MSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAV
 EQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLAD
 AGFIKQYGDCLGDI AARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMI AQYTSALLAGTITSGWTF
 GAGAAIQIPFAMQMayRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSSSTASALG
 KLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVNLNLSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSL
 QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVF
 LHVTYVPAQEKNF TTA PAICHDGKAHFPREGV FVSNGTHWVFVTRNFYEPQIITTDNT
 FVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVN
 IQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGF IAGLIAIVMVTIMLCC
 MTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPV LKGVKLHYT
 TTEILPVSMTKTSVDCTM

RBD

RBM

Furin kötő hely

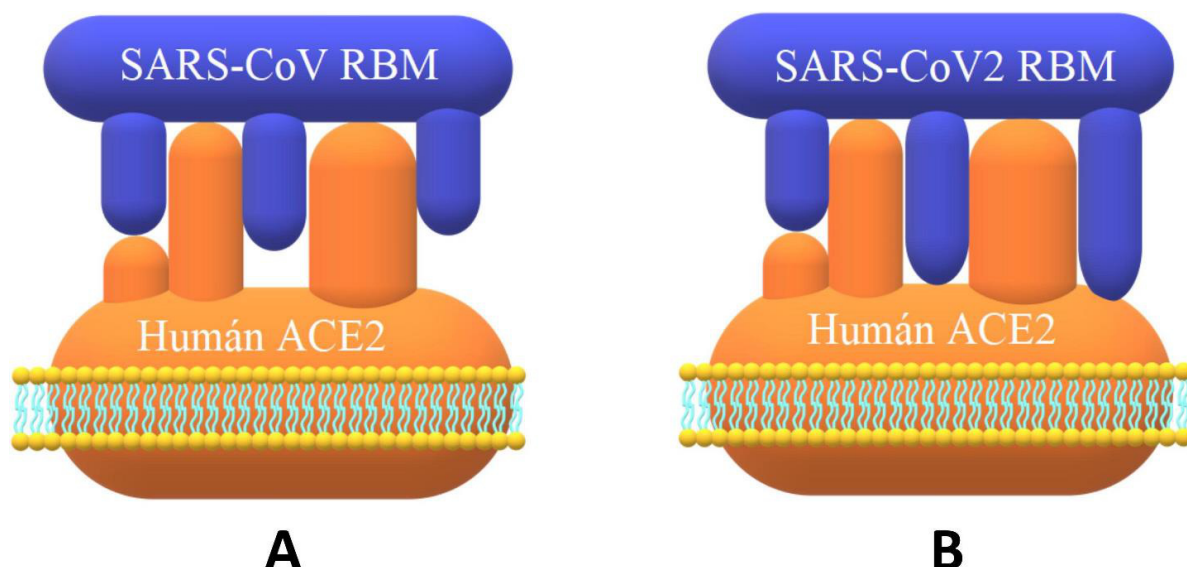
R: S1S2' hasítás

TMPRSS2 kötő hely

R: S2' hasítás

FD: Fúziós Domén

3. ábra. A Vuhan-ban azonosított SARS-CoV-2 eredeti koronavírus tüskefehérje aminosav összetétele. A vírus penetráció szempontjából releváns aminosav szakaszokat külön színekkel jelöltük.



4. ábra. A SARS-CoV-2 RBM és a SARS-CoV RBM szerkezeti kapcsolódása az ACE2 receptorhoz. A) SARS-CoV RBM + Humán ACE2, B) SARS-CoV-2 RBM + Humán ACE2, mely jobban illeszkedik a Humán ACE2 receptorhoz. (Shang et al et al Nature, 581: (7807) 221-224, 2020 cikk alapján átszerkesztve és stilizálva.)

„T-Scan” analízissel szintén azonosítottak 29 db CD8⁺ T-sejt epitóp szekvenciát

SARS-CoV-2 vírus fehérjéken belül, melyek közül, mindössze 3 található az S-fehérjén [29] (6. ábra).

Glikozilációs hely	Glikán típus	Glikozilációs hely	Glikán típus
N17	Komplex	N616	Komplex
N61	oligomannóz	N657	Komplex
N74	Komplex	N709	oligomannóz
N122	oligomannóz	N717	oligomannóz
N149	Komplex	N801	oligomannóz
N165	Komplex	N1074	oligomannóz
N234	oligomannóz	N1098	Komplex
N282	Komplex	N1134	Komplex
N331	Komplex	N1158	Komplex
N343	Komplex	N1173	Komplex
N613	oligomannóz	N1194	Komplex

A

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNTWTFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTLDLSKTQSLIIVNATNVVVKVCEFOFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDL PQGFSALEPLVDLP IGINITRFTQLLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAAYVGYL QPRTFLLYKYNENGTITDAVDCALDPLSETKTLKSTFVEKGIYQTSNFRVQPTE SIVRFPNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSASFSTFK CYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC VIAWNSNLDKSVGGNYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGF NCYFPLQSYGFPQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQTEILDIITPCSFSGG VSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVFPQTRAG CLIGAETHVNSYECDDIPIGAGICASYQTQNSPRRAFSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTISVTTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQY GSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDI AARDLICAQKFNGLTVLPLP LLDTEMLAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFNGIGVTONVLYE NQKLIANQFNLSAIGKIQDLSLSTASALGKLDQVNVNQAQALNTLVKQLSSNFGA ISSVLDLILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAA TKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSPQSPHGVVFLHVTYVPAQEKNTPTAPA ICHDGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGDIGSINASVNNIQKEIDRLNE VAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGF IAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCS CLKGCCSCGSCCKFEDDSEPVKGVKLYHT

N: Glikozilált Asn RBM R: S1S2' hasítás

R: S2' hasítás FD: Fúziós Domén

B

5. ábra. A SARS-CoV-2 tüskefehérje N-glikozilációs pozíciói. A) A SARS-CoV-2 tüskefehérje oldallánc-specifikus N-glikozilációs pozíciói és típusai (Watanabe et al., Science 369: 330–333, 2020 cikk alapján egyszerűsítve és átszerkesztve). B) A SARS-CoV-2 tüskefehérje N-glikozilációs pozíciói a fertőzés szempontjából releváns szakaszok pozíciójához viszonyítva.

Sorszám	Peptid	CoV-2 fehérje	Sorszám	Peptid	CoV-2 Fehérje
1	KLWAQCQVQL	ORF1ab	16	KCYGVSPTK S	
2	YLQPRTFLL S		17	VTNNTFTLK	ORF1ab
3	LLYDANYFL	ORF3a	18	KTIQPRVEK	ORF1ab
4	ALWEIQQVV	ORF1ab	19	KTFPPTPEK	N
5	LLLDRNLQL	N	20	VTDTPKGPK	ORF1ab
				ATEGALNTP	
6	YLFDSEGEFKL	ORF1ab	21	K	N
7	FTSDYQYLY	ORF3a	22	ASAFFGMSR	N
8	TTDPSFLGRY	ORF1ab	23	ATSRTLSYK	M
9	PTDNYITTY	ORF1ab	24	QYIKWPWYI S	
10	ATSRTLSYK	M	25	VYFLQSYNF	ORF3a
11	CTDDNALAYY	ORF1ab	26	VYIGDPAQL	ORF1ab
12	NTCDGTTFTY	ORF1ab	27	SPRWYFYLL	N
13	DTDFVNEFY	ORF1ab	28	RPDTRYVL	ORF1ab
14	GTDLEGNFY	ORF1ab	29	IIPRRNVATL	ORF1ab
15	KTFPPTPEK	N			

A

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNTWTFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTLDLSKTQSLIIVNATNVVVKVCEFOFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDL PQGFSALEPLVDLP IGINITRFTQLLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAAYVGYL QPRTFLLYKYNENGTITDAVDCALDPLSETKTLKSTFVEKGIYQTSNFRVQPTE SIVRFPNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC VIAWNSNLDKSVGGNYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGF NCYFPLQSYGFPQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQTEILDIITPCSFSGG VSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVFPQTRAG CLIGAETHVNSYECDDIPIGAGICASYQTQNSPRRAFSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTISVTTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQY GSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDI AARDLICAQKFNGLTVLPLP LLDTEMLAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFNGIGVTONVLYE NQKLIANQFNLSAIGKIQDLSLSTASALGKLDQVNVNQAQALNTLVKQLSSNFGA ISSVLDLILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAA TKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSPQSPHGVVFLHVTYVPAQEKNTPTAPA ICHDGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGDIGSINASVNNIQKEIDRLNE VAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGF IAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCS CLKGCCSCGSCCKFEDDSEPVKGVKLYHTTTEILPVSMTKTSVDCTM

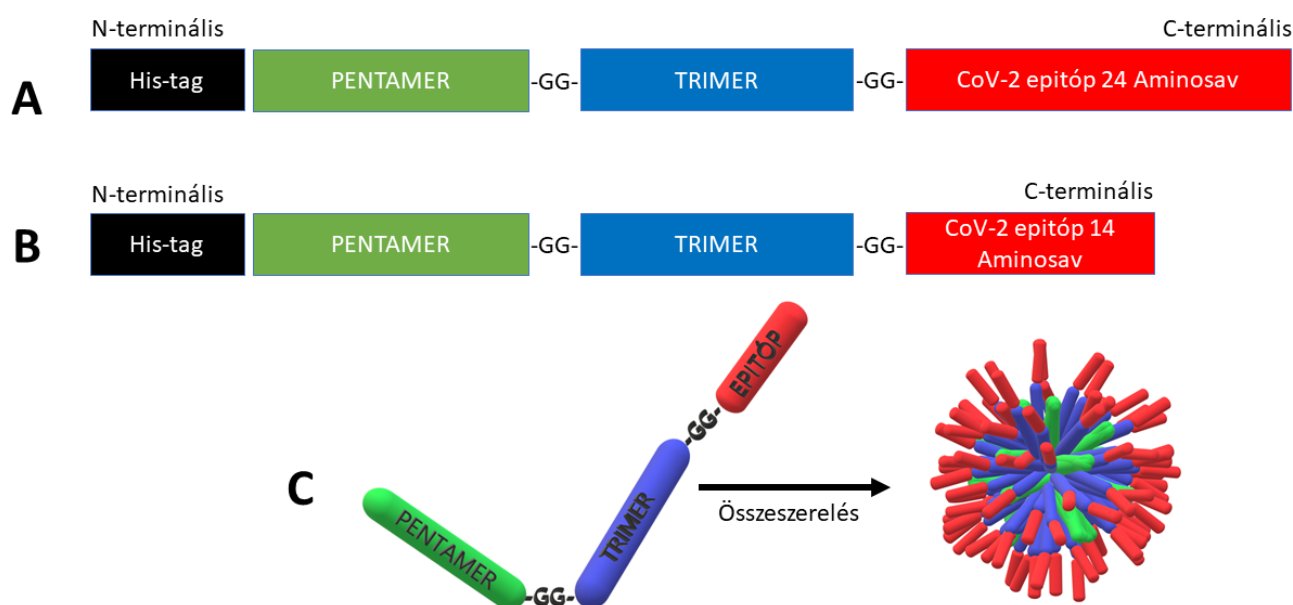
RBD RBM Furin kötés R: S2' hasítás CD8+ sejt epitóp

R: S1S2' hasítás TMPRSS2 kötés FD: Fúziós Domén

B

6. ábra. SARS-CoV-2 fertőzött betegekben azonosított, összesen 29 különböző CD8+ T-sejt epitóp szekvenciák. A) CD8+ T-sejt epitóp szekvenciák és a származási CoV-2 fehérje. Piros kerettel jelölve a tüskefehérjén (S) azonosított CD8+ T-sejt epitóp szekvenciák. (Immunity 53: 1095–1107, 2020 cikk alapján átszerkesztve és egyszerűsítve). B) Az azonosított CD8+ T-sejt epitóp szekvenciák elhelyezkedése a fertőzés szempontjából releváns szakaszok és az N-glikozilációs pozíciókhoz viszonyítva a SARS-CoV-2 tüskefehérje aminosav szekvenciáján belül.

Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy a három T-sejt epitóp szekvencia közül az egyik (K378-K386) a RBD szekvenciáján belül található (6.B ábra). Ezek a rövid T-sejt epitóp (TCE) szekvenciák kiemelkedő szerepet játszhatnak a memória T-sejtek differenciálódásában, ugyanakkor ilyen rövid peptid szakaszokkal eddig lehetetlen volt megfelelő immunválaszt kiváltani. Az általunk használt platformok (NPV370 és TFR123) megfelelő immunizációs felületet biztosítanak egészen rövid epitóp szekvenciák számára is mint pl. RBM, S1S2-hasítási hely, S2-hasítási hely, TCE-1, TCE-2 és TCE-3 (3, 6. ábra).



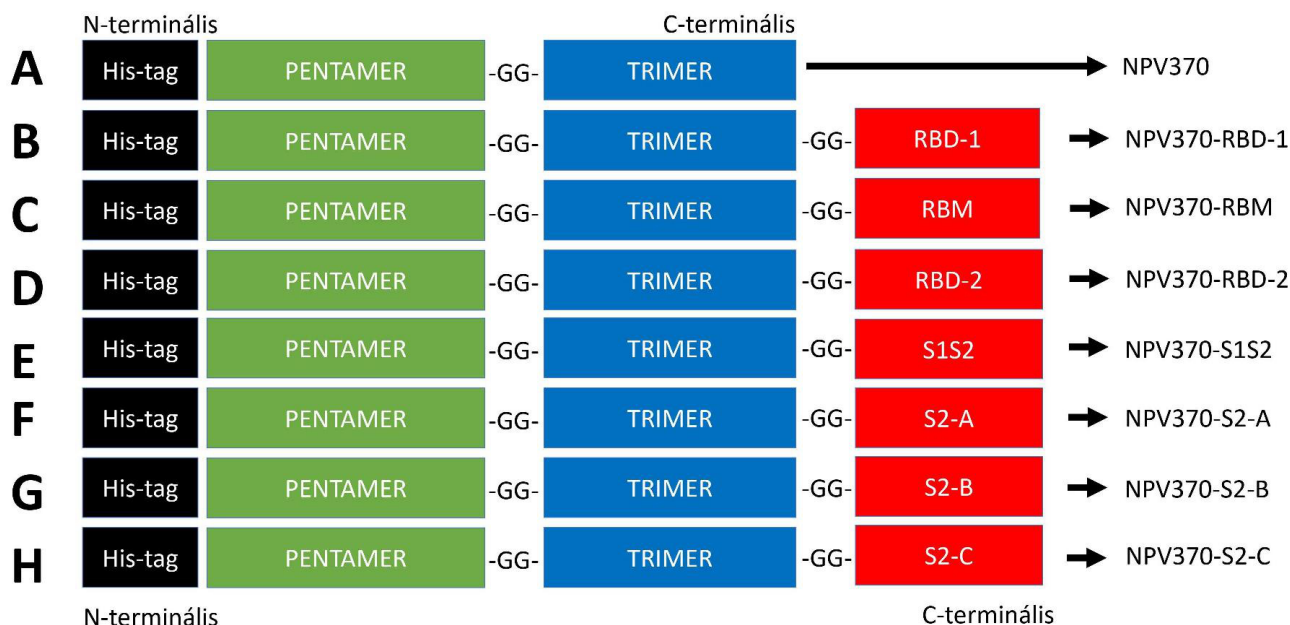
7. ábra. A NPV370-COVID-epitóp rekombináns fehérjék. A) NPV370-CoV-2-24 rekombináns fehérje sematikus szerkezete. B) NPV370-CoV-2-14 rekombináns fehérje sematikus szerkezete. C) Az összeszerelt NPV370-COVID egyszerűsített szerkezeti képe. -GG-: dupla glicin „zsanér” szekvencia.

NPV370 platform

Az anti-BFSP1 antitestek létrehozásához használt, módosított NP platformot alkalmaztuk a SARS-CoV-2 epitópokkal történő immunizációhoz. Egy rövid epitóp (14 aminosav) és egy hosszú epitóp (24 aminosav) szekvenciákból álló, rekombináns NPV370 fehérjecsaládot klónoztunk, melynek mindegyik tagja egy-egy releváns SARS-CoV-2 tüskefehérje szakaszt exponál óriási felületen (7.A-7.C ábra). Ebben a közleményben kizárólag a rövid szekvenciákból származó eredményeket mutatjuk be (7.B és 8.A-H ábra).

A rekombináns, N-terminális, poli-His-tag-elt NP-monomereket His-Select affinitás oszlopon tisztítottuk 8M karbamid jelenlétében. A karbamid lépcsőzetes eltávolításával (dialízis) az NP-monomerek összeszerelődnek, kialakítva a kívánt immunizációs felületet a megfelelő antigén-szekvenciákkal. Az NPV370-Covid

vakcinákat töményítettük (2mg/ml), majd 0,22 µm filterrel sterilre szűrtük és -80 °C-on tároltuk az immunizálás megkezdéséig. Az immunizációhoz 4-5 hetes, 1-1,5 kg súlyú, nőstény nyulakat használtunk.



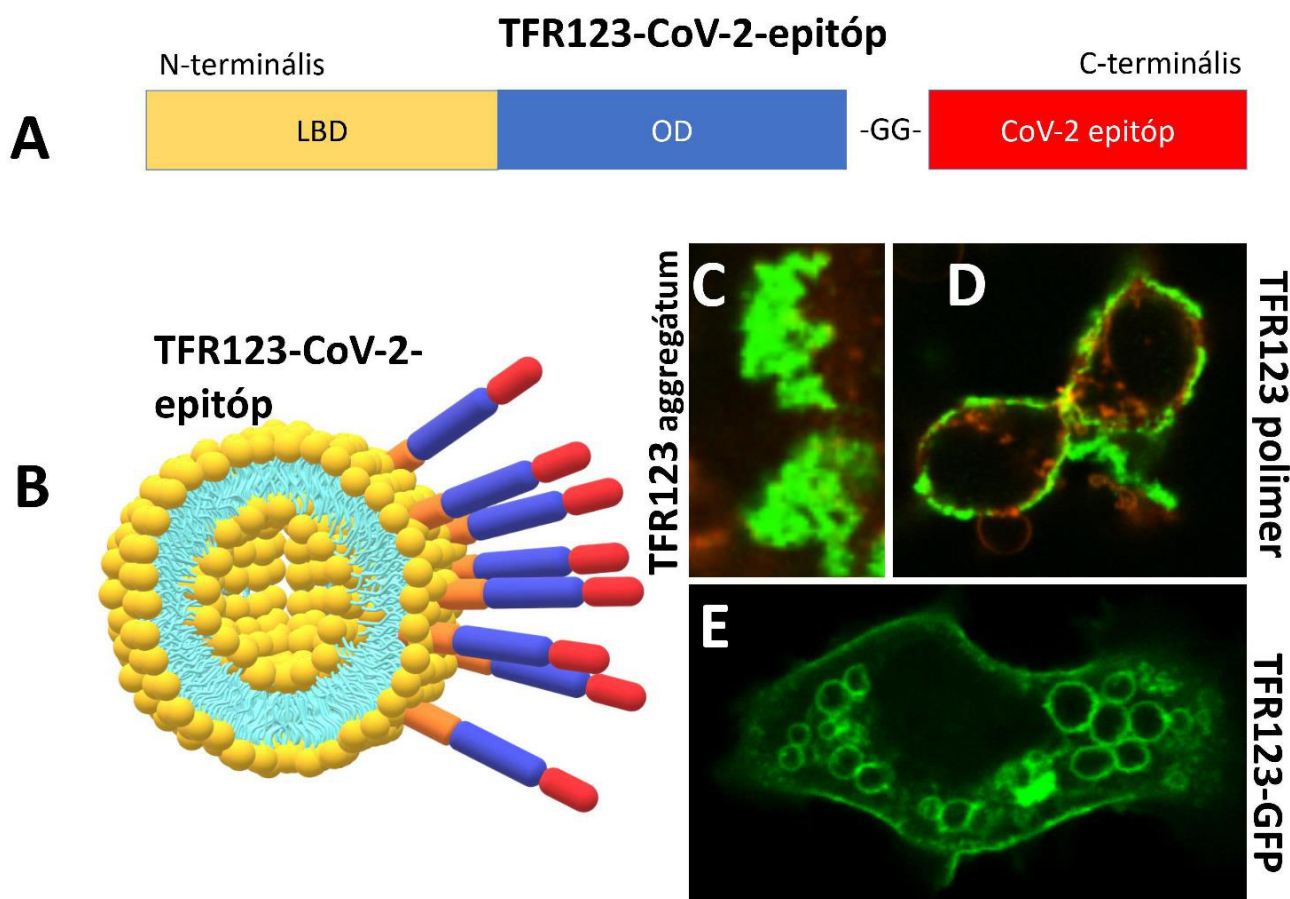
8. ábra. Az immunizációhoz használt, rekombináns NPV370 és NPV370-COVID rekombináns fehérje monomerek sematikus szerkezeti képe. A) NPV370. B) NPV370-RBD-1. C) NPV370-RBM. D) NPV370-RBD-2. E) NPV370-S1S2. F) NPV370-S2-A. G) NPV370-S2-B. H) NPV370-S2-C.

Minden csoportban 4 párhuzamos nyúl egyeddel dolgoztunk. Az oltást megelőzően minden egyes nyúl egyedtől ún. pre-immunizációs vérmintát (PIS: pre-immun szérum) vettünk. Az NPV370-Covid vakcinákkal oltott állatcsoportok mellett további 3 csoportot alakítottunk ki. Az abszolút kontroll csoport nem kapott oltást. Kizárólag a kontroll szérumok és az egészséges szerveik miatt vettük be a kísérletbe ezeket az állatokat. A negatív kontroll csoport Covid-epitóp mentes NPV370 platformot kapott. A pozitív kontroll csoport pedig Pfizer-BioNTech COVID-19 oltóanyagot kapott. Az immunizálás subcutan nyaki bőrredőbe, 5 különböző lokalizációval történt az NPV370 és NPV370-Covid vakcinák esetében, míg a Pfizer-BioNTech vakcinát intramuszkulárisan oltottuk. Fontos megjegyezni, hogy egyetlen oltásnál sem alkalmaztunk immunválaszt serkenő adjuváns kezelést. Az első oltást két alkalommal ismételtük (Booster) 14, illetve 28 nap elteltével. Az állatokat az első oltást követő 6. héten kíméletesen termináltuk. A szérum és szövet mintákat -80 °C-on tároljuk.

TFR123-platform

A TFR123 immunizációs platform esetében három különböző szerkezettel és funkcióval rendelkező peptidet kapcsoltunk össze kovalensen (9. ábra). Egy

speciális hidrofób módosított, ugyanakkor eredetileg szolubilis peptid LBD (lipid kötő domén) C-terminálisát hosszabbítottuk meg egy OD (oligomerizációs domén) szekvenciával.

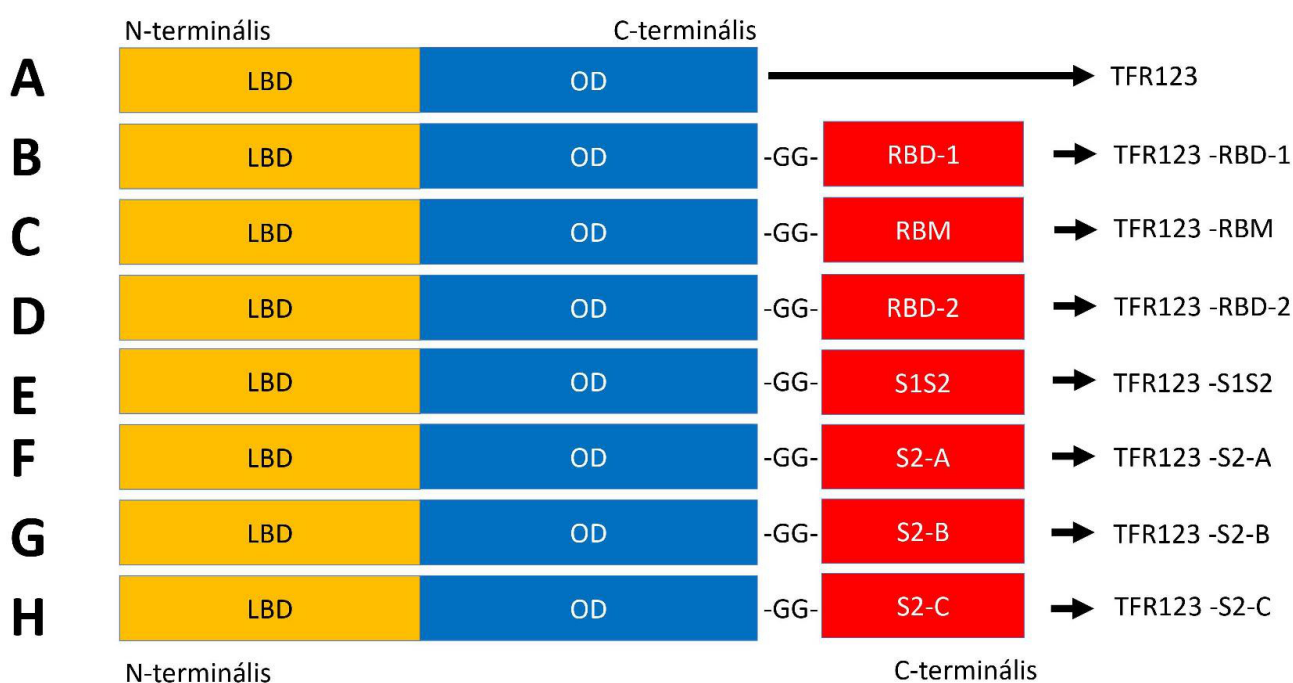


9. ábra. A TFR123 immunizációs platform. A) A TFR123-COVID rekombináns fehérje monomer sematikus szerkezete. B) A TFR123-COVID fehérje-polimer réteg kialakulása liposzóma felszínén, sematikus kép. C) A hidrofób módosítás nélküli TFR123 aggregátumok immunfluoreszcens képe PFA fixált MCF7 sejtek felszínén. Elsődleges antitest: nyúl anti-TFR123-antitest. Másodlagos antitest: anti-nyúl-IgG-Alexafluor-488 antitest. Vörös fluoreszcencia: WGA fluoreszcens lipid membrán festék. A TFR123 és MCF7 interakció a fixálást megelőző 30 percen, 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában, DMEM médiumban történt. D) A hidrofób módosított TFR123 fehérje polimer réteg immunfluoreszcens képe PFA-fixált MCF7 sejtek felszínén. Elsődleges antitest: nyúl anti-TFR123-antitest. Másodlagos antitest: anti-nyúl-IgG-Alexafluor-488 antitest. Vörös fluoreszcencia: WGA fluoreszcens lipid membrán festék. A hidrofób módosított TFR123 és MCF7 interakció a fixálást megelőző 30 percen, 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában, DMEM médiumban történt. E) TFR123-pEGFPN3 plazmiddal transzfektált MCF7 sejtek „in vivo” konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvétele 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában, DMEM médiumban.

Az „LBD-OD” fúziós fehérje C-terminálisához - az NPV370-platform esetében használt - SARS-CoV-2 epitópot kapcsoltuk (10.A-H ábra). Tettük mindezt azzal a céllal, hogy létrehozzunk egy, a lehető legtökéletesebb és legstabilabb antigén prezentáló platformot. A TFR123 rekombináns fehérje önmagában egy hatalmas aggregátummá oligomerizálódik (9.C ábra), ugyanakkor a lipid membránokkal való interakció egy irányított polimerizációt indít be, és létrejön

egy kiemelkedően stabil, immunizációs polimer a biológiai membránok (sejtmembrán) (9.D ábra), vagy mesterséges membránok (liposzóma) felszínén (9.B ábra). Az irányított polimerizációt követően, a SARS-CoV-2 epitópok - az immunizáció szempontjából tökéletes orientációval - a stabil polimer külső felszínén nagy mennyiségben helyezkednek el (9.D ábra). Annak érdekében, hogy kiderítsük, a TFR123 immunizációs platformból fejleszthető-e nem fehérje alapú vakcina típus, a SARS-CoV-2 epitópokat GFP (zöld fluoreszcens protein) fehérjére cseréltük. A TFR123-pEGFPN3 expressziós konstrukciót pedig MCF7 eukarióta sejtekbe transzfektáltuk. A TFR123-GFP rekombináns fehérje szubcelluláris disztribúciója nemcsak a sejtmembránban, hanem hatalmas intracelluláris membrán vezikulákban is megjelent (9.E ábra).

A TFR123-Covid fehérje vakcina előállításához a NPV370 platformmal tesztelt, leghatékonyabb SARS-CoV-2 epitópokat használtuk. A rekombináns TFR123-Covid monomereket affinitáskromatográfia oszlopon tisztítottuk, töményítettük (2mg/ml), sterilre szűrtük (0,22 µm filter), majd -80°C-on tároltuk az oltások megkezdéséig. A nyulak immunizációját az NPV370-Covid vakcinákkal analóg módon végeztük, azzal a különbséggel, hogy a TFR123-Covid és antigén mentes TFR123 vakcinákat is intramuszkulárisan oltottuk.



10. ábra. Az immunizációhoz használt, rekombináns TFR123 és TFR123-COVID rekombináns fehérje monomerek sematikus szerkezeti képei. A) TFR123. B) TFR123-RBD-1. C) TFR123-RBM. D) TFR123-RBD-2. E) TFR123-S1S2. F) TFR123-S2-A. G) TFR123-S2-B. H) TFR123-S2-C.

SARS-CoV-2 epitóp szekvenciák

A SARS-CoV-2 S1 fehérje a vírus infekció szempontjából kiemelkedő jelentőségű, mert az S1 tartalmazza a RBD szakaszt (2, 3. ábra), mely szekvencián belül található a RBM (3. ábra). Az immunizációhoz használt epitóp szekvenciák egy részét az S1 fehérje ezen szakaszaiból szerkesztettük: RBD-1, RBM, RBD-2 (8.B-D és 10.B-D ábra). Szintén az S1 fehérjén belül található a Furin proteolitikus hasítási hely: R685 (S1S2') (2, 3. ábra). A hasítási hely körül lokalizált, glikozilálatlan szakaszt (Furin kötő hely) szintén neo-epitópként alkalmaztuk: S1S2 (2, 3, 8.E és 10.E ábra). Időközben a T678 Treonint O-glikozilációs helyként azonosították [30]. Az SARS-CoV-2 S2 fehérje tartalmazza a vírus internalizációt kezdeményező ún. FD-t (fúziós domént: S816-F823) (2, 3. ábra). A FD-t övező szakaszt (TMPRSS2 kötő hely) szintén neo-epitóp szekvenciaként alkalmaztuk: S2 (8.F-H és 10.F-H ábra). A Cryo-EM adatok alapján ez a glikozilálatlan szekvencia megfelelően externalizált a SARS-CoV-2 tüskefehérje felszínén [21-22, 28]. Meggyőződésünk szerint az S2' hasítási hely jelentősége kulcsfontosságú, ezért számos epitóp variánst szerkesztettünk ennek bizonyítására: NPV370-S2A, NPV370-S2B és NPV370-S2C (8. F-H ábra) és ezek TFR123-hoz kapcsolt változatai (10.F-H ábra).

Eredmények

Az immunizációs platformok tesztelése jelenleg folyamatban van, ezért az eddigi eredményeket néhány bekezdésben, ábrák és szekvenciák nélkül foglaljuk össze:

1. Mindkét immunizációs platformmal sikerült igen érzékeny és szelektív immunválaszt kiváltani nyulakban igen rövid, 14 aminosavnyi epitóp szekvenciák ellen.
2. A validált anti-SARS-CoV-2 tüskefehérje ellen létrehozott, beszerezhető antitestek igazolták a SARS-CoV-2 rövid antigén epitópokat mind az NPV370, mind a TFR123 rekombináns fehérjék felszínén (Western-blot és ELISA).
3. A NPV370-Covid nanopartikulummal immunizált nyulak vérében megjelenő anti-Covid-epitópokat felismerő IgG molekulák szelektív immunválaszt adnak mind a tisztított, rekombináns S1 és S2 tüskefehérjékkel, mind a SARS-CoV-2 fertőzött Vero-6 sejt-lizátummal, mind az analóg epitóppal konjugált TFR123 rekombináns fehérjével. Ez azt jelenti, hogy a két platform azonos epitóp szekvenciái alkalmasak lehetnek a különböző platformok segítségével létrehozott immunglobulinok validálására.

4. A TFR123-Covid platformmal immunizált nyulak vérében megjelenő anti-Covid-epitóp IgG molekulák szelektív immunválaszt adnak mind a tisztított, rekombináns S1 és S2 tüskefehérjékkel, mind a SARS-CoV-2 fertőzött Vero-6 sejt-lizátummal, mind az analóg epitóppal konjugált NPV370 rekombináns fehérjével. Mindkét platform validálja a másikat (Eredmények 3. és 4. pontok).
5. A SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegek vérében megjelenő anti-COVID-19 antitestek szelektív immunválaszt adnak mind a rekombináns NPV370-COVID-epitópokkal, mind a rekombináns TFR123-COVID-epitópokkal. Ez bizonyítja, hogy az immunizációkhoz megfelelő vírus-antigén szekvenciákat választottunk.
6. A mRNS alapú COVID-19 vakcinákkal és az adenovírus alapú vektor COVID-19 vakcinákkal oltott humán, SARS-CoV-2 fertőzésen át nem esett egyének vérében megjelenő anti-COVID IgG molekulák szelektív immunreakciót mutatnak mind a tisztított, rekombináns NPV370-COVID-epitóp fehérjékkel, mind a tisztított, rekombináns TFR123-COVID-epitóp fehérjékkel. Ez igazolja a már forgalomban lévő vakcinák antigén-szelektivitását, valamint a kiválasztott epitóp szekvenciák relevanciáját.

Diszkusszió és fejlesztési lehetőségek

A TFR123 immunizációs platform - az NPV370 mintájára - egy valós biokémiai problémára kínál releváns megoldást. Az új platformok segítségével lehetőség nyílik, hogy „neo-epitóp” szekvencia-szelektív immunválaszt lehessen kiváltani olyan rövid fehérje-antigén szekvenciák ellen, amelyekre eddig még nem volt elég hatékony technikai megoldás. Az új technológia lehetőséget biztosít, hogy a kórokozók elleni küzdelemben ezután sokkal célzottabb „támadásokat” lehessen bevetni. A SARS-CoV-2 vírus esetében ez azt jelentheti, hogy a fertőzés szembontásból kiemelten fontos, extrém rövid antigén szakaszok, mint pl. tüskefehérje RBM-ja vagy a proteolitikus hasító enzimek (Furin, TMPRSS2) felismerő szekvenciái, FD (fúziós domén) vagy a memória T-sejtek differenciálódását elősegítő, TCE (T-Cell epitope) szekvenciák mind potenciális antivirális eszközökké válhatnak az újonnan fejlesztett immunizációs platformok (TFR123, NPV370) felszínén. A platformok segítségével létrehozott poliklonális antitestek kvantitatív vizsgálata (SARS-CoV-2 Spike-ELISA), valamint a vírus-neutralizációs kísérletek (Surrogate assay, Vero-6 infekciós assay, Pszeudo-típusú Lentivírus GFP assay) jelenleg is tartanak.

Az új, illetve a már ismert kórokozó antigén szekvenciák „in silico” elemzése szinte minden esetben kijelöli a fertőzés szempontjából meghatározó antigén szakaszokat, melyek az új platformok segítségével azonnal „hadrendbe” állíthatók az új és a már ismert kórokozók ellen (Influenza, ebola, malária stb.). A TFR123 számos, további új lehetőséget rejt magában. A kívánt immunválasz adjuváns nélkül is elérhető, így csökkenthetők a fehérje alapú vakcinák mellékhatásai. Mindkét immunizációs platform modulálható, azaz az immunogén felület létrehozása eltérő antigén-epitóp szekvenciák „összeszerelésével” is elérhető. A TFR123 immunizációs platform nem kizárólag fehérje alapú vakcinává is fejleszthető, hiszen a platform immunizáció szempontjából lényeges tulajdonsága (antigén-prezentáló polimer réteg a lipid membránokban) transzdomináns expresszió során is megőrződik az eukarióta sejtekben (9.E ábra). A TFR123 a mesterséges liposzómák lipid burkát is stabil polimer réteggel látja el. A liposzómák lipid összetételének optimalizálása jelenleg is folyik. A TFR123 polimerrel stabilizált liposzómák egy új, ütőképes alternatívát biztosíthatnak a jelenleg ismert immunizációs platformok számára, illetve új lehetőségeket nyithatnak a liposzóma-peptid polimerek és amfipatikus peptid polimerek felhasználásában.

A kísérletek jelenlegi fázisában az már biztosan kijelenthető, hogy az új immunizációs platformok alkalmasak egy szelektív immunválasz kiváltására nagyon rövid fehérje-antigén szekvenciák ellen.

Köszönetnyilvánítás

A projekt a PTE 2020. PoC (Proof of Concept) pályázati támogatásából, valamint a PTE ÁOK támogatásával valósult meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Jacob, J.T., Coulombe, P.A., Kwan, R., Omary, M.B. (2018) Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **10(4)**: a018275.
- [2] Chu, P.G., Weiss, L.M. (2002) Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, **40(5)**: 403-39.
- [3] Hnia, K., Ramspacher, C., Vermot, J., Laporte, J. (2015) Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res*, **360(3)**: 591-608.
- [4] Paulin, D., Li, Z. (2004) Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res*,

- 301(1):** 1-7.
- [5] Satelli, A., Li, S.L. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **68(18)**: 3033-3046.
- [6] Ramos, I., Stamatakis, K., Oeste, C.L., Perez-Sala, D. (2020) Vimentin as a Multifaceted Player and Potential Therapeutic Target in Viral Infections. *Int J Mol Sci*, **21(13)**: 4675.
- [7] Chen, S.N., Sbaizero, O., Taylor, M.R.G., Mestroni, L. (2019) Lamin A/C Cardiomyopathy: Implications for Treatment. *Curr Cardiol Rep*, **21(12)**: 160.
- [8] Cenni, V., Capanni, C., Mattioli, E., Schena, E., Squarzone, S., Bacalini, M.G., Garagnani, P., Salvioli, S., Franceschi, C., Lattanzi, G. (2020) Lamin A involvement in ageing processes. *Ageing Research Reviews*, **62**: 101073.
- [9] Herrmann, H., Aebi, U. (2016) Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **8(11)**: a018242.
- [10] Ramani, S., Berard, J.A., Walker, L.A.S. (2021) The relationship between neurofilament light chain and cognition in neurological disorders: A scoping review. *J Neurol Sci*, **420**: 117229.
- [11] Song, S.H., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y.Z., Zhang, Q.J., Quinlan, R.A. (2009) Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *Journal of Clinical Investigation*, **119(7)**: 1837-1848.
- [12] Perng, M.D., Zhang, Q., Quinlan, R.A. (2007) Insights into the beaded filament of the eye lens. *Exp Cell Res*, **313(10)**: 2180-8.
- [13] Qu, B., Landsbury, A., Schonhaler, H.B., Dahm, R., Liu, Y., Clark, J.I., Prescott, A.R., Quinlan, R.A. (2012) Evolution of the vertebrate beaded filament protein, Bfsp2; comparing the in vitro assembly properties of a "tailed" zebrafish Bfsp2 to its "tailless" human orthologue. *Exp Eye Res*, **94(1)**: 192-202.
- [14] Li, Y., Liu, X., Xia, C.H., FitzGerald, P.G., Li, R., Wang, J., Gong, X. (2020) CP49 and filensin intermediate filaments are essential for formation of cold cataract. *Mol Vis*, **26**: 603-612.
- [15] Cartwright, S., Karakesisoglou, I. (2014) Nesprins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, **29**: 169-79.
- [16] Gottardi, C.J., Luxton, G.W.G. (2020) Nesprin-2G tension fine-tunes Wnt/ beta-catenin signaling. *J Cell Biol*, **219(10)**: e202009042.
- [17] Tapodi, A., Clemens, D.M., Uwineza, A., Jarrin, M., Goldberg, M.W., Thion, E., Heal, W.P., Tate, E.W., Nemeth-Cahalan, K., Vorontsova, I., Hall, J.E., Quinlan, R.A. (2019) BFSP1 C-terminal domains released by post-

- translational processing events can alter significantly the calcium regulation of AQP0 water permeability. *Exp Eye Res*, **185**: 107585.
- [18] Ismail, V.S., Mosely, J.A., Tapodi, A., Quinlan, R.A., Sanderson, J.M. (2016) The lipidation profile of aquaporin-0 correlates with the acyl composition of phosphoethanolamine lipids in lens membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1858(11)**: 2763-2768.
- [19] Pimentel, T.A., Yan, Z., Jeffers, S.A., Holmes, K.V., Hodges, R.S., Burkhard, P. (2009) Peptide nanoparticles as novel immunogens: design and analysis of a prototypic severe acute respiratory syndrome vaccine. *Chem Biol Drug Des*, **73(1)**: 53-61.
- [20] Babapoor, S., Neef, T., Mittelholzer, C., Girshick, T., Garmendia, A., Shang, H., Khan, M.I., Burkhard, P. (2011) A Novel Vaccine Using Nanoparticle Platform to Present Immunogenic M2e against Avian Influenza Infection. *Influenza Res Treat*, **2011**: 126794.
- [21] Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C.J., Cerikan, B., Lu, J.M., Peukes, J., Xiong, X., Krausslich, H.G., Scheres, S.H.W., Bartenschlager, R., Briggs, J.A.G. (2020) Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, **588(7838)**: 498-502.
- [22] Lokman, S.M., Rasheduzzaman, M., Salauddin, A., Barua, R., Tanzina, A.Y., Rumi, M.H., Hossain, M.I., Siddiki, A., Mannan, A., Hasan, M.M. (2020) Exploring the genomic and proteomic variations of SARS-CoV-2 spike glycoprotein: A computational biology approach. *Infect Genet Evol*, **84**: 104389.
- [23] Lan, J., Ge, J.W., Yu, J.F., Shan, S.S., Zhou, H., Fan, S.L., Zhang, Q., Shi, X.L., Wang, Q.S., Zhang, L.Q., Wang, X.Q. (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, **581(7807)**: 215-220.
- [24] Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., Muller, M.A., Drosten, C., Pohlmann, S. (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, **181(2)**: 271-280 e8.
- [25] Peacock, T.P., Goldhill, D.H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O.C., Kugathasan, R., Penn, R., Brown, J.C., Sanchez-David, R.Y., Braga, L., Williamson, M.K., Hassard, J.A., Staller, E., Hanley, B., Osborn, M., Giacca, M., Davidson, A.D., Matthews, D.A., Barclay, W.S. (2021) The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission

- in ferrets. *Nat Microbiol*, **6(7)**: 899-909.
- [26] Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F. (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, **581(7807)**: 221-224.
- [27] Watanabe, Y., Allen, J.D., Wrapp, D., McLellan, J.S., Crispin, M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, **369(65010)**: 330-333.
- [28] Grant, O.C., Montgomery, D., Ito, K., Woods, R.J. (2020) Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Sci Rep*, **10(1)**: 14991.
- [29] Ferretti, A.P., Kula, T., Wang, Y., Nguyen, D.M.V., Weinheimer, A., Dunlap, G.S., Xu, Q., Nabilsi, N., Perullo, C.R., Cristofaro, A.W., Whitton, H.J., Virbasius, A., Olivier, K.J., Jr., Buckner, L.R., Alistar, A.T., Whitman, E.D., Bertino, S.A., Chattopadhyay, S., MacBeath, G. (2020) Unbiased Screens Show CD8(+) T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein. *Immunity*, **53(5)**: 1095-1107 e3.
- [30] Sanda, M., Morrison, L., Goldman, R. (2021) N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Anal Chem*, **93(4)**: 2003-2009.



Tapodi Antal a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Természettudományi Karán szerzett diplomát Biológia Szakon 2000-ben. Ugyanebben az évben kezdett dolgozni gyakornokként, majd tanársegédént a PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben. 2002-től nappali PhD hallgatóként folytatta tanulmányait szintén a Biokémiai Intézetben, Professor Sümegi Balázs témavezetésével. 2003-2005-ig a Csertex Kft. munkatársa lett az Invitrogen (Jelenleg ThermoFisher SCIENTIFIC) termékek értékesítőjeként. 2005-től a PhD fokozat megszerzése után 2009-ig ismét a PTE ÁOK alkalmazásába került adjunktusi beosztásban. 2009-2012-ig az észak-angliai Durham-ben (University of Durham, UK) kapott postdoctoral fellowship állást Professor Roy Quinlan közvetlen irányításával. 2012-től újból a PTE ÁOK Biokémiai Intézetbe tért vissza, ahol jelenleg is alkalmazásban áll. Az ÁOK általános orvos, fogász és biotechnológus képzéseiben 2001 óta a biokémia és orvosi biokémia tantárgyakat oktatja magyar, német és angol nyelveken.

DEZETIL-AMIODARON: EGY ANTIARITMIÁS GYÓGYSZER METABOLITJÁNAK TUMOR-TERÁPIÁS HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGE

Bognár Zita
PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

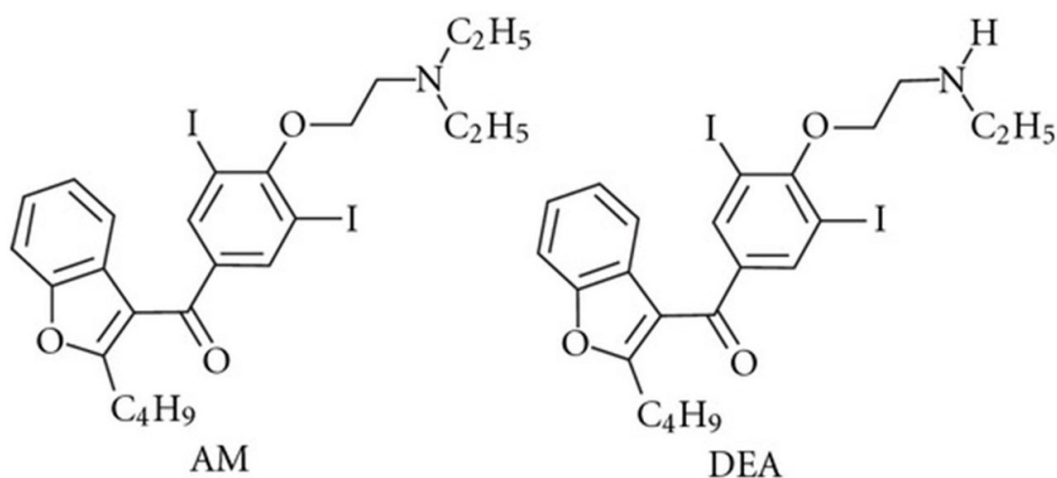
Bár a modern sebészi technikák és az új immunológiai, biokémiai támadáspontokon alapuló modern kemoterápiás szerek alkalmazása jelentősen javítják a daganat ellenes kezelések hatékonyságát, a malignus daganatok máig a második leggyakoribb halált okozó megbetegedést jelentik. Ennek oka a késői felfedezés mellett a magas malignitás és terápia rezisztenciák kialakulása, melyekért nagy százalékban a daganatos őssejtek (SCS) felelősek. Mindezek felvetik új vegyületek kifejlesztésének szükségességét, amelyek felhasználhatók lennének a modern, esetlegesen egyénre szabott kezelések tervezésében. Ugyanakkor, az új vegyületek amúgy teljes mértékben indokolt biztonsági vizsgálatait jelentősen késleltetik az új vegyületek bekerülését a terápiás gyakorlatba. Ezen a problémán segíthet, ha egy már a humán terápiában elfogadott gyógyszert hasznosítunk újra különböző rákbetegségek kezelése céljából. Mi ezt a gondolatot eggyel tovább fordítottuk, amikor a széles körben, több mint 50 éve használt antiaritmiás szer, az amiodaron legfőbb metabolitja, a dezetil-amiodaron (DEA) potenciális rákellenes hatását kezdtük vizsgálni.

A világon az amiodaronnal (AM) kezelt betegek száma milliós nagyságrendű; ez az egyik legszélesebb spektrumú antiaritmiás szer. Hagyományosan a Vaughan-Williams szerinti klasszifikáció III. osztályába tartozik, de összetett hatásmechanizmusa miatt kevert típusúnak is nevezik. Alkalmazható a szupraventrikuláris és kamrai aritmiák legtöbb típusában [1, 2]. Fő indikációs területe szívelégtelenség mellett fellépő súlyos szupraventrikuláris és kamrai tahikardiák akut kezelése [1].

Hosszantartó, magas dózisu kezelés során sajnos extrakardiális mellékhatásokat okoz, amelyek a szer egyes szervekben való akkumulációjával magyarázhatók [2]. Ilyen típusú, gyakran előforduló mellékhatásai miatt nevezik az amiodaront a leghatásosabb és egyben a legtoxikusabb antiaritmikumnak. A számos mellékhatás közül mindenképpen megemlítendő a tüdőfibrózis, a bőr fotoszenzitivitása és szürkés elszíneződése, corneális depozíciók megjelenése, májkárosodás, valamint a gyógyszer jódtartalma és a pajzsmirigyhormonhoz való kémiai hasonlósága miatti hyperthyreosis (gyakrabban) vagy hypothyreosis

(ritkán). Farmakokinetikáját tekintve az amiodaron hosszú (átlagosan 55 napos) felezési idővel rendelkezik, amely szükségessé teszi telítő dózis alkalmazását a kezelés első 1-4 hetében, a terápiás plazmakoncentráció gyors elérése érdekében [2]. Az amiodaron metabolizációjáért a máj citokróm P450 enzimszerepe felelős: a CYP3A4 és CYP2C8 enzimek alakítják dezetil-amiodaronná [3, 4], amely a gyógyszer legfőbb metabolitja.

A dezetil-amiodaron (DEA) aktív metabolit, amely az alapmolekula mellett szerepet játszik az amiodaronnál leírt hatások kialakulásában [2, 5, 6], szintén antiaritmiás hatású [2], de proaritmiás hatással nem rendelkezik.



<https://www.researchgate.net>

1. ábra. Az amiodaron (AM) és a dezetil-amiodaron (DEA) szerkezete.

A DEA IUPAC neve (2-butyl-1-benzofuran-3-yl)-[4-[2-(etilamino)etoxi]-3,5-dijodofenil]metanon, vagyis kémiai szerkezetét tekintve egy etilcsoport hiánya különbözteti meg a kiindulási vegyülettől (1. ábra). A névből az is kitűnik, hogy (az amiodaron hasonlóan) a molekula tartalmaz egy benzofurán gyűrűt, ami a lipofilitásért felelős, továbbá az etilcsoport lehasadásával és a terciér nitrogénatom szekunderré válásával az eredeti molekulához képest a DEA kevésbé hidrofíli. A DEA minden amiodaronnal kezelt beteg vérében, szöveteiben előfordul. Tartós amiodaronkezelés során a DEA és az amiodaron koncentráció lassan emelkedik a betegek vérében, azonban a két koncentráció aránya gyakorlatilag állandó marad, mivel a DEA kompetitíven gátolja az anyavegyületének lebontásához szükséges CYP3A4 enzimet és P-glikoproteint [7, 8, 9]. Ezeröttszáz napos követés után az átlagos terápiás plazmakoncentrációk mikromólos nagyságrendet értek el (AM: $1,17 \pm 0,53 \mu\text{M}$, DEA:

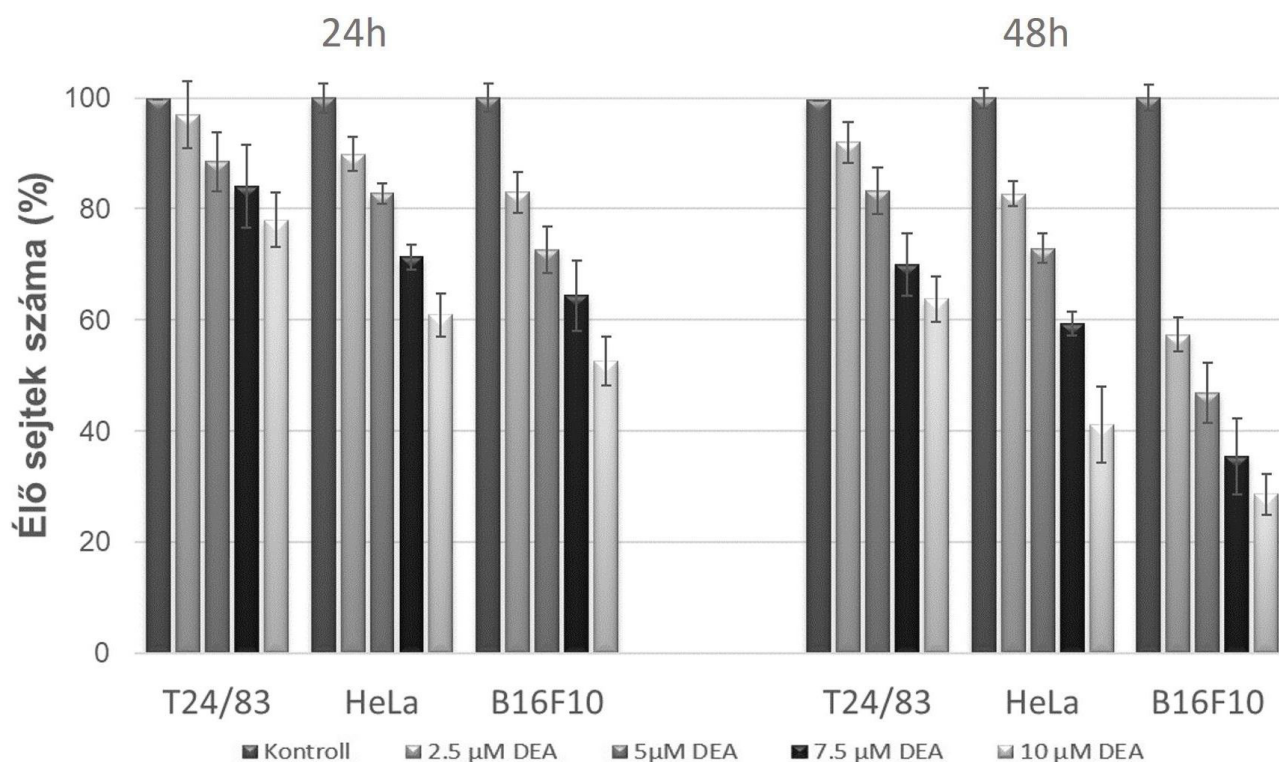
0,92 ± 0,41 µM) [7]. A szöveti halmozódás miatt a lipofil szövetekben akár milimólos koncentrációban is előfordulhat mindkét vegyület; a legtöbb vizsgált szövetben a DEA koncentrációja bizonyult magasabbnak. A tüdőre vonatkozóan az AM/DEA arány 0,22 ± 0,08, azaz a tüdőben a DEA koncentrációja az amidaronénak átlagosan több mint négyszerese volt [8, 9].

Felvetődött tehát bennünk a kérdés, hogy felhasználható-e ez a szöveti halmozódás arra, hogy a DEA lokálisan kifejtse (később ismertetésre kerülő) pro-apoptotikus hatását az akkumuláció helyén. A kérdés megválaszolása érdekében a DEA hatását olyan daganatos sejtvonalakon terveztük megvizsgálni, amely az előbb említett akkumulációs helyekre gyakran ad áttétet, és az áttétek sikeres kezelése a betegség prognózisa szempontjából releváns. Kísérleteinket ezért tehát T24/83 humán hólyagtumor és B16F10 egér melanóma sejtvonalon végeztük, hiszen az invazív hólyagdaganatok és a metasztatikus melanómák kezelése továbbra is rendkívül nehéz, a páciensek túlélési esélye kedvezőtlen [10, 11]. Ismert, hogy az AM és a DEA egymás sejtkárosító hatását potenciózza [12, 13], és épp ezt a negatív szinergikus hatást teszik felelőssé az AM súlyos mellékhatásaiért.

Kísérleteink másik kiindulópontját egy korábbi, általunk publikált cikk adta, amely az AM és DEA molekuláris hatását vizsgálta ischaemia-reperfúzió során, patkányszív modelleken. A kísérletsorozat során az AM ischaemia mellett alacsony koncentrációkban protektív hatást fejt ki a szívizomsejtek mitokondriumaira úgy, hogy gátolja a pro-apoptotikus apoptózis indukáló faktor (AIF) mitokondriumból való ischaemia által indukált felszabadulását és transzlokációját a sejtmagba. Szintén a protektív hatásokhoz tartozik az AM szétkapcsoló hatása, valamint az a tény, hogy a mitokondriális membrán-potenciált csökkenti. Magasabb koncentrációkban azonban az AM gátolta a mitokondriális légzési lánc működését, illetve Cyclosporin A-independens duzzadást váltott ki a mitokondriumokban. A kísérlet során igazolódott, hogy a DEA kis koncentrációkban nem mutat az AM-hez hasonló protektív hatásokat, viszont az amidaronnál megfigyelt mitokondriumot károsító hatások nagy koncentráció alkalmazásakor jelen vannak a DEA esetében is [14]. Az antiaritmikum indikációban használt DEA-mellékhatások kialakulásának mechanizmusa ismeretében adódott az a kérdés, hogy egy tisztán pro-apoptotikus hatású, jól meghatározott szövetekben nagymértékben dúsuló szer esetében a klinikai gyakorlatban lehet-e ezen „mellékhatások”-nak klinikai haszna. A kérdésre válaszként a malignus daganatos betegségek, ezeknek is

elsősorban a késői stádiumú, kevésbé lokalizált, specifikus terápiával nem vagy nehezen kezelhető esetei adódtak.

A tumorprogresszió kialakulásának sebességét az apoptózis és a sejtproliferáció egyensúlya határozza meg. A tumor ellenes kezelések sejtciklus-leállást és/vagy apoptózist okoznak a tumorsejtekben, ezzel lassítva, meggátolva a daganatot növekedését. Munkánk során sikerült bizonyítanunk a dezetil-amiodaron citotoxikus hatását, mind rövidtávú, mind hosszú időtartamú kísérletekben. A DEA 10 μM , illetve ennél alacsonyabb koncentrációban 24, illetve 48 h inkubáció során idő- és koncentrációfüggő módon pusztította a T24/83 hólyagtumor, a HeLa cervix karcinóma és B16F10 melanóma sejteket (2. ábra) [15-17].

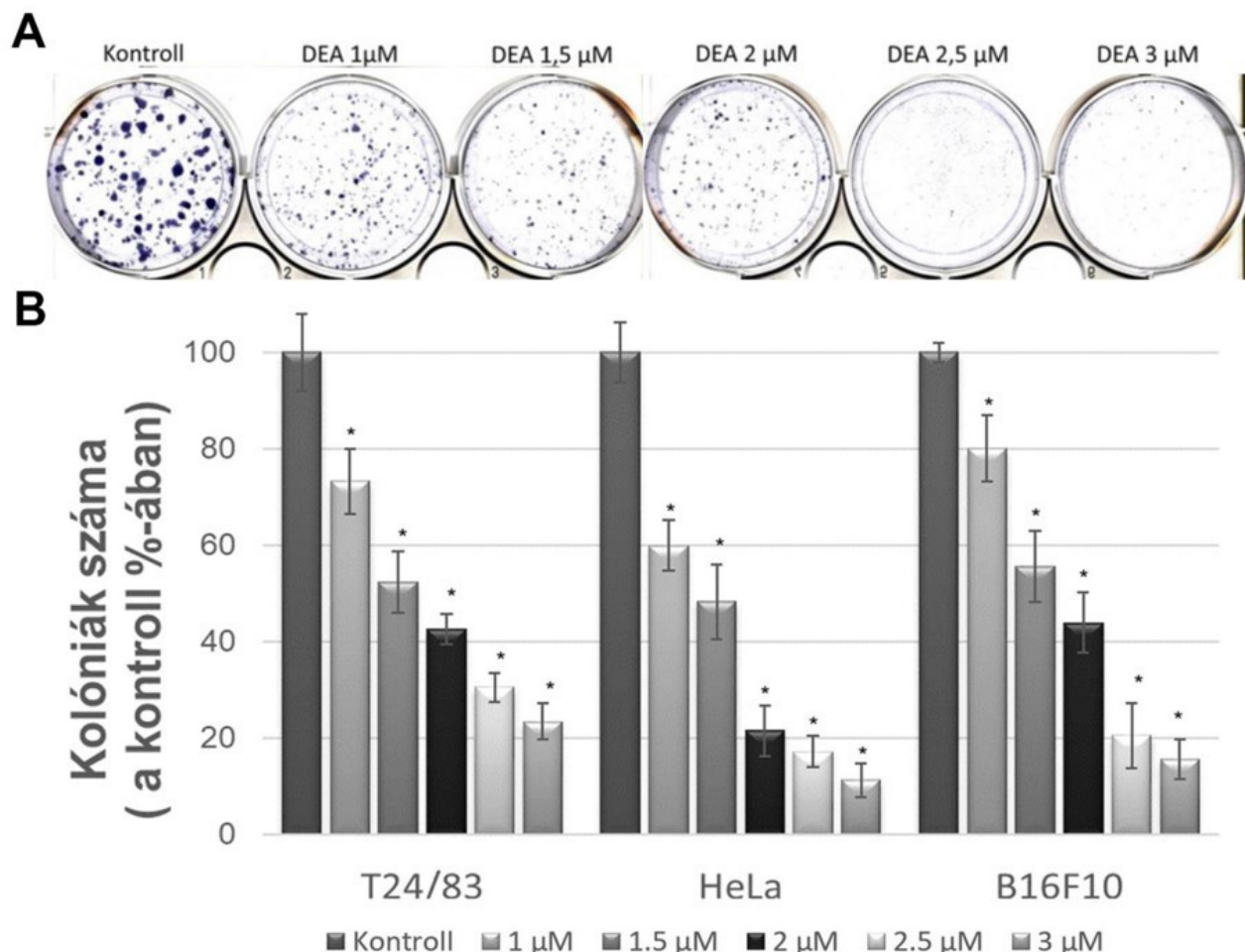


2. ábra. A dezetil-amiodaron (DEA) hatása különböző tumor sejtvonalak túlélésére. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük 24 és 48 órán keresztül, majd Sulforhodamine B assay-t végeztünk. Eredményeinket a kontrollok százalékában mutatjuk be. Az adatok az átlagok \pm SD-t reprezentálják, három független kísérletből, legalább négy párhuzamos minta alapján. *: $p < 0,05$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.

Megvizsgáltuk a DEA hatását a kolónia-formációra is. Ez a rendszer hosszabb, 7 napos inkubációt alkalmaz, és ennek megfelelően azt találtuk, hogy a DEA a túlélési kísérleteknél alkalmazotthoz képest jelentősen alacsonyabb, már 1 μM koncentrációban is hatékonyan gátolta a kolónia-formációt (3. ábra) [15-17].

A dezetil-amiodaronról kimutatták, hogy növeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt (ic $[\text{Ca}^{2+}]$) extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében és hiányában egyaránt, ami

azt bizonyítja, hogy az ic $[Ca^{2+}]$ extracelluláris, endoplazmatikus retikulumbeli és mitokondriális raktárakból származott [18]. A fokozott ic $[Ca^{2+}]$ -ról azt is kimutatták, hogy számos pro-apoptotikus útvonalat aktiválhat [19].

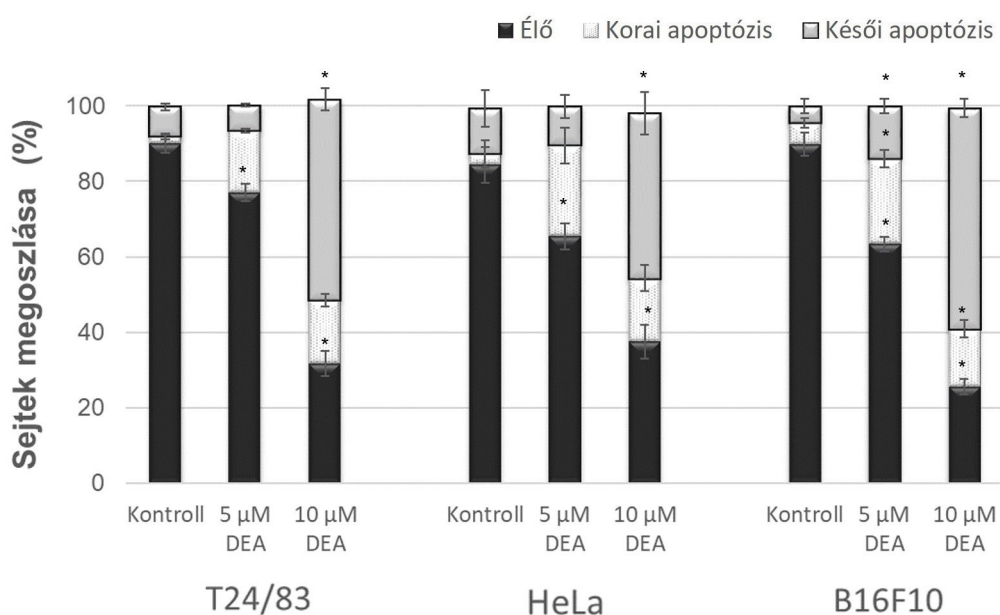


3. ábra. A DEA hatása a kolónia-formációra különböző tumor sejtvonalakban. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük hét napon keresztül, majd Coomassie Brilliant kék festést végeztünk. A kezeltetlen sejtek szolgáltak kontrollként. A) Repreratív fénykép a festett B16F10 melanóma kolóniákról. B) Oszlop diagram a kolóniák számáról T24/83 hólyagtumor, HeLa cervix karcinóma és B16F10 melanóma sejtvonalakban. Az adatok az átlagok \pm SD-t reprezentálják három független kísérletből, legalább 4 párhuzamos minta alapján. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontroll csoporthoz viszonyítva.

Ezen eredményekkel összhangban igazoltuk, hogy a DEA koncentrációfüggő módon indukálta az AIF sejtmagba való transzlokációját, ezzel is segítve az apoptotikus sejthalál kialakulását (4. ábra) [15-17].

A hólyagdaganat mutációs rátája nagyon magas, csak a tüdőrák és a melanóma előzi meg [10]. A magas mutációs ráta miatt a daganatképződés jól ismert és relatíve újonnan felismert útvonalait érintő mutációknak az előfordulása nagyon gyakori. Érintett lehet a sejtciklus, receptor-tirozinkinázok jelátvittele, Ras/

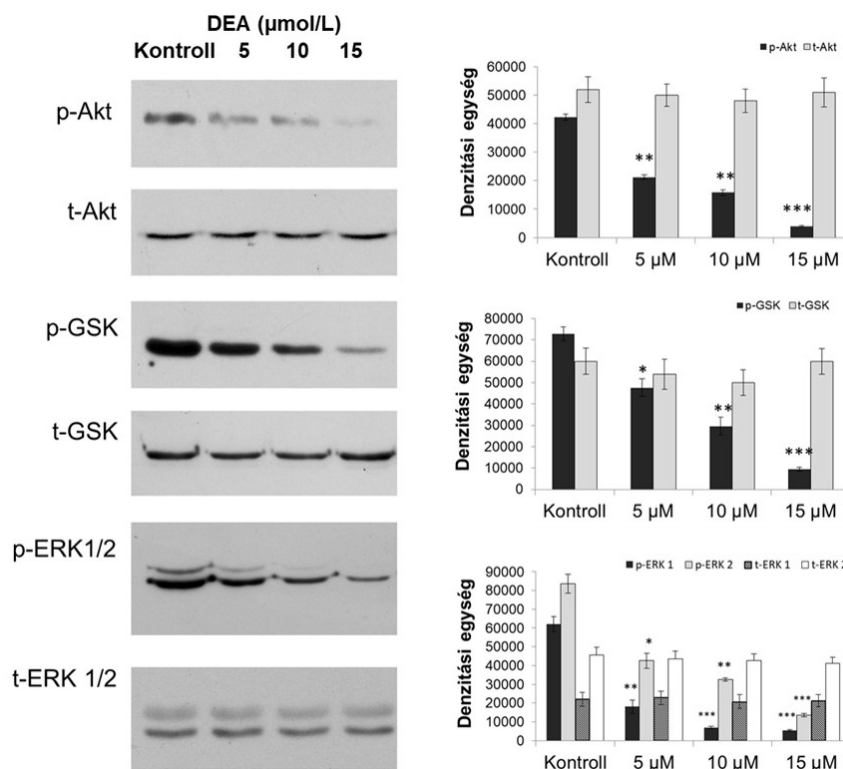
MAPK-út (Ras/mitogén aktivált protein kináz), PI3K/mTOR (foszfatidilinozitol-3-kináz/mammalian target of rapamycin)-útvonal, ezeken belül legfőképp a p16 (cyclin-dependens kináz inhibitor 2A), p53 (Tumor protein P53), RB1 (retinoblasztóma protein), TSC1 (tuberous sclerosis 1 gene) FGFR3 (fibroblast növekedési faktor receptor 3), PIK3CA (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz alfa katalitikus alegysége) gének [10].



4. ábra. A DEA hatása a sejthalál típusára különböző tumor sejtvonalakban. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük 24 órán át, majd a Muse® Annexin V & Dead Cell Reagent hozzáadása után a Muse® sejtanalizátorral vizsgáltuk. A grafikonokon a sejtek százalékos aránya van feltüntetve. A kezeletlen sejtek szolgáltak kontrollként. Az eredmények az átlag ± SD-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.

Az extracelluláris szignál által regulált kinázhoz (ERK) vezető jelátviteli útvonalak több daganattípusban túlzott aktivitást mutatnak, mely gyakran Ras-mutáció következménye [20]. A Ras-géneknek számos mutációja kimutatható a tumorképződés folyamata során. A T24 sejtvonalban túlzott mértékben expresszált Ras onkogén fehérje ismert proximális aktivátora a Raf/MEK/ERK (rapidly accelerated fibrosarcoma kináz/ mitogén-aktivált extracelluláris szignál-regulált kináz/ extracelluláris szignál-regulált kináz) és PI3K/Akt jelátviteli útvonalaknak [10, 20]. Az ERK-jelátvitelt támadó anyagok, például a Raf- vagy a MEK-inhibitorok jelentőst javulást hozhatnak bizonyos daganattípusokban [20]. Számos esetben a kezdeti válaszarány a betegség előrehaladtával csökken, az inhibitorok valamilyen módon hatástalanná válnak és többé nem képesek az ERK-út gátlására és sejthalál kiváltására [21]. Emiatt új, ERK-útvonalat más mechanizmussal gátló molekulák felfedezése innovatív,

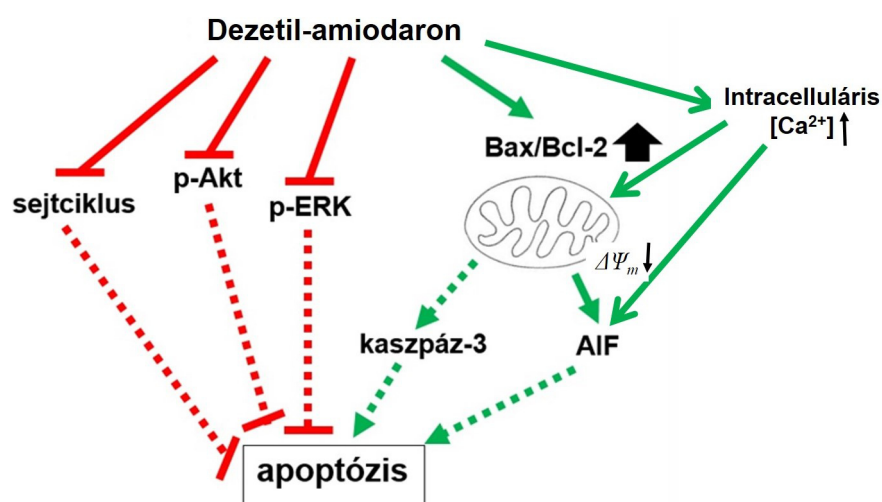
eredményes megközelítést jelenthetne. Az ERK-út sejtproliferációban betöltött kritikus szerepe miatt megvizsgáltuk, hogy a DEA a sejtproliferációt az ERK-útvonalon keresztül gátolja-e. Amint az 5. ábra mutatja, a DEA szignifikánsan gátolta az ERK foszforilációját [15, 16]. Ennek az erős mitogén szignálnak az inaktivációja felelősnek tűnik a dezetil-amiodaron antiproliferatív hatásáért.



5. ábra. A DEA hatása az Akt, GSK3B és ERK jelátviteli útvonalakra T24 sejteken. A T24 sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltünk 6 órán keresztül. Teljes sejt extraktumokat vizsgáltunk immunoblott technikával. Az eredményeket reprezentatív immunoblottok képei (bal oldal) és a blottok denzitometriás analízisén alapuló oszlopdiagramok (jobb oldal) mutatják. Az eredmények az átlag \pm SD három különböző kísérletről. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A PI3K-útvonal hiperaktivált vagy módosult számos daganattípusban, igen gyakran hólyagdaganatokban, melanómában is [10]. Az útvonalat sokféle extracelluláris szignál szabályozza, pl. mitogén növekedési faktorok, hormonok, nutriensek, sejt energiaszintek, stressz állapotok [22]. Aktiválhatják receptor-tirozinkinázok ligandjai, többek között az EGF, inzulin, IGF1 (Insulin-like növekedési faktor 1), VEGFA (Vasculáris endotheliális növekedési faktor A), PDGF (Platelet-derived növekedési faktor), így ez az útvonal daganatképződéshez hozzájáruló folyamatokat is szabályoz, például a túlélést, proliferációt, növekedést, metabolizmust, angiogenezist, végül metasztázisképződést és terápiarezisztenciát. A PI3K-útvonal más jelátviteli útvonalakkal is együtt-

működik, elsősorban az előbb említett RAF/MEK/ERK útvonallal [22]. Mind a hólyag tumor, mind a melanóma, valamint a cervix carcinoma sejtvonalon az Akt (Protein kináz B) foszforilációjában szignifikáns csökkenését mutattunk ki (5. ábra) [15-17]. Az Akt kiváltja a GSK3B (Glikogén szintáz kináz-3 β) inaktíváló foszforilációját, ami meggátolja a GSK3B célfehérje által történő β -katenin bontást; ezzel fokozott β -katenin nukleáris transzlokációt engedve, ami a sejtproliferáció és a túlélés fokozásához vezet. Megvizsgáltuk, hogy a DEA - kiváltotta csökkent Akt-foszforiláció okoz-e változást a GSK3B foszforilációjában és azt találtuk, hogy 10-15 μ M koncentrációjú dezetil-amiodaron kezelés hatására a csökkent Akt-foszforilációt csökkent GSK3B foszforiláció kísérte (5. ábra) [15-17]. Az ERK és az Akt aktivációjáról kimutatták, hogy hozzájárulnak a survivin expresszióhoz és a metasztatikus progresszióhoz, így mindkét útvonal gátlása csökkenthetné a citosztatikum-rezisztenciát és a metasztázis-hajlamot [23]. A DEA mindkét kináz gátlása által olyan daganatellenes szer lehetne, amely a metasztázisképzést megelőzheti, és a kemorezisztenciát legyőzheti (6. ábra).

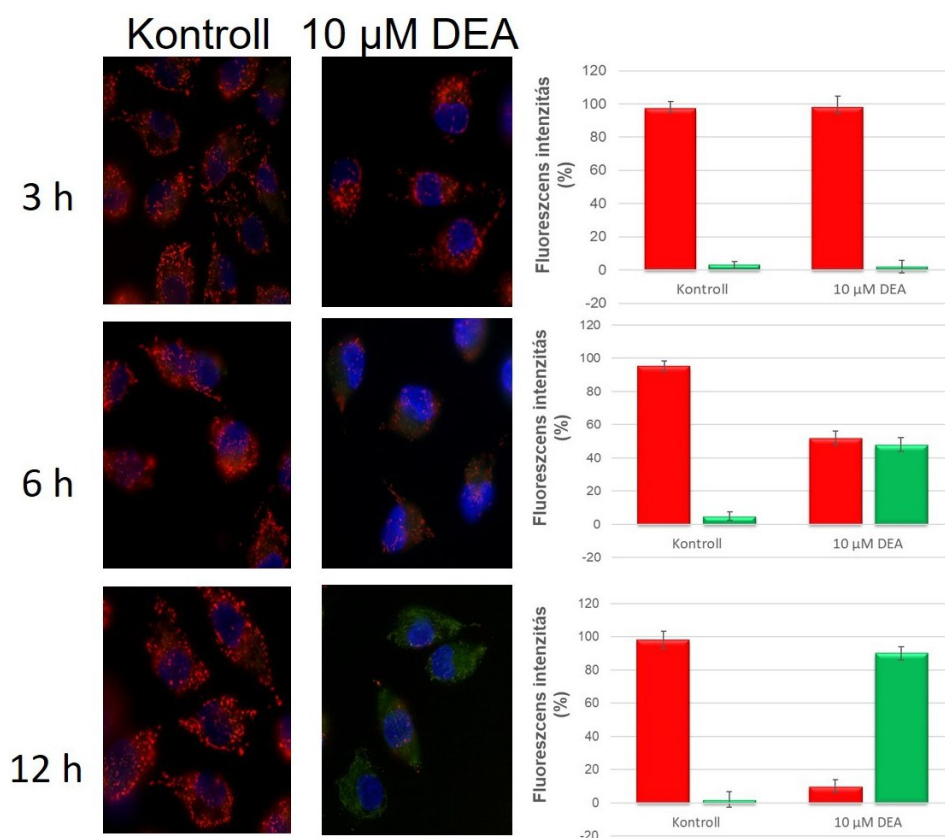


6. ábra. A DEA apoptózisra gyakorolt hatásában résztvevő mechanizmusok sémája. A piros, tompa nyilak gátlást, a zöld, hegyes nyilak aktiválást jelentenek. A fekete nyilak vastagságukkal arányos növekedést, illetve csökkenést mutatnak. A folyamatos vonalak saját eredményeken, a szaggatottak irodalmi adatokon alapulnak. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A mitokondriumok többféle módon járulnak hozzá a karcinogenezishez, a tumor túléléséhez és az áttétek képződéséhez. Fiziológias körülmények között a légzési lánc, amely a belső mitokondriális membránban (IMM) található, felelős az ATP termelés jelentős részéért; emellett hatalmas ROS forrás is, amely szintén hozzájárul különböző betegségek, mint például a daganatos megbetegedések kialakulásához [24]. Az ATP szintézis mozgatórugójaként betöltött szerepe mellett a mitokondriális membránpotenciál alapvető szerepet

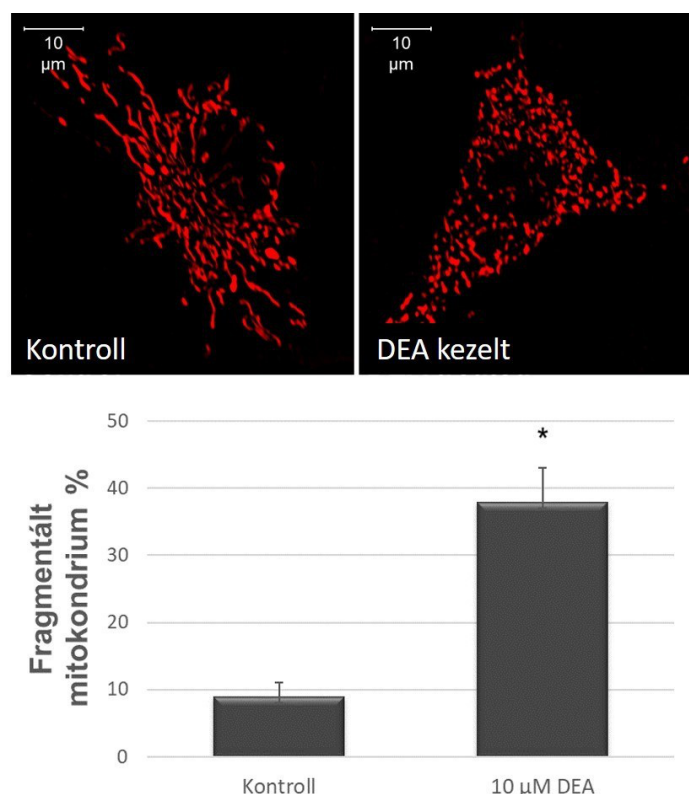
játszik a sejtmagban kódolt mitokondriális fehérjék, valamint kationok, például a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ; szállításában, a ROS generációban, a mitokondriális hálózatok dinamikájának fenntartásában és a pro-apoptotikus intermembrán fehérjék felszabadulásának szabályozásában.

A mitokondriális membránpotenciál fenntartása annyira fontos a sejtek túlélése szempontjából, hogy ischaemiás helyzetekben a F_0F_1 ATPáz fordított üzemmódban is tud működni, így a sejt megmentése érdekében nem ATP-t szintetizál, hanem ATP-t fogyaszt. Ilyen esetben a nem glükóz szubsztrátok szubsztrát szintű foszforilációja biztosítja az ATP-t az F_0F_1 ATPáz számára, ezáltal biztosítva a túlélés lehetőségét [25, 26]. Mivel a tumorsejtek állandó, részleges ischaemiás állapotban léteznek, amelyhez a citoplazmatikus és mitokondriális anyagcsereutaknak alkalmazkodniuk kell, az olyan gyógyszerek, melyek a tumorsejtek anyagcseréjét zavarják, terápiás értékűek lehetnek.



7. ábra. A DEA hatása a mitokondriális membránpotenciálra T24/83 hólyagtumor sejtvonalban. A sejteket 10 μ M DEA -val kezeltük 3, 6 és 12 órán keresztül. A mitokondriális membrán depolarizációt 1 μ M JC-1 membránpotenciál-érzékeny fluoreszcens festékkel mutattuk ki. A zöld és piros fluoreszcens képeket digitális fényképezőgéppel felszerelt fluoreszkáló mikroszkóp segítségével készítettük, majd egy-egy képpé alakítottuk. A) A fluoreszcens intenzitásokat oszlopdiagramokon mutatjuk be. B) Az eredmények az átlag \pm SD-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. ***: $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A DEA a mitokondriális membránpotenciált koncentrációfüggő módon csökkentette mind a T24/83, mind a B16F10 melanóma sejtvonalon (7. ábra) [15-17], mely megállapítás összhangban van a korábban közölt izolált máj és patkány mitokondriumokon kapott eredményeinkkel. Továbbá, a DEA ezen hatása a fenti irodalmi adatok és a pro-apoptotikus fehérjék kiáramlására vonatkozó saját adataink alapján hozzájárulhat a tumorsejtek apoptotikus pusztításához (6. ábra).



8. ábra. A DEA hatása a mitokondriális hálózat fragmentációjára B16F10 melanóma sejtvonalban. A mitochondria-targeted red fluorescent protein (mtRFP) transzfektált sejteket 5-10 μM DEA-val kezeltük 3 órán át. A mitokondriális fragmentációt fluoreszcens mikroszkópos képek alapján határoztuk meg (fent). Reprezentatív fluoreszcens képek mellett a mitokondriális fragmentáció mértékét %-ban kifejezve oszlopdiaagramokon mutatjuk be (lent). Az eredmények az átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$. [28] cikk alapján átszerkesztve.

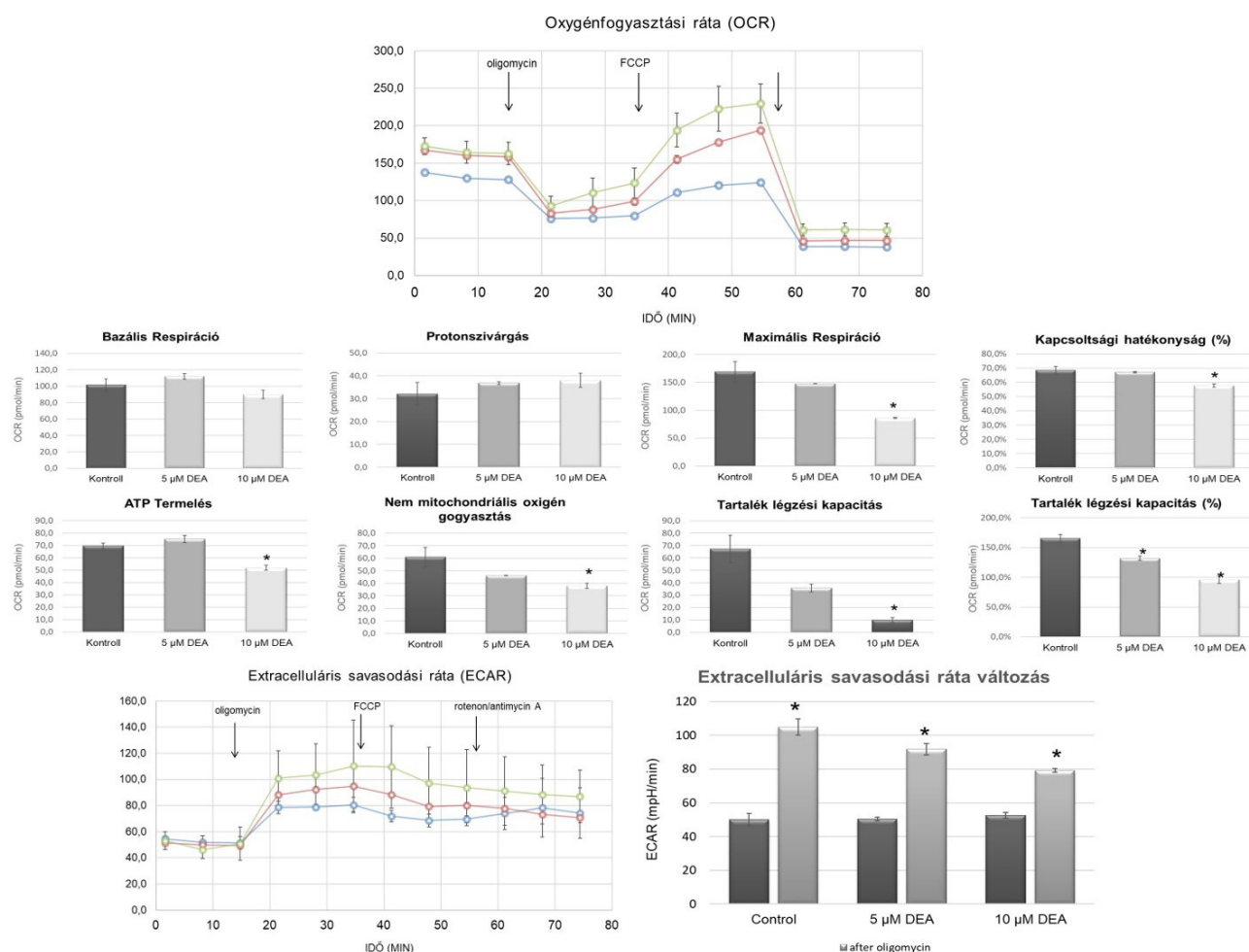
A mitokondriális hálózat dinamikája fontos szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben, a sejtek energia- és anyagcsereigényének kielégítésében és a mitokondriális minőség ellenőrzésben. E feladatok ellátásához a mitokondriális fúziós és fissziós folyamatok egyensúlyban tartására van szükség, melyben főként az intracelluláris jelátviteli folyamatoknak van szerepe. Azonban a mitokondriális membránpotenciál is döntő szerepet játszik ennek az egyensúlynak a kialakításában, mivel egy bizonyos membránpotenciál küszöb alatt a fúziós folyamat nem jön létre, ennek megfelelően sok daganat közös

jellemzője a túlzott mitokondriális hasadás [27]. Habár a mitokondriális hasadás nem feltétlenül vezet apoptotikus sejthalálhoz, a fragmentált mitokondriumok hajlamosabbak a sérülésekre és mitofágia általi elpusztulásra. Ez a folyamat a mitokondriumok DNS kópiaszámának csökkenéséhez vezethet, amit megfigyelhetünk különböző rosszindulatú daganatok, köztük asztrocitómák, prosztatarák, valamint emlő-, vastagbél- és hepatocelluláris karcinómák esetében [27]. Ennek megfelelően a DEA mitokondriális hasadást indukáló hatása (8. ábra) [28] hozzájárulhat citotoxikus tulajdonságaihoz (6. ábra). A fokozott mitokondriális fragmentáció a megnövekedett hasadás vagy a csökkent fúzió eredménye.

Tekintettel arra, hogy a fúzió megköveteli az intakt mitokondriális membránpotenciált [29] és a DEA azt károsította, valószínűnek tűnik, hogy a DEA mitokondriális hasadást okozó hatása a fúzió gátlásával magyarázható. Az Opa1 (optic atrophy 1) fehérje felelős a belső mitokondriális membrán (BMM) fúziójáért és a kriszták morfológiájának fenntartásában is részt vesz [29]. A fehérje rövid és hosszú izoformái általában egyensúlyban vannak és a BMM-hoz kapcsolódnak. Amikor viszont különböző hatások zavarják a mitokondriális membránpotenciált és/vagy permeabilizálják a külső mitokondriális membránt, ez az egyensúly felbomlik, és a fehérje kiszabadul a citoszolba [30]. A DEA 10 μM koncentrációban az Opa1 felszabadulását idézte elő a citoszolba, jelezve, hogy a mitokondriális fragmentációt indukáló hatásáért a mitokondriális fúzió gátlása és nem a pedig a fisszió indukálása felelős [28].

A rákos sejtek többnyire akkor is a szubsztrát szintű foszforiláción alapuló ATP-termelésre hagyatkoznak, ha a mitokondriális ATP-szintézishez elegendő mennyiségű oxigén áll a rendelkezésükre. Ez az ún. Warburg- effektus [31] az agresszív, citosztatikum rezisztens, metasztatizáló ráksejtek vagy a rák őssejtek nagyobb mértékben támaszkodnak a mitokondriális energiatermelésre [32, 33, 34]. Ezekben a sejtekben a metabolizmusnak egyszerre kell megfelelni azoknak a kihívásoknak, amelyeket a gyors osztódáshoz szükséges anyagmennyiség és energia egyidőben történő előállítására támaszt. Ennek érdekében a sejtek nagyon kiélezett módon alakítják át a metabolizmusukat, amely sebezhetővé teszi őket mitokondriális támadáspontú, a metabolizmusukat megzavaró vegyületekkel szemben. Eredményeink alapján a DEA kielégíti az ilyen típusú vegyületekkel szemben támasztott követelményeket, mivel csökkenti mind az oxidatív, mind a fermentatív energiatermelést (9. ábra) [28].

Az in vitro eredmények birtokában elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a DEA metasztázisképzésre gyakorolt hatását in vivo is, egy kísérletes egér tüdőmetasztázis-modell segítségével. Megállapítottuk, hogy a DEA kezelés csökkentette a tüdők felszínén kialakuló tumornodulusok számát, a tüdők tömegének növekedését és a készült metszetekben számolt tumoros tüdőterület százalékos arányát (10. ábra) [15].

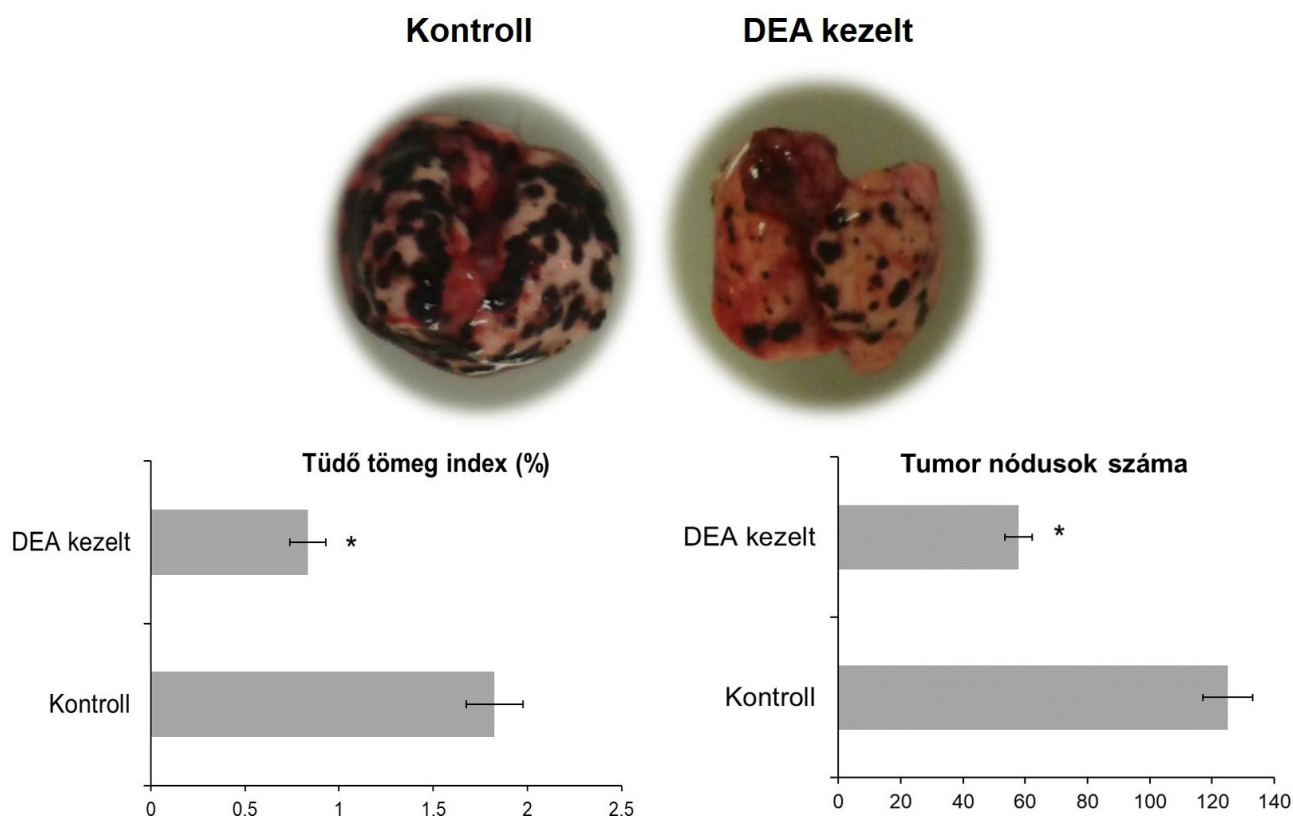


9. ábra. DEA hatása B16F10 melanóma sejtek energia-metabolizmusára. A sejteket 5 vagy 10 μM DEA-val kezeltük 3 órán át, majd az OCR -t és az ECAR -t 75 percig monitoroztuk Agilent Seahorse XFp Analyzer segítségével. A bazális respiráció, protonszivárgás, kapcsoltsági hatékonyság, maximális respiráció, ATP-termelés, nem-mitokondriális oxigénfogyasztás és tartalék légzési kapacitás értékek változását oszlopdiaqramok segítségével mutatjuk be. Az eredmények az átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$. [28] cikk alapján átszerkesztve.

Ezen felül a kontroll csoporthoz képest befolyásolta a tumorsejtek megoszlását is a tüdőben [15]. Ezen tulajdonságok arra utalnak, hogy a DEA gátolta a metasztázisképzés folyamatát, ami nagy jelentőséggel bír egy potenciális tumorellenes szer esetén, hiszen a gyógyszerek e csoportjának (különösen a késői stádiumú esetekben) a daganatsejtek elpusztítása mellett egyik legfon-

tosabb feladata az áttétképződés gátlása, lassítása, megakadályozása.

Összefoglalva, a DEA több úton keresztül indukálja a tumorsejtek apoptózist, a sejtciklus leállítását, az AIF nukleáris transzlokációját, a PARP-1 hasítást, a Bax/Bcl-2 arány emelkedését, a kaszpáz-3 hasítást és az ERK és Akt citoprotektív utak gátlását.



10. ábra. DEA hatása B16F10 melanóma sejtvonal tüdő áttét képzésére. Tüdőáttétek kialakulását C57BL/6 egerek laterális farokvénájába injektált B16F10 sejtek segítségével vizsgáltuk. 24 órával a B16F10 sejtek beadása után, az állatokat minden 3. napon, 16 napon át, intraperitoneálisan 25 mg/kg DEA -val kezeltük (6 egér/csoport). A reprezentatív fotók mellett az ábrán a tüdő tömeg index-et (%) és a tüdőfelszínen található tumor nódusok számát mutatjuk be oszlopdiaagramok segítségével. Az eredmények az átlag \pm SD-ként vannak feltüntetve *: $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. [15] cikk alapján átszerkesztve.

Továbbá, mitokondriális hatásai következtében hatékonyan korlátozhatja metasztatizáló sejtek proliferációját és áttétképző képességét. In vitro hatékony koncentráció-tartománya alapján az AM kezelés terápiás dózisában eredményes lehet citosztatikum-rezisztens tumorok klinikai kezelésében, amely esetben az engedélyezést megelőző biztonsági vizsgálatok feleslegessé válhatnak, vagy jelentősen lerövidülhetnek.

Irodalomjegyzék

[1] Herold, G. és mtsai. (2017) Belgyógyászat. (Medicina Könyvkiadó Zrt.,

Budapest).

- [2] Gyires, K., Fürst, Zs., Ferdinandy P. (2017) Farmakológia és klinikai farmakológia. (*Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest*).
- [3] Soyama, A., Hanioka, N., Saito, Y., Murayama, N., Ando, M., Ozawa, S., Sawada, J. (2002) Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8*3 and CYP2C8 P404A. *Pharmacol Toxicol*, **91**: (4) 174-8.
- [4] Zahno, A., Brecht, K., Morand, R., Maseneni, S., Torok, M., Lindinger, P.W., Krahenbuhl, S. (2011) The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*, **81**: (3) 432-41.
- [5] Ghovanloo, M.R., Abdelsayed, M., Ruben, P.C. (2016) Effects of Amiodarone and N-desethylamiodarone on Cardiac Voltage-Gated Sodium Channels. *Front Pharmacol*, **7**: 39.
- [6] Pallandi, R.T., Campbell, T.J. (1987) Resting, and rate-dependent depression of Vmax of guinea-pig ventricular action potentials by amiodarone and desethylamiodarone. *Br J Pharmacol*, **92**: (1) 97-103.
- [7] Kashima, A., Funahashi, M., Fukumoto, K., Komamura, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Ueno, K. (2005) Pharmacokinetic characteristics of amiodarone in long-term oral therapy in Japanese population. *Biol Pharm Bull*, **28**: (10) 1934-8.
- [8] Adams, P.C., Holt, D.W., Storey, G.C., Morley, A.R., Callaghan, J., Campbell, R.W. (1985) Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation*, **72**: (5) 1064-75.
- [9] Brien, J.F., Jimmo, S., Brennan, F.J., Ford, S.E., Armstrong, P.W. (1987) Distribution of Amiodarone and Its Metabolite, Desethylamiodarone, in Human-Tissues. *Can J Physiol Pharm*, **65**: (3) 360-364.
- [10] Kim, J., Akbani, R., Creighton, C.J., Lerner, S.P., Weinstein, J.N., Getz, G., Kwiatkowski, D.J. (2015) Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clin Cancer Res*, **21**: (20) 4514-24.
- [11] Maverakis, E., Cornelius, L.A., Bowen, G.M., Phan, T., Patel, F.B., Fitzmaurice, S., He, Y., Burrall, B., Duong, C., Kloxin, A.M., Sultani, H., Wilken, R., Martinez, S.R., Patel, F. (2015) Metastatic Melanoma - A Review of Current and Future Treatment Options. *Acta Derm-Venereol*, **95**: (5) 516-524.
- [12] Gross, S.A., Bandyopadhyay, S., Klaunig, J.E., Somani, P. (1989) Amiodarone and Desethylamiodarone Toxicity in Isolated Hepatocytes in Culture. *P Soc Exp Biol Med*, **190**: (2) 163-169.
- [13] Roth, F.C., Mulder, J.E., Brien, J.F., Takahashi, T., Massey, T.E. (2013)

- Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. *Chem-Biol Interact*, **204**: (3) 135-139.
- [14] Varbiro, G., Toth, A., Tapodi, A., Bognar, Z., Veres, B., Sumegi, B., Gallyas, F., Jr. (2003) Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**: (2) 615-25.
- [15] Bognar, Z., Cseh, A.M., Fekete, K., Antus, C., Bognar, R., Tapodi, A., Ramadan, F.H.J., Sumegi, B., Gallyas, F., Jr. (2020) Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone inhibits proliferation of B16-F10 melanoma cells and limits lung metastasis formation in an in vivo experimental model. *PLoS One*, **15**: (9) e0239088.
- [16] Bognar, Z., Fekete, K., Antus, C., Hocsak, E., Bognar, R., Tapodi, A., Boronkai, A., Farkas, N., Gallyas, F., Jr., Sumegi, B., Szanto, A. (2017) Desethylamiodarone-A metabolite of amiodarone-Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PLoS One*, **12**: (12) e0189470.
- [17] Bognar, Z., Fekete, K., Bognar, R., Szabo, A., Vass, R.A., Sumegi, B. (2018) Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone, induces apoptosis in human cervical cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol*, **96**: (10) 1004-1011.
- [18] Himmel, H.M., Dobrev, D., Grossmann, M., Ravens, U. (2000) N-desethylamiodarone modulates intracellular calcium concentration in endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **362**: (6) 489-96.
- [19] Monni, L., Ghezzi, F., Corsini, S., Nistri, A. (2017) Neurotoxicity of propofol on rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Neurosci Lett*, **655**: 95-100.
- [20] Knowles, M.A., Hurst, C.D. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, **15**: (1) 25-41.
- [21] Samatar, A.A., Poulidakos, P.I. (2014) Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, **13**: (12) 928-42.
- [22] Costa, C., Pereira, S., Lima, L., Peixoto, A., Fernandes, E., Neves, D., Neves, M., Gaitero, C., Tavares, A., Gil da Costa, R.M., Cruz, R., Amaro, T., Oliveira, P.A., Ferreira, J.A., Santos, L.L. (2015) Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS One*, **10**: (11) e0141253.

- [23] Ye, Q., Cai, W., Zheng, Y., Evers, B.M., She, Q.B. (2014) ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene*, **33**: (14) 1828-39.
- [24] Garcia-Sanchez, A., Miranda-Diaz, A.G., Cardona-Munoz, E.G. (2020) The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, **2020**: 2082145.
- [25] Chinopoulos, C. (2020) Acute sources of mitochondrial NAD(+) during respiratory chain dysfunction. *Exp Neurol*, **327**: 113218.
- [26] Chinopoulos, C., Seyfried, T.N. (2018) Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro*, **10**: 1759091418818261.
- [27] Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., Avadhani, N.G. (2017) Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1858**: (8) 602-614.
- [28] Ramadan, F.H.J., Szabo, A., Kovacs, D., Takatsy, A., Bognar, R., Gallyas, F., Jr., Bognar, Z. (2020) Involvement of Mitochondrial Mechanisms in the Cytostatic Effect of Desethylamidarone in B16F10 Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*, **21**: (19).
- [29] Panek, T., Elias, M., Vancova, M., Lukes, J., Hashimi, H. (2020) Returning to the Fold for Lessons in Mitochondrial Crista Diversity and Evolution. *Curr Biol*, **30**: (10) R575-R588.
- [30] Szabo, A., Sumegi, K., Fekete, K., Hocsak, E., Debreceni, B., Setalo, G., Jr., Kovacs, K., Deres, L., Kengyel, A., Kovacs, D., Mandl, J., Nyitrai, M., Febbraio, M.A., Gallyas, F., Jr., Sumegi, B. (2018) Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. *Biochem Pharmacol*, **150**: 86-9
- [31] Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124, 269–270.
- [32] LeBleu, V.S.; O’Connell, J.T.; Gonzalez Herrera, K.N.; Wikman, H.; Pantel, K.; Haigis, M.C.; de Carvalho, F.M.; Damascena, A.; Domingos Chinen, L.T.; Rocha, R.M.; Asara J.M; Kalluri R. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2014, 16, 992–1003
- [33] Lin, C.S.; Liu, L.T.; Ou, L.H.; Pan, S.C.; Lin, C.I.; Wei, Y.H. Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2018, 39, 316–330.
- [34] Ashton, T. M.; McKenna, W. G.; Kunz-Schughart, L. A.; Higgins, G. S.,

Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. Clin Cancer Res 2018, 24, (11), 2482-2490.



Bognár Zita 1977-ben született Pécsen. 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 hatásaikat. Jelenleg a dezetil-amiodaron tumor ellenes hatásának vizsgálatával foglalkozik, mely témában több Q1-es cikkel, valamint USA és EU szabadalommal rendelkezik.

ÚJ ROVAT FELHÍVÁSA

A Biokémia folyóiratban meg kívánjuk jelentetni a tagtársaink által írt, jelentős nemzetközi folyóiratokban megjelent angol nyelvű áttekintő (review) cikkeket. Biztosak vagyunk benne, hogy ez lehetővé tenné a hazai laboratóriumokban művelt témák jobb megismerését, anélkül, hogy a szerzőknek bármilyen külön munkát jelentene.

A Biokémiában a megjelenés formája az első oldal pdf változata (amennyiben ezt a folyóirat engedi) és egy, a cikkhez vezető link lenne.

A beküldés folyamatos.

A review-k gyűjtését, szerkesztését Sarkadi Balázs vállalta, az első oldal pdf-et és a linket számára (sarkadi@biomembrane.hu) kérjük elküldeni.

A Biokémia szerkesztőbizottsága

ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL, 2020-2021.

(Szerkesztette: Sarkadi Balázs)

A szerzők által 2021. szeptember 1-ig beküldött cikkek (a közlemények első oldala is mellékelve):

<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.12.002>.

Szabó, K., Miskei, M., Farkas, I., Dombrádi, V. (2021) The phosphatome of opportunistic pathogen *Candida* species. *Fungal Biol Rev* 35:40-51. IF: 4.806

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.13947>

Sarkadi, B., Homolya, L., Hegedűs, T. (2020) The ABCG2/BCRP transporter and its variants - from structure to pathology. *FEBS Lett* 594(23):4012-4034. IF: 4.124

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.13935>

Thomas, C., Aller, S.G., Beis, K., Carpenter, E.P., Chang, G., Chen, L., Dassa, E., Dean, M., Duong Van Hoa, F., Ekiert, D., Ford, R., Gaudet, R., Gong, X., Holland, I.B., Huang, Y., Kahne, D.K., Kato, H., Koronakis, V., Koth, C.M., Lee, Y., Lewinson, O., Lill, R., Martinoia, E., Murakami, S., Pinkett, H.W., Poolman, B., Rosenbaum, D., Sarkadi, B., Schmitt, L., Schneider, E., Shi, Y., Shyng, S.L., Slotboom, D.J., Tajkhorshid, E., Tieleman, D.P., Ueda, K., Váradi, A., Wen, P.C., Yan, N., Zhang, P., Zheng, H., Zimmer, J., Tampé, R. (2020) Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters. *FEBS Lett* 594(23):3767-3775. IF: 4.124

https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2020.8024?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&

Smolková, K., Mikó, E., Kovács, T., Leguina-Ruzzi, A., Sipos, A., Bai, P. (2020) Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Regulating Cancer Metabolism. *Antioxid Redox Signal* 33(13):966-997. IF: 8.41

<http://genesdev.cshlp.org/lookup/pmidlookup?view=long&pmid=32029456>

Szántó, M., Bai, P. (2020) The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism. *Genes Dev* 34(5-6):321-340. IF: 11.631

<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15137>

Curtin, N., Bányai, K., Thaventhiran, J., Le Quesne, J., Helyes, Z., Bai, P. (2020) Repositioning PARP inhibitors for SARS-CoV-2 infection (COVID-19); a new multi-pronged therapy for acute respiratory distress syndrome? *Br J Pharmacol* 177(16):3635-3645. IF: 8.739

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00752>

Szabó, Z., Marosvölgyi, T., Szabó, E., Bai, P., Figler, M., Verzár, Z. (2020) The Potential Beneficial Effect of EPA and DHA Supplementation Managing Cytokine Storm in Coronavirus Disease. *Front Physiol* 11:752-757. IF: 4.566

<https://www.mdpi.com/2072-6694/12/5/1068>

Kiss, B., Mikó, E., Sebő, E., Toth, J., Ujlaki, G., Szabó, J., Uray, K., Bai, P., Árkosy, P. (2020) Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 12(5):1068-1095. IF: 6.639

<https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10020-021-00295-2>

Sipos, A., Ujlaki, G., Mikó, E., Maka, E., Szabó, J., Uray, K., Krasznai, Z., Bai, P. (2021) The role of the microbiome in ovarian cancer: mechanistic insights into oncobiosis and to bacterial metabolite signaling. *Mol Med* 27(1):33-53. IF: 6.354

<https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030118>

Orosz, F. (2021) Apicortin, a Constituent of Apicomplexan Conoid/Apical Complex and Its Tentative Role in Pathogen—Host Interaction. *Trop Med Infect. Dis* 6:118-130. IF: 2.126

A figyelem felkeltése érdekében, a PUBMED-en elérhető, biokémia-biofizika-molekuláris biológia, esetleg átfedően élettani vagy orvosi tárgyú, mintegy 600 Review cikkből, amelynek magyar szerzője (is) volt, az alábbi, meglehetősen véletlenszerű és szubjektív, időrendbe tett válogatást illeszttem még ide.

Igyekeztem azokat a közleményeket válogatni, ahol a meghatározó szerző hazai affiliációval rendelkezik – persze a válogatásért minden felelősséget vállalok. A felhozatal mindenképpen impresszionáló!

Szívesen várom, hogy a szerzők által beküldött gyűjteménybe is beilleszthessem azokat, amelyeket a szerzők javasolnak!

Szántó, M., Gupte, R., Kraus, W.L., Pacher, P., Bai, P. (2021) PARPs in lipid metabolism and related diseases. *Prog Lipid Res* 101117-101141.

Lengyel, M., Enyedi, P., Czirják, G. (2021) Negative Influence by the Force: Mechanically Induced Hyperpolarization via K_{2P} Background Potassium Channels. *Int J Mol Sci* 22(16):9062-9089.

Makkos, A., Ágg, B., Petrovich, B., Varga, Z.V., Görbe, A., Ferdinandy, P. (2021) Systematic review and network analysis of microRNAs involved in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury and infarction: Involvement of redox signalling. *Free Radic Biol Med* 172:237-251.

Lukácsi, S., Farkas, Z., Saskó, É., Bajtay, Z., Takács-Vellai, K. (2021) Conserved and Distinct Elements of Phagocytosis in Human and *C. elegans*. *Int J Mol Sci* 22(16):8934-8960.

Szekanecz, Z., McInnes, I.B., Schett, G., Szamosi, S., Benkő, S., Szűcs, G. (2021) Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat Rev Rheumatol* 17(10):585-595.

Koók, L., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Bakonyi, P. (2021) The influential role of external electrical load in microbial fuel cells and related improvement strategies: A review. *Bioelectrochemistry* 140:107749-107757.

Berkecz, R., Németi, G., Péter, A., Ilisz, I. (2021) Liquid Chromatographic Enantioseparations Utilizing Chiral Stationary Phases Based on Crown Ethers and Cyclofructans. *Molecules* 26(15):4648-4667.

Nánási, P.P., Horváth, B., Tar, F., Almássy, J., Szentandrassy, N., Jost, N., Baczkó, I., Bányász, T., Varró, A. (2021) Canine Myocytes Represent a Good Model for Human Ventricular Cells Regarding Their Electrophysiological Properties. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(8):748-762.

Szikora, S., Görög, P., Kozma, C., Mihály, J. (2021) *Drosophila* Models

Rediscovered with Super-Resolution Microscopy. *Cells* 10(8):1924-1946.

Piccinni, M.P., Raghupathy, R., Saito, S., Szekeres-Bartho, J. (2021) Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol* 12:717808-717822.

Tanaka, M., Török, N., Tóth, F., Szabó, Á., Vécsei, L. (2021) Co-Players in Chronic Pain: Neuroinflammation and the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines* 9(8):897-915.

Péter, C., Nagy, F., Viczián, A. (2021) SUMOylation of different targets fine-tunes phytochrome signaling. *New Phytol* doi: 10.1111/nph.17634. Epub ahead of print.

Norris, V., Ovádi, J. (2021) Role of Multifunctional Cytoskeletal Filaments in *Coronaviridae* Infections: Therapeutic Opportunities for COVID-19 in a Nutshell. *Cells* 10(7):18181828.

Majer-Baranyi, K., Adányi, N., Székács, A. (2021) Biosensors for Deoxynivalenol and Zearalenone Determination in Feed Quality Control. *Toxins (Basel)* 13(7):499-516.

Szabó, G., Antal-Szalmás, P., Kerényi, A., Péntes, K., Bécsi, B., Kappelmayer, J. (2021) Laboratory Approaches to Test the Function of Antiphospholipid Antibodies. *Semin Thromb Hemost* doi: 10.1055/s-0041-1730357. Epub ahead of print.

Gasanoff, E.S., Yaguzhinsky, L.S., Garab, G. (2021) Cardiolipin, Non-Bilayer Structures and Mitochondrial Bioenergetics: Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells* 10(7):1721-45.

Parisi, G., Palopoli, N., Tosatto, S.C.E., Fornasari, M.S., Tompa, P. (2021) "Protein" no longer means what it used to. *Curr Res Struct Biol* 3:146-152.

Kelemen, E., Bozó, R., Groma, G., Bata-Csörgő, Z., Kemény, L., Danis, J., Széll, M. (2021) The Psoriatic Nonlesional Skin: A Battlefield between Susceptibility and Protective Factors. *J Invest Dermatol* 1:S0022-202X(21)01330-0. Epub ahead of print.

Pál, M., Szalai, G., Gondor, O.K., Janda, T. (2021) Unfinished story of polyamines: Role of conjugation, transport and light-related regulation in the polyamine metabolism in plants. *Plant Sci* 308:110923-110933.

Varró, A., Tomek, J., Nagy, N., Virág, L., Passini, E., Rodriguez, B., Baczkó, I. (2021) Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol Rev* 101(3):1083-1176.

Gallé, Á., Czékus, Z., Tóth, L., Galgóczy, L., Poór, P. (2021) Pest and disease management by red light. *Plant Cell Environ* doi: 10.1111/pce.14142. Epub ahead of print.

Szalontai, K., Gémes, N., Furák, J., Varga, T., Neuperger, P., Balog, J.Á., Puskás, L.G., Szebeni, G.J. (2021) Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers, and Paving the Way to Lung Cancer. *J Clin Med* 10(13):2889-2909.

Li, Q., Dudás, K., Tick, G., Haracska, L. (2021) Coordinated Cut and Bypass:

Replication of Interstrand Crosslink-Containing DNA. *Front Cell Dev Biol* 9:699966-699974.

Tanaka, M., Tóth, F., Polyák, H., Szabó, Á., Mándi, Y., Vécsei, L. (2021) Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines* 9(7):734-757.

Pálfi, P., Bakacsy, L., Kovács, H., Szepesi, Á. (2021) Hypusination, a Metabolic Posttranslational Modification of eIF5A in Plants during Development and Environmental Stress Responses. *Plants (Basel)* 10(7):1261-1273.

Megyeri, K., Dernovics, Á., Al-Luhaibi, Z.I.I., Rosztóczy, A. (2021) COVID-19-associated diarrhea. *World J Gastroenterol* 27(23):3208-3222.

Tátrai, P., Erdő, F., Dörnyei, G., Krajcsi, P. (2021) Modulation of Urate Transport by Drugs. *Pharmaceutics* 13(6):899-921.

Vigh, J.P., Kincses, A., Ozgür, B., Walter, F.R., Santa-Maria, A.R., Valkai, S., Vastag, M., Neuhaus, W., Brodin, B., Dér, A., Deli, M.A. (2021) Transendothelial Electrical Resistance Measurement across the Blood-Brain Barrier: A Critical Review of Methods. *Micromachines (Basel)* 12(6):685-703.

Sandi, D., Fricska-Nagy, Z., Bencsik, K., Vécsei, L. (2021) Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: Symptoms of Silent Progression, Biomarkers and Neuroprotective Therapy-Kynurenines Are Important Players. *Molecules* 26(11):3423-3451.

Fuxreiter, M., Vendruscolo, M. (2021) Generic nature of the condensed states of proteins. *Nat Cell Biol* 23(6):587-594.

Debreczeni, M.L., Németh, Z., Kajdácsi, E., Farkas, H., Cervenak, L. (2021) Molecular Dambusters: What Is Behind Hyperpermeability in Bradykinin-Mediated Angioedema? *Clin Rev Allergy Immunol* 60(3):318-347.

Gönczi, M., Dienes, B., Dobrosi, N., Fodor, J., Balogh, N., Oláh, T., Csernoch, L. (2021) Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 42(2):251-265.

Zádor, F., Joca, S., Nagy-Grócz, G., Dvoráckó, S., Szűcs, E., Tömböly, C., Benyhe, S., Vécsei, L. (2021) Pro-Inflammatory Cytokines: Potential Links between the Endocannabinoid System and the Kynurenine Pathway in Depression. *Int J Mol Sci* 22(11):5903-5922.

Bókkon, I., Kapócs, G., Vucskits, A., Erdőfi-Szabó, A., Vagedes, J., Scholkmann, F., Szőke, H. (2021) COVID-19: The significance of platelets, mitochondria, vitamin D, serotonin and the gut microbiota. *Curr Med Chem* doi:10.2174/0929867328666210526100147. *Epub ahead of print.*

Sipeki, S., Koprivanacz, K., Takács, T., Kurilla, A., László, L., Vas, V., Buday, L. (2021) Novel Roles of SH2 and SH3 Domains in Lipid Binding. *Cells* 10(5):1191-1203.

Nagy, K.K., Skurnik, M., Vértessy, B.G. (2021) Viruses with U-DNA: New Avenues for Biotechnology. *Viruses* 13(5):875-887.

Farkas, D., Madarász, L., Nagy, Z.K., Antal, I., Kállai-Szabó, N. (2021) Image Analysis: A Versatile Tool in the Manufacturing and Quality Control of

Pharmaceutical Dosage Forms. *Pharmaceutics* 13(5):685-707.

Sebestyén, A., Kopper, L., Dankó, T., Tímár, J. (2021) Hypoxia Signaling in Cancer: From Basics to Clinical Practice. *Pathol Oncol Res* 27:1609802-17.

Crul, T., Maléth, J. (2021) Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites as an Organizing Principle for Compartmentalized Calcium and cAMP Signaling. *Int J Mol Sci* 22(9):4703-4729.

Szollosi, A. (2021) Two Decades of Evolution of Our Understanding of the Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Cation Channel. *Life (Basel)* 11(5):397-420.

Demény, M.A., Virág, L. (2021) The PARP Enzyme Family and the Hallmarks of Cancer Part 2: Hallmarks Related to Cancer Host Interactions. *Cancers (Basel)* 13(9):2057-2078.

Demény, M.A., Virág, L. (2021) The PARP Enzyme Family and the Hallmarks of Cancer Part 1. Cell Intrinsic Hallmarks. *Cancers (Basel)* 13(9):2042-2057.

Balázs, K., Antal, L., Sáfrány, G., Lumniczky, K. (2021) Blood-Derived Biomarkers of Diagnosis, Prognosis and Therapy Response in Prostate Cancer Patients. *J Pers Med* 11(4):296-327.

Bálint, L., Jakus, Z. (2021) Mechanosensation and Mechanotransduction by Lymphatic Endothelial Cells Act as Important Regulators of Lymphatic Development and Function. *Int J Mol Sci* 22(8):3955-3973.

Békési, A., Holub, E., Pálinkás, H.L., Vértessy, B.G. (2021) Detection of Genomic Uracil Patterns. *Int J Mol Sci* 22(8):3902-3924.

Banfalvi, G. (2021) Prebiotic Pathway from Ribose to RNA Formation. *Int J Mol Sci* 22(8):3857-3869.

Molnár, P.J., Dér, B., Borsodi, K., Balla, H., Borbás, Z., Molnár, K., Ruisanchez, É., Kenessey, I., Horváth, A., Keszthelyi, A., Majoros, A., Nyirády, P., Offermanns, S., Benyó, Z. (2021) Isoprostanol evokes contraction of the murine and human detrusor muscle via activation of the thromboxane prostanoid TP receptor and Rho kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 320(4):F537-F547.

Zsidó, B.Z., Hetényi, C. (2021) The role of water in ligand binding. *Curr Opin Struct Biol* 67:1-8.

Orsolits, B., Kovács, Z., Kriston-Vizi, J., Merkely, B., Földes, G. (2021) New Modalities of 3D Pluripotent Stem Cell-Based Assays in Cardiovascular Toxicity. *Front Pharmacol* 12:603016-603026.

Turai, P.I., Nyírő, G., Butz, H., Patócs, A., Igaz, P. (2021) MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Pheochromocytoma/Paraganglioma. *Cancers (Basel)* 13(7):1522-1538.

László, L., Kurilla, A., Takács, T., Kudlik, G., Koprivanacz, K., Buday, L., Vas, V. (2021) Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells* 10(3):667-687.

Lipták, N., Gál, Z., Biró, B., Hiripi, L., Hoffmann, O.I. (2021) Rescuing lethal phenotypes induced by disruption of genes in mice: a review of novel strategies.

Physiol Res 70(1):3-12.

Sipos, P., Peles, F., Brassó, D.L., Béri, B., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Győri, Z. (2021) Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. *Toxins (Basel)* 13(3):204-321.

Hegyi, P.J., Vánca, S., Ocskay, K., Dembrowszky, F., Kiss, S., Farkas, N., Erőss, B., Szakács, Z., Hegyi, P., Pár, G. (2021) Metabolic Associated Fatty Liver Disease Is Associated With an Increased Risk of Severe COVID-19: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)* 8:626425-33.

Ponmozhi, J., Dhinakaran, S., Varga-Medveczky, Z., Fónagy, K., Bors, L.A., Iván, K., Erdő, F. (2021) Development of Skin-On-A-Chip Platforms for Different Utilizations: Factors to Be Considered. *Micromachines (Basel)* 12(3):294-319.

Homolya, L. (2021) Medically Important Alterations in Transport Function and Trafficking of ABCG2. *Int J Mol Sci* 22(6):2786-2806.

Patthy, L. (2021) Exon Shuffling Played a Decisive Role in the Evolution of the Genetic Toolkit for the Multicellular Body Plan of Metazoa. *Genes (Basel)* 12(3):382-395.

Kriszta, G., Kriszta, Z., Vánca, S., Hegyi, P.J., Frim, L., Erőss, B., Hegyi, P., Pethő, G., Pintér, E. (2021) Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers on Angiotensin-Converting Enzyme 2 Levels: A Comprehensive Analysis Based on Animal Studies. *Front Pharmacol* 12:619524-35.

Dénes, J., Korbonits, M. (2021) The clinical aspects of pituitary tumour genetics. *Endocrine* 71(3):663-674.

Tőke, J., Czirják, G., Enyedi, P., Tóth, M. (2021) Rare diseases caused by abnormal calcium sensing and signalling. *Endocrine* 71(3):611-617.

Bugya, Z., Prechl, J., Szénási, T., Nemes, É., Bácsi, A., Koncz, G. (2021) Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination. *Vaccines (Basel)* 9(2):174-198.

Dull, K., Fazekas, F., Törőcsik, D. (2021) Factor XIII-A in Diseases: Role Beyond Blood Coagulation. *Int J Mol Sci* 22(3):1459-1473

Szekeres, Z., Toth, K., Szabados, E. (2021) The Effects of SGLT2 Inhibitors on Lipid Metabolism. *Metabolites* 11(2):87-96.

Lee, S.C., Lin, K.H., Balogh, A., Norman, D.D., Bavaria, M., Kuo, B., Yue, J., Balázs, L., Benyó, Z., Tigyi, G. (2021) Dysregulation of lysophospholipid signaling by p53 in malignant cells and the tumor microenvironment. *Cell Signal* 78:109850-74.

Menyhárt, O., Győrffy, B. (2021) Multi-omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Comput Struct Biotechnol J* 19:949-960.

Cserép, C., Pósfai, B., Dénes, Á. (2021) Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109(2):222-240.

Máthé, C., M-Hamvas, M., Freytag, C., Garda, T. (2021) The Protein Phosphatase

PP2A Plays Multiple Roles in Plant Development by Regulation of Vesicle Traffic-Facts and Questions. *Int J Mol Sci* 22(2):975-994.

Kiss, B., Laszlovszky, I., Krámos, B., Visegrády, A., Bobok, A., Lévay, G., Lendvai, B., Román, V. (2021) Neuronal Dopamine D3 Receptors: Translational Implications for Preclinical Research and CNS Disorders. *Biomolecules* 11(1):104-143.

Orgován, Z., Ferenczy, G.G., Keserű, G.M. (2021) Allosteric Molecular Switches in Metabotropic Glutamate Receptors. *ChemMedChem* 16(1):81-93.

Tóth, F., Cseh, E.K., Vécsei, L. (2021) Natural Molecules and Neuroprotection: Kynurenic Acid, Pantethine and α -Lipoic Acid. *Int J Mol Sci* 22(1):403-428.

Lengyel, C.G. (2021) Microsatellite Instability as a Predictor of Outcomes in Colorectal Cancer in the Era of Immune-Checkpoint Inhibitors. *Curr Drug Targets* 22(9):968-976.

Sikura, K.É., Combi, Z., Potor, L., Szerafin, T., Hendrik, Z., Méhes, G., Gergely, P., Whiteman, M., Beke, L., Fürtös, I., Balla, G., Balla, J. (2020) Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization. *J Adv Res* 27:165-176.

Butz, H., Nyírő, G., Kurucz, P.A., Likó, I., Patócs, A. (2021) Molecular genetic diagnostics of hypogonadotropic hypogonadism: from panel design towards result interpretation in clinical practice. *Hum Genet* 140(1):113-134.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbr



Review

The phosphatome of opportunistic pathogen *Candida* species

Krisztina SZABÓ^a, Márton MISKEI^b, Ilona FARKAS^a, Viktor DOMBRÁDI^{a,*}

^aDepartment of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032, Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2020

Received in revised form

15 December 2020

Accepted 17 December 2020

Keywords:

Candida albicans

Enzyme phylogeny

Evolution

Pathogenic fungi

Protein domains

Protein phosphatases

ABSTRACT

Several *Candida* species, the best known example of which is *Candida albicans*, are opportunistic human pathogens that are responsible for frequent nosocomial infections. A worrisome aspect of the currently available treatments of candidemia is the steady development of resistance to antifungals among these potentially life threatening fungi. Under these circumstances the search for novel drug targets is a well justified research direction. We propose that the principles of signal transduction therapy by targeting protein phosphatases can be adopted as these enzymes carry out important physiological functions in *Candida*. We demonstrate that *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *S. cerevisiae* exhibit the largest repertoire of protein phosphatases among the investigated fungi. Together with other opportunistic pathogen *Candida* species and the members of the *Saccharomycetales* order, they expanded their phosphatome by repeated gene duplications. We noted that evolution generated a set of fungus specific phosphatases which can be targeted without the danger of causing undesirable side effects in the human body. Based on the conflicting criteria of effectiveness and selectivity, we identified and characterized 7 phosphatases that are potent virulence determinants and may be utilized as potential antifungal drug targets.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

There are about 200 known *Candida* species that belong to the *Saccharomycetales* order of fungi. Out of them 20 can cause human diseases; the most prominent representative being *Candida albicans* (Poulain, 2015). The peculiarity of this and

similar yeasts is that they are common commensals in the human microbiome, about 65 % of the population can be carriers with mild or negligible symptoms (Odds, 1987). However, when the immune system of the affected individuals is weakened or compromised, the opportunistic pathogen turns into a dangerous, sometimes deadly enemy (Perlroth et al., 2007). *C.*

* Corresponding author. Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032, Debrecen, Egyetem tér 1, Hungary.

E-mail address: dombradi@med.unideb.hu (V. Dombrádi).

<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.12.002>

1749-4613/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology

Balázs Sarkadi^{1,2} , László Homolya¹ and Tamás Hegedűs²

¹ Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Budapest, Hungary

² Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Correspondence

B. Sarkadi, Institute of Enzymology,
Research Centre for Natural Sciences, 1117
Budapest, Magyar tudósok krt 2., Hungary
Tel: +36-1-382-6684
E-mail: sarkadi@biomembrane.hu

(Received 2 July 2020, revised 27 August
2020, accepted 21 September 2020,
available online 16 October 2020)

doi:10.1002/1873-3468.13947

Edited by Amro Hamdoun

The ABCG2 protein has a key role in the transport of a wide range of structurally dissimilar endo- and xenobiotics in the human body, especially in the tissue barriers and the metabolizing or secreting organs. The human *ABCG2* gene harbors a high number of polymorphisms and mutations, which may significantly modulate its expression and function. Recent high-resolution structural data, complemented with molecular dynamic simulations, may significantly help to understand intramolecular movements and substrate handling, as well as the effects of mutations on the membrane transporter function of ABCG2. As reviewed here, structural alterations may result not only in direct alterations in drug binding and transporter activity, but also in improper folding or problems in the carefully regulated process of trafficking, including vesicular transport, endocytosis, recycling, and degradation. Here, we also review the clinical importance of altered ABCG2 expression and function in general drug metabolism, cancer multidrug resistance, and impaired uric acid excretion, leading to gout.

Keywords: ABCG2; drug metabolism; drug resistance; gout; molecular dynamics; trafficking; variants

The ABCG2 (BCRP, MXR) protein was discovered as a transporter upregulated and causing multidrug resistance in tumor cells, and at about the same time, it was also cloned from normal placenta [1–3]. As demonstrated in the following years, the key physiological function of this transporter is to extrude endo- and xenobiotics, especially in the physiological tissue barriers, including the brain capillary endothelial cells forming the blood–brain barrier (BBB), the intestinal and kidney tubular epithelial cells, and the chorion villi of the placenta. In addition, ABCG2 is physiologically expressed in the liver canalicular membranes, in

the mammary glands, and in various progenitor and stem cells, including pluripotent stem cells [4–8]. A medically important site of expression of ABCG2 is in drug-resistant tumors, especially the so-called tumor stem cells or drug-tolerant persister (DTP) cells [5,9–12].














The wide range of the transported substrates of ABCG2 includes uric acid and numerous conjugated endogenous metabolites, as well as hydrophobic and amphipathic drugs and drug conjugates [4,13,14]. This promiscuous drug recognition and transport made this protein an important player in general ADME-Tox

Abbreviations

4-PBA, 4-phenylbutyrate; BBB, blood–brain barrier; COPII, covered with coatomer II; DPT, drug-tolerant persister; endo-H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, endoplasmic reticulum-associated degradation; EROC, ER quality control; GWA, genome-wide association; HDI, histone deacetylase inhibitor; MD, molecular dynamics; NBD, nucleotide-binding domain; RI, regulatory insertion; SRP, signal recognition particle; THs, transmembrane helices.

IN A NUTSHELL

Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters

Christoph Thomas¹ , Stephen G. Aller² , Konstantinos Beis^{3,4} , Elisabeth P. Carpenter⁵, Geoffrey Chang⁶, Lei Chen^{7,8}, Elie Dassa⁹, Michael Dean¹⁰ , Franck Duong Van Hoa¹¹, Damian Ekiert¹², Robert Ford¹³, Rachele Gaudet¹⁴, Xin Gong¹⁵, I. Barry Holland¹⁶, Yihua Huang¹⁷, Daniel K. Kahne¹⁸, Hiroaki Kato¹⁹, Vassilis Koronakis²⁰, Christopher M. Koth²¹, Youngsook Lee²², Oded Lewinson²³, Roland Lill²⁴ , Enrico Martinoia^{25,26}, Satoshi Murakami²⁷ , Heather W. Pinkett²⁸ , Bert Poolman²⁹ , Daniel Rosenbaum³⁰, Balazs Sarkadi³¹, Lutz Schmitt³² , Erwin Schneider³³, Yigong Shi³⁴, Show-Ling Shyng³⁵, Dirk J. Slotboom²⁹ , Emad Tajkhorshid³⁶, D. Peter Tieleman³⁷ , Kazumitsu Ueda³⁸ , András Váradi³¹ , Po-Chao Wen³⁶ , Nieng Yan³⁹, Peng Zhang⁴⁰, Hongjin Zheng⁴¹, Jochen Zimmer⁴² and Robert Tampé¹ 

- 1 Institute of Biochemistry, Biocenter, Goethe University Frankfurt, Germany
- 2 Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, AL, USA
- 3 Department of Life Sciences, Imperial College London, London South Kensington, UK
- 4 Rutherford Appleton Laboratory, Research Complex at Harwell, Didcot, UK
- 5 Structural Genomics Consortium, University of Oxford, UK
- 6 Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences and Department of Pharmacology, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA
- 7 State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Molecular Medicine, Beijing Key Laboratory of Cardiometabolic Molecular Medicine, Peking University, Beijing, China
- 8 Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing, China
- 9 Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France
- 10 Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, NIH, Gaithersburg, MD, USA
- 11 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
- 12 Department of Cell Biology and Department of Microbiology, New York University School of Medicine, NY, USA
- 13 Faculty of Biology, Medicine and Health, The University of Manchester, UK
- 14 Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA
- 15 Department of Biology, Southern University of Science and Technology, Shenzhen, China
- 16 Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Sud, Orsay, France
- 17 National Laboratory of Biomacromolecules, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
- 18 Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA
- 19 Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Japan
- 20 Department of Pathology, University of Cambridge, UK
- 21 Structural Biology, Genentech Inc., South San Francisco, CA, USA
- 22 Division of Integrative Bioscience and Biotechnology, POSTECH, Pohang, Korea
- 23 Department of Biochemistry, The Bruce and Ruth Rappaport Faculty of Medicine, The Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
- 24 Institut für Zytobiologie, Philipps-Universität Marburg, Germany
- 25 Department of Plant and Microbial Biology, University Zurich, Switzerland
- 26 International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China
- 27 Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan
- 28 Department of Molecular Biosciences, Northwestern University, Evanston, IL, USA
- 29 Department of Biochemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, The Netherlands
- 30 Department of Biophysics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA
- 31 Institute of Enzymology, Research Center for Natural Sciences (RCNS), Budapest, Hungary
- 32 Institute of Biochemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
- 33 Department of Biology/Microbial Physiology, Humboldt-University of Berlin, Germany
- 34 Institute of Biology, Westlake Institute for Advanced Study, School of Life Sciences, Westlake University, Hangzhou, China
- 35 Department of Chemical Physiology and Biochemistry, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA

Abbreviations

ABC, ATP-binding cassette; cryo-EM, cryogenic electron microscopy; NBD, nucleotide-binding domain; TMD, transmembrane domain.



FORUM REVIEW ARTICLE

Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Regulating Cancer Metabolism

Katarína Smolková,¹ Edit Mikó,^{2,3} Tünde Kovács,² Alberto Leguina-Ruzzi,¹ Adrienn Sipos,² and Péter Bai²⁻⁴

Abstract

Significance: Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (*NFE2L2*, or NRF2) is a transcription factor predominantly affecting the expression of antioxidant genes. NRF2 plays a significant role in the control of redox balance, which is crucial in cancer cells. NRF2 activation regulates numerous cancer hallmarks, including metabolism, cancer stem cell characteristics, tumor aggressiveness, invasion, and metastasis formation. We review the molecular characteristics of the NRF2 pathway and discuss its interactions with the cancer hallmarks previously listed.

Recent Advances: The noncanonical activation of NRF2 was recently discovered, and members of this pathway are involved in carcinogenesis. Further, cancer-related changes (*e.g.*, metabolic flexibility) that support cancer progression were found to be redox- and NRF2 dependent.

Critical Issues: NRF2 undergoes Janus-faced behavior in cancers. The pro- or antineoplastic effects of NRF2 are context dependent and essentially based on the specific molecular characteristics of the cancer in question. Therefore, systematic investigation of NRF2 signaling is necessary to clarify its role in cancer etiology. The biggest challenge in the NRF2 field is to determine which cancers can be targeted for better clinical outcomes. Further, large-scale genomic and transcriptomic studies are missing to correlate the clinical outcome with the activity of the NRF2 system.

Future Directions: To exploit NRF2 in a clinical setting in the future, the druggable members of the NRF2 pathway should be identified. In addition, it will be important to study how the modulation of the NRF2 system interferes with cytostatic drugs and their combinations. *Antioxid. Redox Signal.* 33, 966–997.

Keywords: NRF2, cancer, breast cancer, cancer metabolism, reactive species

Introduction

THE REDOX BALANCE in cells is tightly regulated to meet physiological needs by balancing the abundance of oxidants and reductants. In cancer, the redox balance is commonly dysregulated. However, whether the redox imbalance induces or inhibits cancer formation and cell growth is rather controversial, as the pro- or anticancer effects vary between different cancers and may change as a function of the

cancer type (48, 49, 73–75, 80, 95, 180, 183, 218, 225, 227, 295). Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (*NFE2L2*, commonly referred to as NRF2) is a transcription factor that plays a crucial role in maintaining the expression of antioxidant genes. Therefore, NRF2 is vital in maintaining the cellular redox balance.

NRF2 is present in model organisms such as *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, which have an antioxidant system similar to mammals, suggesting that

¹Department of Mitochondrial Physiology, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences (IPHYS CAS), Prague, Czech Republic.

²Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

³MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, Debrecen, Hungary.

⁴Faculty of Medicine, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

© Katarína Smolková *et al.* 2020; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are cited.

SPECIAL SECTION: REVIEW

The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism

Magdolna Szántó¹ and Peter Bai^{1,2,3}

¹Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen 4032, Hungary; ²MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, University of Debrecen, Debrecen 4032, Hungary; ³Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen 4032, Hungary

Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs or ARTDs), originally described as DNA repair factors, have metabolic regulatory roles. PARP1, PARP2, PARP7, PARP10, and PARP14 regulate central and peripheral carbohydrate and lipid metabolism and often channel pathological disruptive metabolic signals. PARP1 and PARP2 are crucial for adipocyte differentiation, including the commitment toward white, brown, or beige adipose tissue lineages, as well as the regulation of lipid accumulation. Through regulating adipocyte function and organismal energy balance, PARPs play a role in obesity and the consequences of obesity. These findings can be translated into humans, as evidenced by studies on identical twins and SNPs affecting PARP activity.

Brief introduction to ADP-ribose metabolism

The field of poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs or ARTDs) has come a long way since the discovery of a nuclear poly(ADP-ribosyl)ating (PARylating) enzyme in 1963 (Chambon et al. 1963). PARPs now constitute a superfamily of at least 17 members in human that share a conserved catalytic domain (Amé et al. 2004; Hottiger et al. 2010). ADP-ribosylation is a posttranslational modification, during which the ADP-ribosylation enzymes cleave NAD⁺ and attach the resulting ADP-ribose (ADPR) units to acceptor proteins. ADP-ribosylation is referred to as mono(ADP-ribosyl)ation (MARylation), oligo(ADP-ribosyl)ation, or poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation), based on the number of the ADPR units added to the acceptor protein (Amé et al. 2004; Hottiger et al.

2010). Although all PARPs inherited the family name of the founding member, PARP-1, the PARP “polyenzymes” include only PARP-1, PARP-2, and the tankyrases (PARP-5a and PARP-5b) (Gibson and Kraus 2012). Other members perform only MARylation or oligo(ADP-ribosyl)ation, while PARP13 possesses no enzymatic activity (Hottiger et al. 2010). To our current understanding, the majority of PARP activity is attributed to PARP1 (80%–85%), while the rest is largely attributed to PARP2 (Amé et al. 1999; Schreiber et al. 2002; Szanto et al. 2011). In most cases, the major acceptor of PAR is PARP1 itself (termed auto-PARylation); nevertheless, with the use of state-of-the-art proteomics a large set of PARylated or ADP-ribosylated proteins were identified and this process is termed trans-PARylation (Chapman et al. 2013; Gibson et al. 2016; Abplanalp et al. 2018; Leslie Pedrioli et al. 2018; Palazzo et al. 2018) (for a comprehensive database of ADP-ribosylated proteins see Vivelo et al. (2017).

ADP-ribose unit(s) have rapid turnover and are removed by isoforms of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) (O’Sullivan et al. 2019; Slade 2020), ADP-ribosyl hydrolase 3 (ARH3) (Oka et al. 2006; Rack et al. 2020), and ADP-ribosyl protein lyase (Kawaichi et al. 1983). PAR polymers can be recognized by a set of proteins that consequently localize to sites marked by PARP enzymes (Barauskaite et al. 2013; Feijs et al. 2013). Karlberg et al. (2013) classified enzymes involved in ADPR metabolism and recognition as writers, readers, and erasers.

PARP1, PARP2, and PARP3 can be activated by DNA strand breaks and aberrant DNA forms (Menissier-de Murcia et al. 1989; Gradwohl et al. 1990; Kutuzov et al. 2013, 2015). Recently, other regulatory routes were described. PARP2 is activated by RNA forms (Léger et al. 2014); numerous signal transduction pathways, or the stability of PARP proteins were shown to modify the activity of PARP isoforms (Gagné et al. 2009; Cantó et al. 2013). PARPs, especially PARP1 and PARP2, are major NAD⁺ consumers in the cell (Bai et al. 2011a,b; Mohamed

[*Keywords:* PARP; ARTD; adipocyte; adipogenesis; mitochondria; lipolysis; differentiation; white adipocytes; brown adipocytes; beige adipocytes; stem cell; PARylation; high fat diet; obesity; insulin resistance; AFLD; NAFLD; atherosclerosis]

Corresponding author: baip@med.unideb.hu

Article published online ahead of print. Article and publication date are online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.334284.119>. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

© 2020 Szántó and Bai. This article, published in *Genes & Development*, is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Repositioning PARP inhibitors for SARS-CoV-2 infection (COVID-19); a new multi-pronged therapy for acute respiratory distress syndrome?

Nicola Curtin¹ | Krisztián Bányai² | James Thaventhiran³ | John Le Quesne^{3,4,5} | Zsuzsanna Helyes⁶ | Péter Bai^{7,8,9} 

¹Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University Centre for Cancer, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

²Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Budapest, Hungary

³MRC Toxicology Unit, University of Cambridge, Leicester, UK

⁴Leicester Cancer Research Centre, University of Leicester, Leicester Royal Infirmary, Leicester, UK

⁵Glenfield Hospital, University Hospitals Leicester NHS Trust, Leicester, UK

⁶Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School; Centre for Neuroscience and János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

⁷Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁸MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, Debrecen, Hungary

⁹Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Correspondence

Péter Bai, Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem tér 1, 4032 Debrecen, Hungary. Email: baip@med.unideb.hu

Clinically approved PARP inhibitors (PARPi) have a mild adverse effect profile and are well tolerated as continuous daily oral therapy. We review the evidence that justifies the repurposing of PARPi to block the proliferation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and combat the life-threatening sequelae of coronavirus disease 2019 (COVID-19) by several mechanisms. PARPi can effectively decrease IL-6, IL-1 and TNF- α levels (key interleukins in SARS-CoV-2-induced cytokine storm) and can alleviate subsequent lung fibrosis, as demonstrated in murine experiments and clinical trials. PARPi can tune macrophages towards a tolerogenic phenotype. PARPi may also counteract SARS-CoV-2-induced and inflammation-induced cell death and support cell survival. PARPi is effective in animal models of acute respiratory distress syndrome (ARDS), asthma and ventilator-induced lung injury. PARPi may potentiate the effectiveness of tocilizumab, anakinra, sarilumab, adalimumab, canakinumab or siltuximab therapy. The evidence suggests that PARPi would benefit COVID-19 patients and trials should be undertaken.

Abbreviations: ARDS, acute respiratory distress syndrome; AIF, apoptosis-inducing factor; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CoVs, coronaviruses; COVID-19, coronavirus disease 2019; CRP, C-reactive protein; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration; HRR, homologous recombination repair; ssRNA+, positive-sense single-stranded RNA; RNS, reactive nitrogen species; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TMPRSS2, type II transmembrane serine protease; VILI, ventilation-induced lung damage; WHO, World Health Organization.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. British Journal of Pharmacology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Pharmacological Society



The Potential Beneficial Effect of EPA and DHA Supplementation Managing Cytokine Storm in Coronavirus Disease

Zoltán Szabó^{1*}, Tamás Marosvölgyi², Éva Szabó³, Péter Bai^{4,5,6}, Mária Figler^{1,7} and Zsófia Verzár¹

¹ Faculty of Health Sciences, Institute of Nutritional Sciences and Dietetics, University of Pécs, Pécs, Hungary, ² Medical School, Institute of Bioanalysis, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³ Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁴ Department Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, ⁵ MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, Debrecen, Hungary, ⁶ Faculty of Medicine, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, ⁷ 2nd Department of Internal Medicine and Nephrology Centre, Clinical Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

Keywords: COVID-19, DHA – 22:6n-3, EPA – 20:5n-3, supplementation, IL-6 (Interleukin 6), IL-18

OPEN ACCESS

Edited by:

Anna Maria Giudetti,
University of Salento, Italy

Reviewed by:

Angelo Baldassare Cefalù,
University of Palermo, Italy
Gérard Lizard,
Université de Bourgogne, France

*Correspondence:

Zoltán Szabó
szabo.zoltan.diet@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Lipid and Fatty Acid Research,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 27 April 2020

Accepted: 10 June 2020

Published: 19 June 2020

Citation:

Szabó Z, Marosvölgyi T, Szabó É,
Bai P, Figler M and Verzár Z (2020)
The Potential Beneficial Effect of EPA
and DHA Supplementation Managing
Cytokine Storm in Coronavirus
Disease. *Front. Physiol.* 11:752.
doi: 10.3389/fphys.2020.00752

In the recent COVID-19 (caused by SARS-Cov-2 virus) pandemic a subgroup of patient death is attributed to the so-called “cytokine storm” phenomenon (also called cytokine release syndrome or macrophage overactivation syndrome) (Mehta et al., 2020). To date, the molecular events that precipitate a “cytokine storm” or the applicable therapeutic strategies to prevent and manage this process is not elucidated because of the complex nature of this problem (Tisoncik et al., 2012). Recent articles suggest that specific nutrients such as vitamin B₆, B₁₂, C, D, E, and folate; trace elements, including zinc, iron, selenium, magnesium, and copper may play a key role in the management of cytokine storm (Calder et al., 2020; Grant et al., 2020; Muscogiuri et al., 2020). Among these micronutrients LC-PUFAs (long chain polyunsaturated fatty acids) such as EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid) are noteworthy because of their direct influence in the immunological response to viral infections (Calder et al., 2020; Messina et al., 2020).

In this paper, we would like to draw the attention to the possible beneficial effect of EPA and DHA supplementation in SARS-CoV-2 infection and urge the medical community for further investigations and conduction of clinical trials.

Evidence suggests that n-3 LC-PUFAs can modulate the immune response and function in many ways (Calder, 2007, 2013; Zivkovic et al., 2011; Maskrey et al., 2013; Tao, 2015; Allam-Ndoul et al., 2017). Among these complex immunomodulatory effects, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β)—because of the suspected central regulatory role in the “cytokine storm”—should be highlighted. These cytokines can be affected by dietary EPA and DHA intake (Figure 1). In addition, poly(ADP-ribose) polymerase enzymes that have anti-inflammatory properties, translatable to human COVID-19 infection were shown to improve tissue levels of DHA and EPA, as well as the downstream anti-inflammatory metabolites of EPA and DHA (Kiss et al., 2015; Curtin et al., 2020) further underscoring the applicability of DHA and EPA in COVID-19.

IL-6 blockade using Tocilizumab monoclonal antibody has been identified as a feasible therapeutic target in SARS-CoV-infections (Liu et al., 2020), nevertheless, reducing the expression of additional proinflammatory cytokines (e.g., IL-1 β , IL-38) may have beneficial effects (Conti et al., 2020).



Review

Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma

Borbála Kiss ¹, Edit Mikó ², Éva Sebő ³, Judit Toth ¹, Gyula Ujlaki ², Judit Szabó ⁴, Karen Uray ² , Péter Bai ^{2,5,6,*} and Péter Árkosy ^{1,*}

¹ Departments of Oncology, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary; bkiss@med.unideb.hu (B.K.); tothjuditdr11@t-online.hu (J.T.)

² Departments of Medical Chemistry, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary; miko.edit@med.unideb.hu (E.M.); ujlaki.gyula@med.unideb.hu (G.U.); karen.uray@med.unideb.hu (K.U.)

³ Kenézy Breast Center, Kenézy Gyula County Hospital, 4032 Debrecen, Hungary; seboeva@gmail.com

⁴ Medical Microbiology Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary; szabjud@med.unideb.hu

⁵ MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, 4032 Debrecen, Hungary

⁶ Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

* Correspondence: baip@med.unideb.hu (P.B.); arkosy.peter@med.unideb.hu (P.Á.); Tel.: +36-52-412-345 (P.B.); +36-52-255-840 (P.Á.); Fax: +36-52-412-566 (P.B.); +36-52-255-657 (P.Á.)

Received: 31 March 2020; Accepted: 23 April 2020; Published: 25 April 2020



Abstract: Pancreatic adenocarcinoma is one of the most lethal cancers in both men and women, with a median five-year survival of around 5%. Therefore, pancreatic adenocarcinoma represents an unmet medical need. Neoplastic diseases, such as pancreatic adenocarcinoma, often are associated with microbiome dysbiosis, termed oncobiosis. In pancreatic adenocarcinoma, the oral, duodenal, ductal, and fecal microbiome become dysbiotic. Furthermore, the pancreas frequently becomes colonized (by *Helicobacter pylori* and *Malassezia*, among others). The oncobiomes from long- and short-term survivors of pancreatic adenocarcinoma are different and transplantation of the microbiome from long-term survivors into animal models of pancreatic adenocarcinoma prolongs survival. The oncobiome in pancreatic adenocarcinoma modulates the inflammatory processes that drive carcinogenesis. In this review, we point out that bacterial metabolites (short chain fatty acids, secondary bile acids, polyamines, indole-derivatives, etc.) also have a role in the microbiome-driven pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma. Finally, we show that bacterial metabolism and the bacterial metabolome is largely dysregulated in pancreatic adenocarcinoma. The pathogenic role of additional metabolites and metabolic pathways will be identified in the near future, widening the scope of this therapeutically and diagnostically exploitable pathogenic pathway in pancreatic adenocarcinoma.

Keywords: pancreatic adenocarcinoma; oncobiome; microbiome; bile acids; bacterial metabolite; amino acid metabolites; polyamines; LPS; short chain fatty acid

1. Pancreatic Adenocarcinoma, an Unmet Medical Need

Pancreatic adenocarcinoma stems from the exocrine glands and ducts of the pancreas and usually appears in the head of the pancreas (2/3 of cases). Pancreatic adenocarcinoma is the fourth most prevalent cancer with the highest mortality in both men and women [1]. Worldwide, in 2018, 458,918 cases were reported, and 432,242 deaths were estimated to be linked to pancreatic adenocarcinoma [2]. The number of pancreatic adenocarcinoma cases has continued to rise [3] and is predicted to rise even more sharply in the future [4]. The five-year survival for pancreatic adenocarcinoma is around 5%, as the disease progresses asymptotically to the locally advanced or metastatic stages, reducing

REVIEW

Open Access



The role of the microbiome in ovarian cancer: mechanistic insights into oncobiosis and to bacterial metabolite signaling

Adrienn Sipos¹, Gyula Ujlaki¹, Edit Mikó¹, Eszter Maka², Judit Szabó³, Karen Uray¹, Zoárd Kraszna² and Péter Bai^{1,4,5*}

Abstract

Ovarian cancer is characterized by dysbiosis, referred to as oncobiosis in neoplastic diseases. In ovarian cancer, oncobiosis was identified in numerous compartments, including the tumor tissue itself, the upper and lower female genital tract, serum, peritoneum, and the intestines. Colonization was linked to Gram-negative bacteria with high inflammatory potential. Local inflammation probably participates in the initiation and continuation of carcinogenesis. Furthermore, local bacterial colonies in the peritoneum may facilitate metastasis formation in ovarian cancer. Vaginal infections (e.g. *Neisseria gonorrhoeae* or *Chlamydia trachomatis*) increase the risk of developing ovarian cancer. Bacterial metabolites, produced by the healthy eubioime or the oncobiome, may exert autocrine, paracrine, and hormone-like effects, as was evidenced in breast cancer or pancreas adenocarcinoma. We discuss the possible involvement of lipopolysaccharides, lysophosphatides and tryptophan metabolites, as well as, short-chain fatty acids, secondary bile acids and polyamines in the carcinogenesis of ovarian cancer. We discuss the applicability of nutrients, antibiotics, and probiotics to harness the microbiome and support ovarian cancer therapy. The oncobiome and the most likely bacterial metabolites play vital roles in mediating the effectiveness of chemotherapy. Finally, we discuss the potential of oncobiotic changes as biomarkers for the diagnosis of ovarian cancer and microbial metabolites as possible adjuvant agents in therapy.

Keywords: Ovarian cancer, Microbiome, EMT, Microbial metabolite, Indole derivative, Lipopolysaccharide, Lysophosphatid, Antibiotic, Probiotic

Background

Ovarian cancer is leading oncological cause of death among women. Ovarian cancer is characterized by changes to different microbiome compartments that is termed oncobiosis. The aim of the current work is to provide a comprehensive review of changes to microbiome and to give mechanistic insights to the role of the microbiome in the pathogenesis of ovarian cancer. These

mechanistic steps involve, but are not limited to the induction of sustained inflammation and the production of procarcinogenic bacterial metabolites. The interference between the oncobiome and the chemotherapeutic agents will be discussed, as well as, the possible application of antibiotics, probiotics and nutrients in the management of ovarian cancer.

Etiology and treatment of ovarian cancer

Ovarian cancer is the second most common gynecological malignancy in developed countries and has one of the worst prognosis and mortality (Torre et al. 2015). Most ovarian tumors, approximately 90%, are of epithelial

*Correspondence: baip@med.unideb.hu

¹ Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen 4032, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



Review

Apicortin, a Constituent of Apicomplexan Conoid/Apical Complex and Its Tentative Role in Pathogen—Host Interaction

Ferenc Orosz

Research Centre for Natural Sciences, Institute of Enzymology, Magyar Tudósok Körútja 2,
1117 Budapest, Hungary; orosz.ferenc@ttk.hu

Abstract: In 2009, apicortin was identified *in silico* as a characteristic protein of apicomplexans that also occurs in the placozoa, *Trichoplax adhaerens*. Since then, it has been found that apicortin also occurs in free-living cousins of apicomplexans (chromerids) and in flagellated fungi. It contains a partial p25- α domain and a doublecortin (DCX) domain, both of which have tubulin/microtubule binding properties. Apicortin has been studied experimentally in two very important apicomplexan pathogens, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. It is localized in the apical complex in both parasites. In *T. gondii*, apicortin plays a key role in shaping the structure of a special tubulin polymer, conoid. In both parasites, its absence or downregulation has been shown to impair pathogen—host interactions. Based on these facts, it has been suggested as a therapeutic target for treatment of malaria and toxoplasmosis.

Keywords: apicortin; *Plasmodium*; *Toxoplasma*; p25alpha domain; DCX domain; apicomplexa; conoid



check for
updates

Citation: Orosz, F. Apicortin, a Constituent of Apicomplexan Conoid/Apical Complex and Its Tentative Role in Pathogen—Host Interaction. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 118. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030118>

Academic Editor: Mark F. Wisner

Received: 31 May 2021
Accepted: 29 June 2021
Published: 30 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Name

Apicortin was identified *in silico*, in 2009, as a characteristic protein of apicomplexans [1]. It combines a partial p25alpha domain with a DCX (doublecortin) one. Based on its occurrence and one of its characteristic domains, it was termed apicortin.

2. Occurrence

Apicortin, when identified, was shown to occur in apicomplexan parasites and in the placozoan animal, *Trichoplax adhaerens* [1]. The apicomplexan genomes known then contained it without exception. This situation practically has not changed since then; this statement is valid for the newly sequenced genomes and transcriptomes of apicomplexans as well. The only exception is the Apicomplexa with the smallest genome, *Babesia microti* [2].

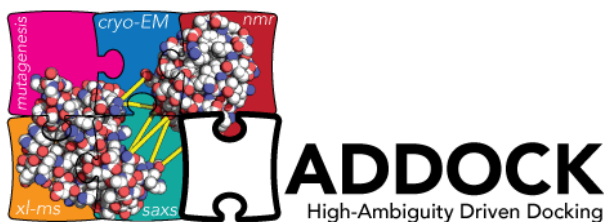
Later it has been found that apicortin also occurs in chromerids, the recently discovered [3,4], free-living cousins of apicomplexans [5]. This is not surprising, given the phylogenetic proximity and the structural similarity of these phyla. Unlike apicomplexan species, both *Chromera velia* and *Vitrella brassicaformis* have three apicortin paralogs. Apicortin has not been found in other related phyla of the Alveolata superphylum, although its remnant is present in the genome in the case of Perkinsozoa [6]. However, the very recently published draft genome of *Perkinsus olseni* contains hypothetical protein(s) possessing both p25alpha and DCX domains (KAF4710163, KAF4750811) [7].

It has also been revealed that some primitive fungi also possess this protein; first it was shown in the cases of *Spizellomyces punctatus* [6] and *Rozella allomycis* [5]. Later, a systematic examination of fungal genomes showed that the flagellated fungi contain apicortin almost without exception; and it is present even in a non-flagellated but also deeper branching clade (Endogonomycetes) [8].

Apicortin is one of the most abundant proteins of *T. adhaerens* [9]. This is the only animal that possesses apicortin [10]. Animal draft genomes and transcriptomes contain sometimes nucleotide sequences, contigs and TSAs (transcriptome shot-gun assemblies),

HADDOCK Workshop 2022. május 23-25.

Instruktor: Alexandre Bonvin
Helyszín: Pázmány Péter
Katolikus Egyetem, Információs
Technológiai és Bionikai Kar
(1083 Budapest, Práter u. 50/A)



2022. május 23-25 között Budapesten tart workshopot Alexandre Bonvin, a szerkezeti biológiában számos felhasználási területtel rendelkező [HADDOCK program](#) megalkotója. A HADDOCK fő profilja biomolekuláris komplexek modellezése kísérleti adatok - pl. krio-EM, NMR, SAXS stb. - felhasználásával. A workshop emiatt a szerkezeti biológia teljes spektrumán tevékenykedő szakemberek, doktoranduszok számára hasznos ismereteket nyújt, akár elméleti, akár kísérleti oldalról közelítik meg a szerkezetkutatási problémákat.

A szakmai program május 23-án, hétfő délután kezdődik és május 25-én szerda délelőtt ér véget. Mindhárom napon a kávészünetek mellett ebédet, illetve hétfőn vacsorát is biztosítunk. Kedd estére buszos városnézést tervezünk.

A workshopon lesz lehetőség saját kutatási eredmények poszter formájában való bemutatására, melyeket a szünetekben lehet megvitatni.

A részvételi díj előreláthatólag 25 ezer Ft/fő, mely az étkezések árát tartalmazza. A rendezvényt támogató szervezeteknek köszönhetően lesz lehetőség egyes résztvevők számára a díj elengedésére.

Bővebb információ hamarosan elérhető lesz a [PPKE ITK honlapján](#).

Jelenlegi támogatók: Info-Bionikai Egyesület, Magyar Biokémiai Egyesület, SzintPlusz program

Üdvözlettel a szervezők nevében:

Gáspári Zoltán
gaspari.zoltan@itk.ppke.hu