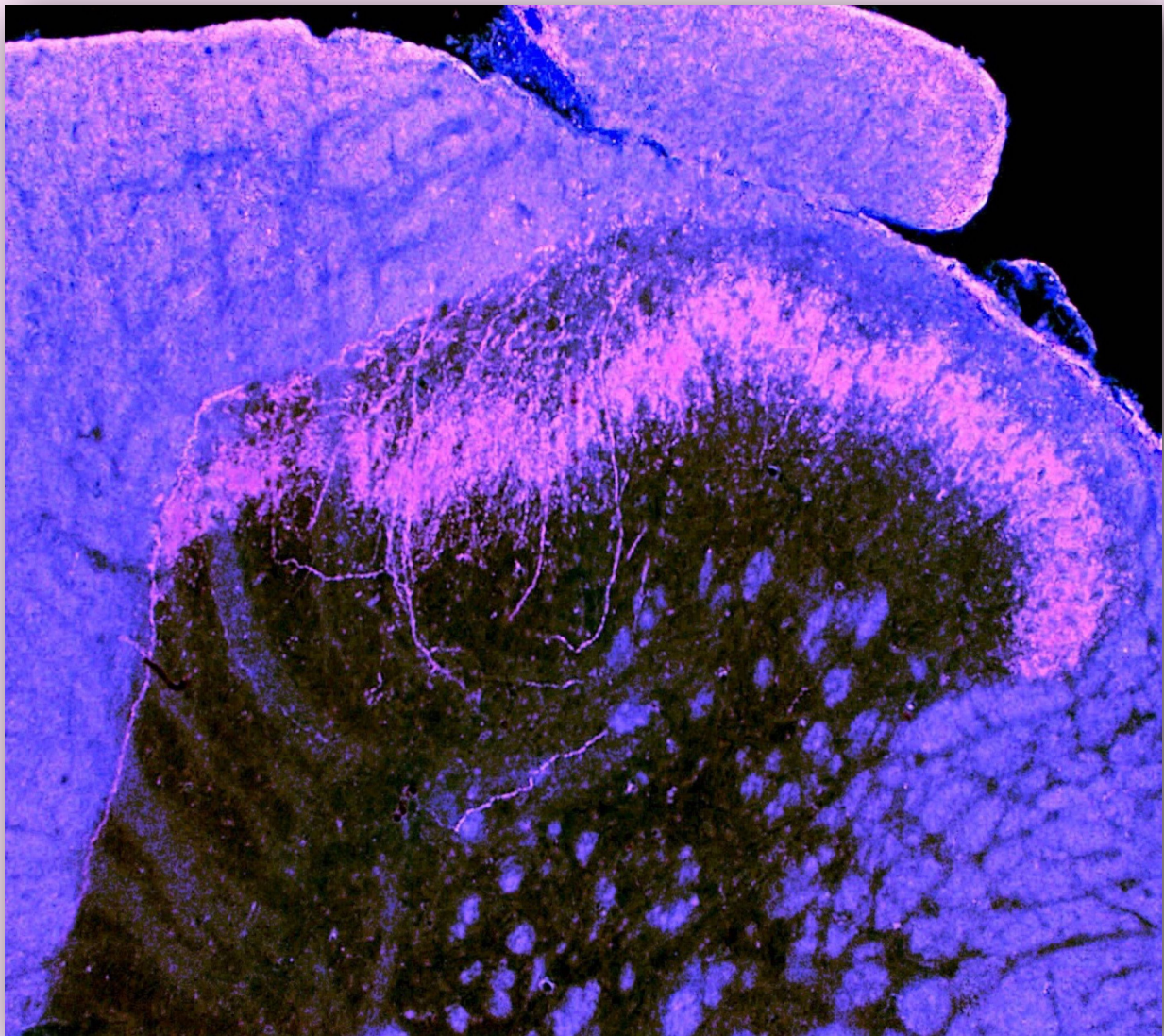


# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLV. évfolyam 4. szám

2021. december



# 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

Rovatvezetők:

Sarkadi Balázs (Áttekintő közlemények) és  
Nyitray László (PhD disszertációk bemutatása)

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter  
info@remekdesign.hu

**XLV. ÉVFOLYAM 4. SZÁM**

**2021. december**

## TARTALOMJEGYZÉK

*Címlapkép: Capsaicin-szenzitív nociceptív primer afferensek végződése patkány gerincvelő felszínes (Rexed I-II) lamináiban. Axon terminális degeneráció kimutatása 8 órával capsaicin szisztémás injekcióját követően. Eager-féle ezüstimpregnáció. (Jancsó Gábor preparátuma, ld. 48. oldal).*

### **AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK**

Kitüntetések, díjak ..... 4.  
Székács András: Kémiai és genetikai biztonság: műszeres és  
immunanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása ..... 5.

### **HAZAI TUDOMÁNYOS MŰHELYEK**

Domrádi Viktor: 100 éves a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézete .... 33.

### **REVIEW**

Jancsó Gábor és Sántha Péter: A hő-, fájdalom- és tapintásérzés  
receptorai: a 2021. évi orvosi-élettani Nobel-díj és szegedi vonatkozásai ..... 44.

### **TUDOMÁNYOS CIKK**

Hetényi Anasztázia, Imre Norbert, Szabó Enikő, Bodnár Brigitta,  
Szkalisity Abel, Gróf Ilona, Bocsik Alexandra, Deli A. Mária,  
Horváth Péter, Czibula Ágnes, Monostori Éva, Martinek A. Tamás:  
Fehérje méretű molekulák humán sejtekbe juttatása lipid-raft  
mediált endocitózissal ..... 67.

### **ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL**

Felhívás ..... 84.  
Lista ..... 85.  
Közlemények ..... 88.

### **PHD DISSZERTÁCIÓK BEMUTATÁSA**

Beharangozó ..... 103.  
Kovács Réka Ágnes: A neuronális pentraxinok, mint komplement-kötő

partnerek jellemzése a központi idegrendszerben .....	105.
Kurilla Anita: A génexpressziót szabályozó mechanizmusok vizsgálata: egy szövetspecifikus alma-promóter elemzése és a translációt termináló faktor autoregulációjának vizsgálata <i>Neurospora crassa</i> gombában .....	109.
Pongorné Kirsch Klára: A mitogén-aktivált protein- (MAP) kinázok nem-kanonikus kölcsönhatásai: esettanulmány az ATF2 transzkripció faktoráról .....	115.
Saskói Éva: Tumorszuppresszor homológok fejlődésgenetikai elemzése <i>Caenorhabditis elegans</i> modellorganizmusban .....	121.
<b>KONFERENCIA FELHIVÁS</b>	
IUBMB, FEBS and PABMB, Lisszabon, Portugália, 2022. ....	128.
<b>KONFERENCIA BESZÁMOLÓK</b>	
Molekuláris Élettudományi Konferencia, 2021, Eger .....	130.
50. Membrán-Transzport Konferencia, 2021, Sümeg .....	132.
Peptidkémiai Munkabizottság 2021. évi tudományos ülése, Balatonszemes .....	135.
<b>AKTUALITÁSOK</b>	
Ormos Pál 70 éves .....	138.
<b>FELHIVÁSOK</b>	
A 2021. évi kiemelkedő cikkek listájának beküldése .....	142.
Alapítvány a Tudományos Szemészetért pályázata .....	143.
<b>NEKROLÓG</b>	
Cseh Sándor (1967–2021) .....	144.

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



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

**AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI  
2021. SZEPTEMBER 15. ÉS 2021. DECEMBER 15. KÖZÖTT**

**Kondorosi Éva** (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, professor emerita) Balzan- és Széchenyi-díjas molekuláris biológus, az MTA rendes tagja, az Európai Bizottság tudományos főtanácsadói testületének tagja a **Prima Primissima** díjat nyerte el Magyar tudomány kategóriában.

Az MTA Elnöksége kiemelkedő tudományos életműve elismeréseként **Eötvös József-koszorúval** tüntette ki **Váradi András**t (Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, professor emeritus), az MTA doktorát, a modern DNS-alapú molekuláris diagnosztika hazai elterjesztésében játszott úttörő szerepéért, az ABC-transzporter-kutatás magyar iskolája kialakításában játszott kulcsszerepéért, a humán ABC-fehérjék első „katalógusának” publikálásáért és a gén-fehérje betegség problémájának kutatására felállított komplex kutatási program elismeréseként.

**Gratulálunk a kitüntetetteknek!**

## KÉMIAI ÉS GENETIKAI BIZTONSÁG: MŰSZERES ÉS IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA

**Székács András**  
**Agrár-környezettudományi Kutatóközpont, Környezettudományi**  
**Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
[szekacs.andras@uni-mate.hu](mailto:szekacs.andras@uni-mate.hu)



Megtiszteltetés számomra, hogy a Magyar Érdemrend Tisztikeresztje kitüntetésem kapcsán összefoglalhatom a kitüntetés tárgyában végzett sokévtizedes munkám eredményeit. Különösen örömmel teszem ezt a *Biokémia* folyóirat hasábjain, melynek 1995 óta szerkesztőségi tagja vagyok, 1998 és 2008 között a főszerkesztője voltam. 1984-ben végeztem okleveles vegyészmérnökként a Budapesti Műszaki Egyetemen (BME), s ugyanott szereztem PhD és habilitált oktatói fokozatot 1991-ben és 1999-ben. MTA doktora fokozatomat (kémia) 2002-ben védtem, 2012 óta a Szent István egyetem címzetes egyetemi tanára, 2020 óta a BME egyetemi magántanára, s 2021 óta a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) egyetemi tanára vagyok. 1984 és 2011 között az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében dolgoztam, 2011 óta a Központi Környezet- és Élelmiszertudományi Kutatóintézet (KÉKI) főigazgatója lettem, illetve annak jogutódjaiban vezetem ezt a kutatóműhelyt, jelenleg a MATE Környezettudományi Intézetének igazgatóhelyettesi beosztásában. Főbb kutatási területeim a mezőgazdasági technológiák kémiai, genetikai és biológiai környezet- és élelmiszerbiztonsági vonatkozásai, beleértve az élelmiszerlánc szerves mikro-szennyezőit (növényvédő szerek, mikotoxinok, antropogén és technológiai szennyező anyagok), műszeres és bioanalitikai módszerek a környezet- és élelmiszeranalitikában a bioaktív összetevők mérésére, analitikai módszerek az eredet és az összetétel vizsgálatára, mezőgazdasági termékek és adalékanyagok ökotoxikológiai értékelése. Jelenleg az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság Igazgatótanácsának, az OECD Együttműködési Kutatási Program Tudományos Tanácsadó Testületének vagyok tagja, valamint a Kutatók Európai Hálózata a Társadalmi és Környezeti Felelősségvállalásért (*European Network of Scientists for Social and Environmental Responsibility*, ENSSER) tudományos szervezet vezetőségi és alapító tagja. Lektorált publikációim száma 208, melyeknek kumulált impakt faktora 289,5; Hirsh-indexem 26.

## Bevezetés

A mezőgazdasági és kémiai technológiák nyomán a környezetbe jutó szerves mikroszennyezők folyamatos környezetterhelést jelentenek, s e vegyületek környezeti kockázatelemzése csupán a tényleges megjelenési szintek (kitettség) és a biológiai hatások (veszély) pontos felméréssel végezhető el. Emiatt nyomon szükséges követni ezen idegen anyagok szintjeit a környezeti mátrixokban (környezetanalitika) és kifejtett hatásaikat az egyes élőhelyeken (ökotoxikológia). A korszerű gáz- (GC) és folyadékkromatográfiás (HPLC) analitikai eljárások révén ezen anyagok rutin mérése mind kisebb analitikai kimutatási határral (KH) végezhető el a minta-előkészítési és a műszeres módszertan fejlesztéseinek köszönhetően, azonban kiemelkedő áttörések születtek a biokémiai alapú kimutatástechnikák terén is. Ezek egyik legfontosabbik területét képviselik az immunanalitikai eljárások, amelyekben a gerincesek immunrendszeréből kinyerhető antitesteket alkalmazzuk a célvegyületek nagy specifitású felismerésére. Jóllehet, szakmai tevékenységünk jelentős részét képezi a növényvédőszer-maradékok műszeres analitikai monitorozása, különös tekintettel a neonikotinoid típusú rovarirtó szerekre, a nagy forgalmú gyomirtószer-hatóanyagokra (pl. *glyphosate*) és készítményeikre, valamint a formázó anyagok vizsgálatára, hasonlóképpen intenzív és szakmai értelemben szerteágazóbb munkát végeztünk az immunanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása terén.

Az egyik legáltalánosabban alkalmazott immunanalitikai módszer képviselői az enzimjelzéses *immunoassay* (ELISA) rendszerek, melyekben a célvegyület (antigén) és a specifikus antitest reakcióját a leggyakrabban szilárd határfelületen hozzuk létre, s a kialakuló immunkomplexet olyan jelzőenzimmel látjuk el, amely valamilyen szubsztrátum vagy enzimtermék kolorimetriás mérését teszi lehetővé. Hasonló elven nemcsak ELISA rendszerek, de immunszenzorok is kialakíthatóak, melyek révén a KH több nagyságrenddel is javítható. Az immunanalitikai fejlesztő munka különösen izgalmas mozzanata az, hogy a módszerfejlesztés során arról is közvetett ismereteket nyerünk, mely molekuláris tulajdonságok milyen hatással vannak egy molekula immunogén voltára, vagyis melyek azok a molekuláris ismérvek, melyeket az immun-rendszer „felismer”. Így az immunanalitikai fejlesztés központi kérdése hasonló a biológiailag aktív hatóanyagok fejlesztéséhez: az immunválasz kiváltása céljából a biokémiai folyamatokba beavatkozó ágenseket nem enzimekhez vagy receptorokhoz, hanem antitestekhez való kötődés szempontjából szükséges tervezni. Más szavakkal, a biológiailag aktív vegyületek fejlesztésének módszertana

alkalmazható az analitikai kémia és biokémia szolgálatában.

Ez az összefoglaló az 1990 óta elért eredményeink összegző áttekintése, elsősorban az immunanalitika terén. A kutatási munkálatok leírásában törekedtem arra, hogy érzékeltessem, melyek voltak azok a lépések, eljárások, melyeket magam végeztem el (ezeket egyes szám első személyben említettem), melyek azok, melyeket közösen végeztünk (ezeket többes szám első személyben említettem), és melyek azok, melyeket a kutatásokban felhasználtam, de amelyeknek kivitelezésében magam nem vettem részt (ezeket többes szám harmadik személyben említem).

### **Immunanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása kismolekulák kimutatására**

A gerinces immunrendszer sajátossága, hogy csak bizonyos méret (~10 kDa molekulatömeg) fölötti idegen anyagokra (immunogénekre) reagál, azonban ezek a makromolekulák az immunprezentáció során kis, 3-5 aminosavnyi nagyságú fragmentumokra hasítódnak, s antitestek ezen fragmentumok ellen képződnek. Kémiai és biokémiai értelemben tehát különösen igényes feladat olyan molekulák ellen antitesteket nyerni, amelyek önmagukban túl kis méretűek ahhoz, hogy immunogének legyenek. E vegyületek ellen csak úgy nyerhetünk antitesteket, ha e molekulákat hordozó makromolekulákhoz kapcsoljuk, s az állatokat ezen konjugátumokkal immunizáljuk. A konjugálási reakcióhoz reaktív funkciós csoportot kell létrehozni az alapmolekulán, lehetőleg annak főbb kémiai szerkezeti csoportjaitól bizonyos távolságot biztosító „hídon” keresztül. A célmolekulák többsége konjugálásra közvetlenül alkalmas funkciós csoportot nem tartalmaz, illetve ha mégis, akkor e funkciós csoport „feláldozása” a konjugálás érdekében túl jelentős molekuláris változást jelent az immunogénben. A célvegyület (analát) konjugáláshoz funkciós csoporttal ellátott származékait ún. hapténeknek nevezzük.

Az immunanalitikai módszerfejlesztéseink során különféle kis molekulájú célvegyület – növényvédő szerek, toxinok, valamint más endogén vegyületek (növényi hormonok) és környezetszennyező anyagok – kimutatására fejlesztettem ki ELISA és immunszenzorikai technikát. A hapténvegyületek fehérjekonjugátumai ellen nyert antiszérumok felhasználásával kifejlesztett ELISA rendszerek többségénél az ún. immobilizált antigén alapú, indirekt ELISA eljárást alkalmaztam, mely versengő (kompetitív) elvű: a szilárd fázison rögzített hapténmolekulák és a célvegyületnek a mintában bevitt molekulái

versengenek az oldatban lévő antitest kötőhelyeiért. Minél nagyobb koncentrációban van jelen a mintában a célvegyület, annál kevésbé képes az antitest a szilárd fázison megkötődni, mely megkötődés mértékét kapcsolt enzimatikus színreakció révén követjük. Egyes esetekben ún. immobilizált antitest alapú, direkt ELISA eljárással is dolgoztam, amely hasonló elven működik, ám itt az antitestet rögzítjük a szilárd fázison.

Az ELISA fejlesztés első lépéseként a célvegyület funkciós csoporttal származékképzett változatának, az ún. hapténvegyületnek kialakítása – egy enzim vagy receptor gátlóanyagának megtervezéséhez hasonlóan – érdekes és igényes feladat. Ilyen hapténmolekulákat számos célvegyület kimutatására szolgáló *de novo* ELISA rendszer kidolgozásakor alkalmam volt tervezni, előállítani, fehérjékhez konjugálni és az immunanalitikai rendszerben vizsgálni [1-4]. Emellett az antigén–antitest reakciót különféle szenzorfelületen kivitelezve immunszenzorokat [5, 6] és más bioszenzorokat [7] alakítottunk ki, melyek közül a legérzékenyebbnak az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiái (OWLS) szenzorok mutatkoztak [8-10], de dolgoztunk felületi plazmonrezonanciás és ellipszometriás [11] technikákkal is. A módszer-fejlesztéseken kívül kereskedelmi ELISA rendszereket is felhasználtunk, s az immunanalitikai eljárásokat kiegészítő eljárásaként alkalmaztuk például felszíni-víz- és talajszennyező növényvédőszer-maradékok kimutatására irányuló több évtizedes műszeres analitikai monitorozási [12-22] és a vonatkozó kockázatértékelési [23-25] munkánkban. A vizsgálatok kismolekulás célvegyületeit és a kidolgozott immunanalitikai rendszerek kimutatási paramétereit az 1. táblázatban soroltam fel.

#### *Immunanalitikai eljárások növényvédőszer-hatóanyagok kimutatására*

A gyomirtó hatóanyagként elterjedten alkalmazott *amitrole* (3-amino-1,2,4-triazol) mutagenitása és bemosódási veszélye miatt toxikológiai és környezetvédelmi szempontból problematikus, mára betiltott herbicid. Hagyományos kimutatási módszerei kémiai származékképzésen alapulnak, emiatt célszerűnek látszott, hogy ELISA rendszert dolgozzunk ki a vegyület detektálására. Ehhez hapténvegyületként előállítottam az alapvegyület 3-hidroxi-propil-származékát. A molekula szabad aminocsoportját 2-nitro-fenil-szulfenil- és 2,4-dinitro-fenil-szulfenil-csoporttal védtem, az így kémiai úton védett haptént megfelelő borostyánkősav-félészterén keresztül hordozófehérjékhez kötöttem, majd a védőcsoportot a fehérjekonjugátumról eltávolítottam. A védőcsoport felvitelét és eltávolítását UV spektroszkópiás úton követtem, mely egyben a haptén-



konjugálás hatékonyságát is mutatta, vagyis a kromofór védőcsoportot egyben az epitópsűrűség kimutatására is felhasználtam. A kapott konjugátumot szérumban kinyerése érdekében nyúlban és egérben immunogénként alkalmaztuk [26]. További merkapto- és karboxilcsoportot tartalmazó triazolszármazék haptént hasonlóképpen – ám más kémiai úton – hordozófehérjékhez kötöttem [26, 27]. A kapott szérumok kötődőképességét hapténhomológ és -heterológ rendszerekben vizsgáltuk. A 3-hidroxi-propil-hapténszármazék előnye az volt, hogy itt az alapmolekula sajátosságai maximálisan megőrződtek. Mindazonáltal, a célvegyület kis molekulatömege, ikerionos szerkezete és kémiai védelemre szoruló reaktív funkciók csoportjai a vegyület alacsony természetes immunogenitását eredményezték, emiatt a vegyület immunprezentálása gyengének mutatkozott: a specifikus poliklonális antitestek versengő gátlása az indirekt ELISA rendszerben az *amitrole* és hasonló vegyületek által a 0,1–100  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományba estek, a gátlási középértékek ( $\text{IC}_{50}$ ) 10  $\mu\text{M}$  körül ingadoztak [1, 26]. A vizsgálatok rámutattak a kis molekuláris méretű hapténmolekulák immunogenitásbeli korlátaira.

A *glyphosate* a napjainkban, nemzetközi szinten legnagyobb mennyiségben használt gyomirtó hatóanyag, s a hatalmas kibocsájtás miatt a vegyület által kifejtett környezetterhelés is igen nagy. Minthogy a molekula kimutatása hagyományos módszerekkel munkaigényes minta-előkészítést igényel, ELISA kifejlesztését kíséreltük meg. Hapténként az alapvegyület metabolitja, az amino-metil-foszfonsav (AMPA) karboxialkilezésével előállítható N,N-bisz-(karboxi-metil)-származékát alkalmaztuk. A kapott immunogén ellen nyert antitestek a *glyphosate* hatóanyagot kis érzékenységgel mutatták ki indirekt ELISA rendszerben, ám az érzékenység a pH csökkentésével egy nagyságrenddel javítható volt. A *glyphosate* kötődését az antitesthez izotópjelzett hatóanyag kötődésvizsgálati kísérleteiben igazoltuk [1].

Eredményeinket közvetetten az is alátámasztotta, hogy azóta sem jelent meg a kereskedelmi forgalomban a *glyphosate* hatóanyagra szelektív immunanalitikai kimutatási eljárás, valamennyi eddig közölt módszer előzetes származék-képzésen alapul. Ilyen eljárásokat magunk is alkalmaztunk a gyártóval együttműködve [28], illetve célzott biológiai vizsgálatokban [29-34]. A hatóanyagról két értékelő áttekintést is közzeltünk [35, 36], amelyek – különösen az utóbbi – kiemelkedően nagy érdeklődést kaptak.

A valaha nagy hazai forgalmazású dinitro-anilin-származék gyomirtó szerek

legfontosabbika a *trifluralin* volt, melyet az EU 2008-ban tiltott be a vízi életközösségekre gyakorolt toxicitása miatt. Így indokoltnak látszott, hogy a vegyület kimutatására ELISA rendszert fejlesszünk ki. A hapténvegyületeket az alapmolekula N-alkil-csoportjain történő módosításokkal alakítottuk ki: az immunogénben a trifluralin N-propil-N-(5-karboxi-pentil)-származékát alkalmaztuk, a felületi antigénekben használt hapténekben pedig mind a karboxialkylcsoport, mint pedig a másik N-alkilcsoport hosszát változtattuk. A hapténeket hordozófehérjékhez rögzítettük, a konjugálás hatásfokát UV-spektroszkópiás és mátrixvezérelt lézereszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás (MALDI ToF MS) módszerrel határoztuk meg [37]. Nyulakból nyert szérumok segítségével versengő gátlási ELISA rendszert dolgoztunk ki, mely részletes optimalizálás után a célvegyület *trifluralint* 0,1–100 ng/ml között detektálta, az  $IC_{50}$  érték 2,56–3,55 ng/ml közöttinek adódott. A kimutatást, szilárd fázisú mikroextrakciós (SPME) minta-előkészítést alkalmazva, gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel igazoltuk. Az antitestet OWLS szenzorformátomban alkalmazva hat nagyságrendnyi javulást sikerült elérni a KH értékében [5, 38, 39]. A kimutatás hibaforrásainak korrekciós lehetőségeit felmértük [5], valamint a hapténkonjugátum megkötődését a szenzorchipen atomerő-mikroszkópiás technikával is igazoltuk [39].

A *propanil* gyomirtószer-hatóanyag toxikológiai tulajdonságai miatt szintén bekerült a környezetanalitika vizsgálati körébe, s engedélyét az EU 2008-ban visszavonta. Mivel gázkromatográfiás kimutatása rendszerint kémiai származék-képzéssel történik, célszerűnek látszott, hogy erre a célvegyületre is immunanalitikai rendszert dolgozzunk ki. A fejlesztési munkát egy orosz kutatócsoporttal közösen végeztük, akik velünk párhuzamosan polarizációs fluoroimmunoassay (PFIA) rendszert fejlesztettek ki. Különbféle diklór-anilinizomerekből ezek borostyánkősav- illetve malenisav-félaninildjeit állítottuk elő, így olyan hapténeket nyerve, melyekben a propanil propionsavcsoportját módosítottuk, és ott a konjugálásra alkalmas karboxilcsoportot építettünk be. A haptének fehérjekonjugátumai ellen nyert antitestekkel három, egymáshoz igen hasonló  $IC_{50}$  értéket (2,2–6,1 ng/ml) mutató ELISA rendszert optimalizáltunk. Az eredmények rávilágítottak, hogy a két klórszubsztituens elhelyezkedése az aromás gyűrűn, illetve telítetlen kötés elhelyezése a kapcsolóláncban jelentősen javítja a kapott ELISA módszer érzékenységét. A két legérzékenyebb ELISA rendszert növényi (rizs) minták *propanil*tartalmának mérésére is alkalmaztuk, és GC-MS módszerrel igazoltuk [40].

Az *acetochlor* a klóracetamid-típusú gyomirtók fontos képviselője volt világszerte és a hazai gyomirtószer-felhasználásban egyaránt, ám humán- és vízi toxicitása és vízszennyező jellege miatt az EU 2011-ben bevonta. Különös hangsúly terelődött a hatóanyagra annak talajbeli elszivárgásai, vízszennyező jellege, illetve onkogén és lehetséges endokrin zavaró hatásai következtében. Emiatt a hatóanyag maradékának gyors detektálására immunanalitikai rendszert dolgoztunk ki, itt is az orosz kutatócsoporttal közösen, akik az acetoklór kimutatására velünk párhuzamosan PFIA rendszert fejlesztettek ki. Munkánkban olyan hapténmolekulák és konjugátumok szintézisére törekedtünk, amelyekben a klór-acetil-csoport jelen marad: az anilid nitrogénatomon különböző lánchosszúságú -karboxi-alkil-csoportot tartalmazó hapténeket állítottunk elő (az e célra előállított, megfelelő -(alkil-amino)-karbonsavészterből és a megfelelő dialkil-klór-benzolból kiindulva), a hapténeket hordozófehérjéhez kötöttük, és haptén-heterológ, immobilizált antigén-alapú ELISA rendszerben alkalmaztuk. Három, érzékenységükben egymáshoz közel álló ( $IC_{50} = 2,15-4,05$  ng/ml) ELISA rendszert is sikerült kialakítanunk. Az optimalizált ELISA módszert *acetochlorra* specifikusnak találtuk, a spefitásért felelős tényezők: a klór-acetil-csoport, az aromás gyűrű alkilezettsége és az *N*-alkoxi-alkil-csoport szerkezete. Az ELISA kimutatás validálására a hatóanyagot vizes mintákból ELISA és GC-MS módszerrel párhuzamosan is kimutattuk (0,5–50 ng/ml), utóbbi esetben minta-előkészítésként SPME módszert alkalmazva [41].

Az egyesült államokbeli Millipore-ImmunoSystems céggel együttműködésben hazai mintákon teszteltük az általuk triazin herbicidek (elsősorban az *atrazine*) kimutatására szolgáló direkt ELISA rendszert. Az *atrazine* víz- és talajbeli lebomlásdinamikájáról kimutattuk, hogy 20 °C-on 1 µg/ml szintről 20-50% tartós szermaradékszintet eredményez, illetve kijuttatást követően – az alkalmazási dózistól függően – ijesztően magas (48-75%) hatóanyagszintek maradnak meg a talajban, vagyis az *atrazine* mind vízben, mind talajban perzisztens hatóanyag [42]. Mindezt visszaigazolta, hogy az EU – ugyanilyen indokkal – a hatóanyag engedélyét 2004-ben visszavonta.

A triazolgyűrű korábban tapasztalt csekély immunogenitása további triazolszármazékok vizsgálatára sarkallt. Következő célvegyületként ezért is esett választásom a triazol fungicidek között a *myclobutanil* hatóanyagra, mely hatékony szisztémikus gombaölő hatóanyag, s amelyet igazolt hormonális zavaró hatásai miatt az EU 2008-ban tiltólistára tett, majd 2011-ben az idei évig újraengedélyezett. A *myclobutanil* esetében a hapténszintézisre az alapmolekula

nitrilcsoportjának hidrolízise teremtett lehetőséget. Az így kapott karbonsavszármazékot hordozófehérjéhez kötöttem, s a fehérjekonjugátumok ellen nyulakban nyert antitestek segítségével haptén-homológ, indirekt ELISA rendszert dolgoztam ki [2, 43], mely a célvegyületet 0,3-70 µg/ml koncentráció-tartományban mutatja ki ( $IC_{50}=4,9\pm 0,5$  µg/ml) [4, 43], és vízmintákon, talaj- és gyümölcs-extraktumokon alkalmaztam. Keresztreakciós vizsgálatok szerint a triazolgyűrű önmagában nem elégséges molekuláris összetevő az antitestek kötődéséhez. Nemzetközi együttműködés keretében összehasonlítottam a *myclobutanil* immundetektációs módszerét egy olasz kutatócsoport által a szintén triazol fungicid, *tetraconazole* kimutatására kifejlesztett ELISA rendszerrel [44].

A *fenoxycarb* ún. harmadikgenerációs rovar-növekedésszabályozó, hatásában rendkívül specifikus, juvenilhormon-analóg. Emiatt korszerű és az integrált növényvédelmi technológiákba is felvett hatóanyag volt. Kedvező rovar-szelektivitási tulajdonságai mellett sajnos toxikusnak bizonyult egyes hasznos rovarokra, valamint vízi ízeltlábúakra és halakra is. Emiatt, valamint lassú lebomlása, tehát potenciális környezeti perzisztenciája miatt egyes alkalmazásaival kapcsolatban ökotoxikológiai aggályok merültek fel, illetve engedélyét az EU az idei évvel nem hosszabbította meg. Ez okból, valamint korábban említett rovarbiokémiai kutatásaink irányultsága miatt kívánatosnak látszott olyan ELISA módszert kifejleszteni, amellyel a *fenoxycarb* hatóanyagot környezeti, biológiai mintákban és terményekben ki tudjuk mutatni. A lehetséges hapténmolekulák szintézisének első irányaként a karbamát funkció O-etil-csoportjának O- $\omega$ -karboxi-alkil-csoportra történő módosítását választottam. Előállítottam és hordozófehérjéhez kötöttem az alapmolekula karbamát-csoportjának oxigénatomján 5-karboxi-pentil-csoportot tartalmazó haptént, majd az ez ellen nyert szérumok és további nagyszámú hapténmolekula [45-47] felhasználásával kialakított indirekt ELISA rendszerben a célvegyület alsó detektációs koncentrációhatára 0,5-4 ng/ml [3, 4, 47], a legjobb  $IC_{50}$  érték 17 ng/ml volt [47], a kimutatást nemcsak növényi mátrixokban [45, 46], de rovarbiológiai vizsgálatokban is sikeresen alkalmaztuk [48, 49].

#### *Immunanalitikai eljárások mikotoxinok kimutatására*

A hatvanas évek óta tartó intenzív mezőgazdasági növényvédőszer-felhasználásra, mint környezeti stresszfaktorra, számos kártevő – így bizonyos gombafajok is – ellenállóság, rezisztencia kialakulásával válaszolt. A gombakártevők körében erősödő rezisztencia, valamint az utóbbi években a növényvédő szeres alkalmazások gazdasági és környezeti okokból való

visszaszorulása miatt a gombák által termelt, toxikus hatású másodlagos vegyületek, az ún. mikotoxinok mind jelentősebb problémát képviselnek. Hazánkban e tekintetben talán legproblematicusabbak a *Fusarium* gombafajok, súlyos gondokat okozva elsősorban a gabona- és kukoricatermesztés terén. A *Fusarium* mikotoxinok egyik fő típusa, a zearalenon (F2) toxin kimutatására dolgoztam ki eljárást. Irodalmi előzmények alapján a zearalenon 2-aminooxi-ecetsavval történő oximálásával megfelelő hapténmolekulát állítottam elő, konjugáltam hordozófehérjékhez, s a nyulakból ezek ellen nyert szérumokból az antitesteket kicsapásos módszerrel tisztítottam. A tisztított immunoglobulin (Ig) frakció (mely IgG és IgM immunoglobulinok keveréke volt) segítségével hapténhomológ, indirekt ELISA rendszert dolgoztam ki és optimalizáltam a zearalenon kimutatására [50]. A célvegyület detekciós koncentrációtartománya 1–70 ng/ml közé esett, 10 ng/ml körüli  $IC_{50}$  értékkel [4, 50]. Az ELISA rendszerben egyéb mikotoxinokkal mutatott keresztreaktivitást vizsgálva megállapítottam, hogy a módszer zearalenonszármazék rezorcilaktonokra ( $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalenol, zearalanon,  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalanol) mérsékelt, a trichotecén deoxinivalenol (vomitoxin, DON) toxinra pedig nem keresztreaktív. Az optimalizált ELISA rendszerről kimutattam, hogy alkalmas gomba szövet-tenyészetben a zearalenon szintjének mérésére. A fenti immunogén ellen nemzetközi együttműködésben csirkékben is végeztünk immunizálási kísérleteket, s a tojásfehérjéből kinyert (IgY) antitesteket indirekt ELISA eljárásban alkalmaztuk. A módszer detekciós koncentrációtartománya 10–200 ng/ml közé esett, 45 ng/ml körüli  $IC_{50}$  értékkel. Ugyanakkor az IgY antitestek rendkívül nagy hígításban (1:76.000) is alkalmazhatóak voltak [51]. A mikotoxin immunanalitikai meghatározására az antitesteket multiplex ELISA rendszerben [52], valamint ellipszometria [53–57] és OWLS [58, 59] szenzortechnikával is alkalmaztuk. A most zárult „Aquafluosense” projektben [60] kifejlesztett moduláris lézerfluoreszcenciás műszer-prototípusban pedig fluoreszcens szubsztrátum alkalmazása immunfluoreszcenciás modul [61] kialakítását tette lehetővé. Szintén *Fusarium* mikotoxin a deoxinivalenol melyet multiplex ELISA rendszerben [50] és OWLS szenzorikával [59, 62] is mértünk, utóbbiban a 0,01–50 ng/ml koncentrációtartományban. Így a versengő típusú OWLS szenzor jól alkalmazhatónak bizonyult gabonaminták DON-tartalmának érzékeny meghatározására.

Hasonlóan fontos, döntően *Aspergillus* gombafajok által termelt mikotoxinok az aflatoxinok, melyek emlícsön karcinogén hatásúak, s emiatt érzékeny detektálásuk toxikológiai szempontból is jelentős feladat. A klímaváltozás miatti

patogénmigráció nyomán a szennyezőtípus sajnos terjedőben van hazánkban is. Versengő OWLS szenzorformátumban az aflatoxin B1 a deoxinivalenolhoz hasonlóan jól alkalmazhatónak bizonyult [63], az analitikai jel a 0,01–0,1 ng/ml koncentrációtartományban monoton koncentrációfüggést mutatott. A módszer fűszerpaprika-mintában – az erős mátrixhatás miatt – csak az 1–100 ng/ml koncentrációtartományban volt alkalmazható, ott viszont az OWLS immun-szenzoros méréseket ELISA és HPLC módszerrel is validáltuk [63]. Ellipszometriás technikában antitest helyett aptamereket is alkalmaztunk a molekuláris felismerésre [64, 65], s a módszerrel az aflatoxin B1 és az aflatoxin M1 is meghatározható volt a 0,01–10 ng/ml koncentrációtartományban. Az aflatoxin B1 és a sterigmatocisztin mikotoxinok mikrobiális lebontásának nyomon követésére műszeres (HPLC) módszert dolgoztunk ki [66, 67]. Az aptameralapú ellipszometriás módszer az aflatoxinra kifejlesztett eljáráshoz hasonlóan az ochratoxin A (OTA) kimutatására is kialakítható volt, s az OTA célvegyületet 0,1 ng/ml fölötti koncentrációkban detektálta, 8 ng/ml  $IC_{50}$  értékkel [68].

#### *Immunanalitikai eljárások egyéb kismolekulák kimutatására*

Az ipari gázokban és hulladékokban, valamint a különféle kipufogógázokban fokozódó környezeti veszélyforrást jelentenek a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok). Egy németországi meghívás során alkalmam nyílt arra, hogy részt vegyek egy egyszerű PAH vegyület, a pirén kimutatására szolgáló ELISA rendszer fejlesztésében. A munkában új típusú haptének előállításában és értékelésében közreműködtem. Pirénkarboxaldehyd 2-aminooxi-ecetsavval történő oximálásával hapténmolekulát állítottam elő, és konjugáltam különböző hordozófehérjékhez, majd UV spektroszkópiás úton igazoltam a haptén beépülését. E konjugátumot érzékenyítő antigénként alkalmazva és a 4-(1-pirenil)-vajsav haptén fehérjekonjugátuma ellen a német együttműködő által nyert szérumot használva érzékeny immundetekciós módszert nyertem pirén kimutatására ( $IC_{50}=2,2\pm 0,6$  ng/ml). A módszer érzékenységében hasonló a német kutatócsoport által korábban leírt – szintén haptén-heterológ – rendszerhez, ám módszerparamétereiben (érezkenyítés, szérumhígítás) lényegesen kedvezőbb, illetve a korábbiénál kisebb mértékű keresztreaktivitást mutat az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (US EPA) által javasolt 16 standard PAH vegyülettel és más származékokkal szemben [69].

A növényeket érő környezeti stressz egyik – közvetett – indikátora a növények citokinin hormontartalma. Egyes biogén és abiogén stressztényezők hatására e

növényi juvenilhormonok, melyeknek legfőbb képviselői a zeatin-ribozid (ZR) és az izopentenil-adenozin (IPA), szintje megemelkedik, így a hormonszint jelezheti – egyebek között – a növény fiziológiás (fiatal, illetve öregedési) állapotát, patogénekkal szembeni ellenállóképességét, valamint klimatikus és környezeti körülményekhez mutatott alkalmazkodóképességét. A citokinin hormonszint műszeres mérése rendkívül körülményes feladat, amely a minta szükséges előtisztítása miatt idő- és költségigényes. A lehetséges minta-előkészítést tovább korlátozza, hogy e hormonok hőérzékeny, könnyen bomló vegyületek. Emiatt célszerűnek látszott, hogy ELISA rendszert dolgozzunk ki e hormonszint kimutatására. A citokinin hormonokat – irodalmi módszerek alapján – kétféle kémiai úton hordozófehérjéhez kapcsoltam. Az egyik úton a ZR és az IPA kapcsolása során a ribozidgyűrű kémiai (nátrium-perjodátos) hasításával a molekulákon aldehidcsoportokat hoztam létre, mely funkciós csoportokat kondenzáció és redukció útján *in situ* kötöttem a fehérje aminocsoportjaihoz. A másik úton a ZR vegyületet izopentenil oldalláncán elhelyezkedő hidroxilcsoportján keresztül kötöttem a hordozófehérjéhez. A hapténbeépülést a konjugátumok izoelektromos fókuszálásával követtük, és nagyobb beépülési arányt észleltünk a ribozidcsoport oxidatív hasításával történő kapcsolás során [70]. A fenti citokinin-fehérjekonjugátumokat immunogénként és érzékenyítő antigénként alkalmazva haptén-homológ és -heterológ felépítésű, immobilizált antigén-alapú kompetitív ELISA rendszert dolgoztunk ki, melyet a legfőbb paraméterekre (az érzékenyítő antigén koncentrációja, szérumhígítás, pH, szerves oldószertartalom, inkubálási idők) optimalizáltuk. A haptén-homológ ZR ELISA rendszer és IPA ELISA rendszerek  $IC_{50}$  értéke rendre 19 ng/ml és 18 ng/ml, a KH értékek rendre 0,4 és 0,7 ng/ml voltak. Az ELISA rendszereket növényi mintákon alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a növények peroxidáz enzimetartalma jelentős zavaró hatást gyakorol a módszerre, emiatt az immunanalitikai jelzőenzimet peroxidázzal alkalikus foszfatázra cseréltük. A metanolos növényi extraktummintákat az ELISA kimutatáshoz pufferrel hígítani kellett, ami miatt az IPA hormon – melynek fiziológiás szintje alacsonyabb – szintjét natív növényekben nem minden esetben tudtuk meghatározni, a ZR szintje azonban minden esetben mérhetőnek bizonyult. Mindkét hormontípus esetén kimutatható hormonszint-emelkedést detektáltunk a natív növények, valamint ezek géntechnológiai úton módosított (GM), citokiningéneket magasabban expresszáló változatai között.

Rovarbiokémiai kutatási programunkhoz kapcsolódóan vizsgáltuk egyes rovarokban a juvenilhormonokkal koncertikusan ható ún. vedlési hormonok, az

ekdizonok szintjét. Kereskedelmi ELISA reagensekkel ekdiszteroidmeghatározást végeztünk levéltetvekben. A 20-hidroxi-ekdizont a rovarszervezetekből készült teljes test homogenizátumokban 0,1–4 µg/ml koncentrációtartományban tudtuk meghatározni. A mért ekdiszteroidkoncentrációk szoros összefüggést mutattak a levélatkák különböző alakjainak fekunditásával [71]. Emellett annak vizsgálatára, miként jelenhet meg a progeszteron a rovarszervezetben, és milyen időbeli és szervek közötti eloszlásdinamikát mutat, progeszteronspecifikus ELISA rendszert alkalmaztunk a hormon két rovarfajban történő szisztematikus mennyiségi analíziséhez. Az amerikai csótányban (*Periplaneta americana*) mindkét nemű egyedekben igen magas (130–150 ng/g) progeszteronszintet (vagy legalábbis a specifikus progeszteron antitestekkel reagáló vegyületek szintjét) mértünk a vedlést közvetlenül követő időszakban, amely szint túl nagy ahhoz, hogy táplálkozás útján felvett lehessen (bár a hormon túlnyomó részét az emésztőrendszer tartalmazta). Az egyes hormontípusok közötti különbségtétel érdekében a csótányban külön meghatároztuk a progeszteron mellett a tesztoszteron, az ösztradiol és a rovar-ekdiszteroidok szintjét, és csupán az ekdiszteroidokból és progeszteronból találtunk jelentős szinteket [72].

A biogén aminok szintjeinek vizsgálata jelentős élelmiszerbiztonsági feladat. OWLS immunszenzort alakítottunk ki a hisztamintartalom szelektív és érzékeny meghatározására erjesztett zöldséglevelekben. A kereskedelmi fogalmú antitestekkel kialakított direkt szenzorfelépítésben (immobilizált antitest) a hisztamintartalommal növekvő szenzorjelet kaptunk a 0,1–10 µg/ml koncentrációtartományban. Hatalmas javulást sikerült elérnünk a kimutatás csökkentésében, amennyiben indirekt OWLS szenzorkiépítést (immobilizált antigén) alkalmaztunk. Ehhez a célmolekula konjugátumát aminocsoportokkal módosított szenzorfelületre kötöttük, majd antitestekkel a minták hisztamintartalmával fordítottan arányos jelet kaptunk a 0,001–0,1 pg/ml koncentrációtartományban. Az antitest meglehetősen szelektívnek bizonyult a hisztaminra, hiszen a célvegyület mellett csupán a putreszcin, a cadaverin és az agmatin adott enyhe szenzorválaszokat. A módszer zöldséglémintákon már 1:1000 hígítás mellett hatékonynak bizonyult, amit HPLC módszerrel validáltunk [73]. A pusztán imidazolt tartalmazó haptén kiváló alkalmazhatósága meglepőnek mondható a triazolgyűrű korábban igazolt immunogenitásának (ld. fent) ismeretében.

A maláriaellenes természetes vegyület, a szeszkviterpén-lakton-endoperoxid artemizinin, mint gyógyszerhatóanyag iránti érdeklődés az ezredfordulón a



szintetikus kémiai és molekuláris biológiai előrelépések, valamint a lehetséges rákellenes alkalmazások nyomán megélénkült. Kínai kutatócsoporttal együttműködésben OWLS szenzort alakítottunk az artemizinin és rokon származékai kimutatására az egynyári ürömből (*Artemisia annua*) [74]. A korábbi tapasztalatokkal összhangban a versengő, közvetett OWLS szenzor itt is kedvezőbb kimutatást biztosított a megfelelő direkt OWLS szenzornál, ám a KH javulása itt „csak” két nagyságrendnyi volt. Az optimalizált rendszerben a koncentráció tartomány 0,001–10 ng/ml, az  $IC_{50}$  értékek az artemizinin, arteszunát és artemeter hatóanyagokra rendre 0,008, 0,05 és 1,4 ng/ml voltak. A méréseket HPLC módszerrel is megerősítettük, s a kifejlesztett OWLS módszerrel különböző eredetű gyógynövényeket és gyógyhatású kiegészítő termékeket elemeztünk.

### **Immunanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása makromolekulák kimutatására**

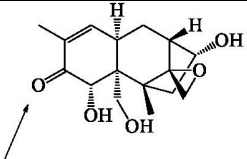
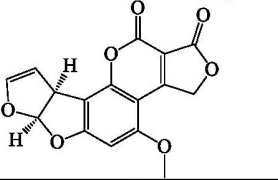
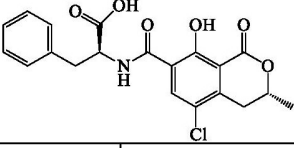
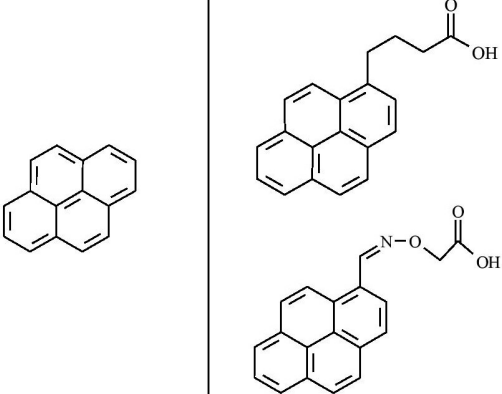
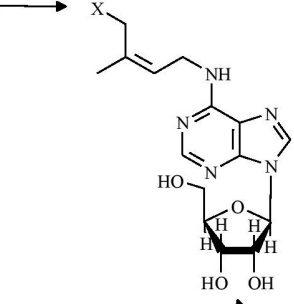
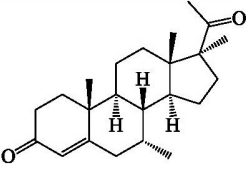
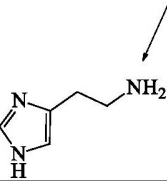
Az immunanalitikai eljárások makromolekulák kimutatására még közvetlenebb módon fejleszthetők, hiszen makromolekulák esetében a célmolekula kémiai vagy biokémiai átalakítás nélkül maga is mutathat immunogenitási tulajdonságokat. A vizsgálatok makromolekulás célvegyületeit és a kidolgozott immunanalitikai rendszerek kimutatási paramétereit a 2. táblázatban soroltam fel.

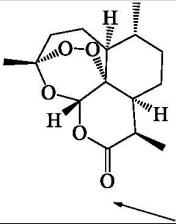
A rovar-egyedfejlődés szabályozásában betöltött kulcsszerepe miatt a juvenilhormon-észteráz (JHE) enzim szintjét, mint indikátor paramétert mérni kívántuk a rovar nyiroknedvben. Az enzimaktivitás mérésére mind a radiometrikus partíciós módszer, mind pedig az általunk korábban kidolgozott, S-alkiltioészter-alapú kolorimetriás módszer [75, 76] rendelkezésre áll. Emellett az is szükséges volt, hogy az enzimfehérje szintjeit is detektáljuk. E célra nyulakban termelt JHE-specifikus antitesteket alkalmazhatunk szendvics ELISA vagy *Western blot* gélelektroforetikus módszerekben, ám ezen eljárások hátránya, hogy az enzimfehérje teljes mennyiségét detektálják, függetlenül attól, hogy az katalitikusan aktív vagy inaktív formában van jelen a biológiai mintában.

Az ELISA módszer és az enzim affinitáskromatográfiás tisztítási módszerének kombinációjaként olyan – általunk affinitáserősítéses *immuno-assay* (AAIA) módszernek elnevezett – immunanalitikai eljárást dolgoztunk ki, amely az enzimfehérje detektálásán alapul, azonban a fehérjének csupán katalitikusan aktív formáira érzékeny [77, 78].

1. táblázat. A kismolekulák kimutatására kifejlesztett immunanalitikai rendszerek

Célvegyület	Hapténszármarazék <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ng/ml] <sup>b</sup>	Ref.
amitrole		ELISA ~10 μM	[1, 27]
glyphosate		ELISA rossz immunogén → szármarazékképzés	[1, 28-36]
trifluralin		ELISA 2,6–3,6 ng/ml OWLS 10 <sup>-6</sup> ng/ml	[37-39]
propanil		ELISA 2,2-6,1 ng/ml	[40]
acetochlor		ELISA 2,2–4,1 ng/ml	[41]
atrazine		ELISA 2,2 μg/ml	[42]
myclobutanil		ELISA 4,9 μg/ml	[2, 43, 44]
tetraconazole		ELISA 0,2 μg/ml	[44]
fenoxycarb		ELISA 17 ng/ml	[3, 4, 45-49]
zearalenon		ELISA 10 ng/ml ELFIA 10 ng/ml OWLS 0,014 ng/ml	[4, 11, 50-61]

deoxi-nivalenol		OWLS 0,01 ng/ml	[52, 59, 62]
aflatoxinok		OWLS 0,04 ng/ml APTA	[52, 63- 67]
ochratoxin A		APTA 8 ng/ml	[68]
pirén		ELISA 2,2 ng/ml	[69]
2-izopentenil-adenin (IPA), zeatin-riboszid (ZR)		ELISA 0,7 ng/ml (IPA) 0,4 ng/ml (ZR)	[70]
szteroid-hormonok		ELISA 0,09 ng/ml	[71, 72]
hisztamin		OWLS 1,5 µg/ml és 3x10 <sup>-6</sup> ng/ml	[73]

artemizinin		OWLS IC <sub>50</sub> : 7 pg/ml	[74]
-------------	---	------------------------------------	------

<sup>a</sup>A nyílak a kémiai beavatkozás helyét jelölik a célvegyületen a hapténmolekula kialakítására.  
<sup>b</sup>Gátlási középérték. ELISA: enzimjelzéses immunoassay, ELFIA: enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay, OWLS: optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia.

A módszerben a JHE enzim szelektív, szoros kötődésű, átmenetiállapot-analóg trifluor-metil-kezon (TFK) gátlószereinek fehérjekonjugátumait állítottam elő és alkalmaztam szilárd fázison rögzített ágensként. A fehérjekonjugátumok és JHE-specifikus antitestek felhasználásával új típusú, szilárd hordozós AAIA rendszert fejlesztettem ki. A módszerben a szilárd fázison rögzített TFK inhibitor szelektíven megköti a JHE fehérje kötődni képes (tehát katalitikusan aktív) frakcióját, s a megkötött enzimfehérje a szelektív antitestek segítségével indirekt ELISA módszerrel detektálható. Az eljárást, melynek alsó mérési határa 6 µg JHE mintánként, sikeresen alkalmaztam a JHE kis mennyiségeit tartalmazó híg Lepidoptera nyiroknedv- és petehomogenizátum-mintákban (kukorica bagolylepke (*Heliothis virescens*) és aranybagoly lepke (*Trichoplusia ni*)), valamint az enzim rekombináns bakulovíruson (*Autographa californica* nukleáris polihedrózis vírus, AcNPV) alapuló biotechnológiai expressziós rendszerében, natív és helyirányított mutagenézis útján módosított formáiban egyaránt.

Az OWLS technikát – modellalkotási céllal – marha szérumalbumin és humán hősokkfehérje (Hsp70) kimutatására is alkalmaztuk. Igazoltuk a Hsp70 kötődését a szenzorfelületen rögzített anti-Hsp70 antitestekhez, illetve fordítva, az antitestek kötődését a rögzített Hsp70 fehérjéhez. Előbbi formátumban kimutattuk, hogy a Hsp70 fehérjével a 0,1–100 pg/ml tartományban koncentrációfüggő szenzorjelet nyertünk [5].

Hasonló módon alkalmaztuk az OWLS technikát az endokrin zavaró hatások (feminizáció) kedvező indikátorának tekintett vitellogenin fehérje kimutatására. Ehhez szérumot nyertünk és tisztítottunk a vitellogenin előalakja, a lipovitellin ellen halból (ponty, *Cyprinus carpio*) és békából (keleti unka, *Bombina orientalis*). Az indirekt OWLS rendszerben a lipovitellint pontyban az 1–100 ng/ml, békában a 0,1–50 ng/ml koncentrációtartományban tudtuk kimutatni [79, 80]. A versengő OWLS szenzorformátum az IC<sub>50</sub> értékében két

nagyságrendnyi javulást eredményezett a „szendvics” típusú ELISA rendszerhez képest.

A *Bacillus thuringiensis* (Bt) kristályos parasporális endotoxinjai, a Cry toxinok jelentős mezőgazdasági szerephez jutottak az elmúlt évtizedekben. A Bt törzsek környezetünkben ubikviter talajlakó baktériumok és rovarokkórokozók. A Cry fehérjék összetételének azonosítása, egyedi fizikai-kémiai tulajdonságaik és biológiai specifitásuk felismerése számos áttörő eredményhez vezetett a mezőgazdasági kártevőirtás gyakorlatában. Ezek egyike a *B. thuringiensis*- vagy Bt-toxin-alapú biológiai rovarirtó szereken, a másika pedig a Bt-toxinokat kódoló génszakaszok beépítésével kialakított GM növényeken alapuló mezőgazdasági biotechnológiai megoldások. A *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* törzs által termelt Cry1Ab toxint – többféle forrásból származó kereskedelmi és saját kialakítású ELISA rendszerekkel behatóan vizsgáltuk a MON 810 GM kukoricában [81-83] és a Dipel biológiai rovarirtó készítményben. A vizsgálatokban az immunanalitikai rendszert részletesen validáltuk, a vonatkozó analitikai nehézségeket feltártuk [84-88], illetve a hatóanyag-meghatározást elvégeztük biológiai vizsgálatokban rovarokon [89, 90] és a *glyphosate* hatóanyaggal közös alkalmazásban [91] is. Ennek eredményeképpen volt megfogalmazható a MON 810 GM kukorica Pannon Bioföldrajzi Régióra vonatkozó környezeti értékelése [87, 88, 92].

A vizsgálatok során rendkívül fontos bioanalitikai ellentmondást tártunk fel. A Bt Cry1Ab toxinfehérjéje ún. protoxin, melynek molekulatömege 131 kDa, és molekulánként maximum 16 diszulfidkötéssel stabilizált bipiramidális kristályokat képez. A protoxin a rovarszervezetben aktiválódik, diszulfidkötések redukciója és a protoxin hidrolitikus hasítása során körülbelül 63-65 kDa molekulatömegű aktivált toxin képződik belőle. A MON 810-ben lévő transzgen ugyanakkor sem a protoxint, sem az aktivált toxint nem kódolja, hanem egy fehérjeformát a kettő között, egy részben rövidített, 91 kDa molekulatömegű, úgynevezett preaktivált Cry1Ab toxint. Vagyis a mikroorganizmus-alapú Bt rovarirtó és a MON 810 kukorica hatóanyagai eltérőek, de a rovarszervezetben mind az előbbi Cry1Ab protoxinja (131 kDa), mind az utóbbi előaktivált Cry1Ab toxinja (91 kDa) a rovarellenes hatásért felelős aktivált Cry1Ab toxinná (63-65 kDa) aktiválódik [87, 88, 92]. A kereskedelmi ELISA kiteket a bakteriális protoxin segítségével állították elő (immunogénként Cry1Ab protoxint használva), amelyek így torzított eredményeket adnak az előaktivált Cry toxin kimutatásakor: a protoxinra irányított antitestek várhatóan alacsonyabb

affinitást mutatnak a csonkolt előaktivált toxinféhrje iránt, ezért a protoxin-molekulák kimutatására validált kvantitatív immunoassay során kapott jelek valójában az előaktivált toxin magasabb koncentrációinak felelnek meg. A Cry1Ab protoxin tripszines bontásával a protoxin és az aktivált toxin közötti keresztreaktivitást meghatároztuk, és 0,41-0,56 közöttinek találtuk [82]. Ez azt jelzi, hogy az ELISA-készletek alkalmasak a Cry1Ab protoxin kimutatására (mikrobiális mintákban), de a MON 810 kukoricamintákon korrekciót igényelnek, és a tényleges előaktivált Cry1Ab toxinkoncentráció ezekben a *Bt*-kukoricamintákban 1,8-2,3-szor magasabb, mint amit a Cry1Ab protoxin-specifikus ELISA készletekkel kimutattak. Ez vonatkozik a MON 810 kukorica Cry1Ab-értékeire a tudományos szakirodalomban, beleértve a fajtatulajdonos, a Monsanto Corp. adatait is.

## 2. táblázat. A makromolekulák kimutatására kifejlesztett immunanalitikai rendszerek

Célvegyület	Molekulatömeg	Analitikai jellemzők <sup>a</sup>	Ref.
juvenilhormon-észteráz	~30 kDa	AAIA KH: 0,2 µg/ml	[75-78]
Hsp70	70 kDa	OWLS KH: 0,1 pg/ml	[5]
vitellogenin (lipovitellin előalakban)	96 és 110-120 kDa	ELISA KH: 500 ng/ml OWLS KH: 3 ng/ml	[79, 80]
<i>Bacillus thuringiensis</i> Cry endotoxinok			
Cry1Ab	protoxin: 131 kDa preaktivált toxin: 91 kDa aktivált toxin: 63-65 kDa	ELISA KH: 2 ng/ml	[81-91]
Cry34Ab1	14 kDa	ELISA KH: 0,3 ng/ml, 0,22 ng/g	[88, 93]
Cry35Ab1	44 kDa	ELISA KH: 0,3 ng/ml 0,11 ng/g	
Cry4	128 és 135 kDa	ELISA KH: 2 ng/ml	[94]

<sup>a</sup>AAIA: affinitáserősítéses immunoassay, KH: kimutatási határ, ELISA: enzimjelzéses immunoassay, OWLS: optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia.

A másik vizsgált *Bt*-kukorica a DAS 59122-7 fajta volt, amely a Cry34Ab1 (14 kDa) és Cry35Ab1 (44 kDa) bináris toxinokat termeli. Ezeknek a növénybeli termelődését szintén idő- és szervspecifikusan meghatároztuk, illetve a toxinok hatását tritrofikus rendszerben vizsgáltuk [88, 93]. Hasonló, de kevésbé lényeges különbségek mutatkoznak ezen toxinok esetében a mikrobiális és növényi bioszintetizált formák között, ahol a kukoricaeredetű Cry34Ab1 és Cry35Ab1 fehérjéket szinte azonosnak találták a mikrobák által expresszált

formákkal: a Cry34Ab1 N-terminálisán egy aminosav hiányzik, és 60, 50 és 42 kDa formákat tartalmaz a várt 13,6 kDa fehérje mellett. Emiatt ezen toxinok mikrobákból és kukoricából származó változatainak keresztreaktivitásaiban nem várhatók jelentős különbségek.

A fentiekén túlmenően, nemzetközi együttműködésben, a *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* törzs által termelt Cry4 toxin kimutatására is dolgoztunk ki ELISA eljárás, mely a célvegyületet 2 ng/ml KH mellett detektálta [94]. A fenti eredmények jelentős mértékben járultak hozzá a GM növények környezetbiztonságával kapcsolatos nemzetközi álláspont kialakításához [95, 96], illetve a biomassza-alapú gazdasági modell környezeti és ökológiai megítélésének kialakításához [97].

### Köszönetnyilvánítás

A munka – napjaink tudományos kutatási-fejlesztési programjaihoz hasonlóan – szinte minden esetben csapatmunka volt, melyben részt vettek kezdetben az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében (MTA NKI), később a Központi Környezet- és Élelmiszertudományi Kutatóintézetében (KÉKI), majd annak jogutódjainál (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Agrárkörnyezettudományi Kutatóintézet, NAIK AKK, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Környezettudományi Intézet, MATE KÖTI), valamint hazai és külföldi együttműködő partnerintézeteinkben dolgozó kollegáim, illetve azon egyetemi vagy PhD hallgatók, akiknek munkáját irányítottam vagy jelenleg is irányítom. Az együttműködő kollegák és hallgatók aktív részvétele nélkül a közleményeinkben és ebben az összefoglaló leírásban ismertetett eredmények nem – vagy csupán lényegesen lassabban – jöhettek volna létre, ezért közreműködésüket megköszönöm. Ehelyütt mondok hálát külföldi fogadóim/vendéglátóim vendégszeretetéért is. Köszönetemet hazai és külföldi együttműködőimnek abban a reményben is mondom, hogy a közös munkát – az eddigiekhez hasonló eredményességgel – mindannyiukkal tovább folytathatom.

### Irodalomjegyzék

- [1] Hammock, B.D., Gee, S.J., Harrison, R.O., Jung, F., Goodrow, M.H., Li, Q.X., Lucas, A., Székács, A., Sundaram, K.M.S. (1991) Immunochemical technology in environmental analysis: Addressing critical problems. In: Immunochemical Methods for Environmental Analysis. (Van Emon, J., Mumma, R.O., Eds.), *ACS Symp Ser*, (American Chemical Society, Washington, D.C.) 442: pp. 112-139.

- [2] Székács, A. (1994) Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems for environmental monitoring. *Acta Biol Hung*, **45**: 77-80.
- [3] Szurdoki, F., Jaeger, L., Harris, A., Kido, H., Wengatz, I., Goodrow, M.H., Székács, A., Wortberg, M., Zheng, J., Stoutamire, D.W., Sanborn, J.R., Gilman, S.D., Jones, A.D., Gee, S.J., Choudary P.V., Hammock B. D. (1996) Rapid assays for environmental and biological monitoring. *J. Environ Sci Health B*, **30**: 451-458.
- [4] Székács, A. (1996) Immunoassay rendszerek növényvédőszer-maradékok, mikotoxinok és növényi szteroidok környezeti kimutatására. *Biokémia*, **XX**: 66-72.
- [5] Levkovets, I., Adányi, N., Trummer, N., Váradi, M., Szendrő, I., Starodub, N.F., Székács, A. (2004) Development of optical (OWLS) immunosensors for macromolecules and small analytes. *Biokémia*, **XXVIII**: 7-15.
- [6] Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Székács, A. (2017) Evanescent field effect based nanobiosensors for agro-environmental and food safety. In: *Nanobiosensors: Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, (Grumezescu, A. M., Ed.), (Elsevier, Amsterdam, the Netherlands) **Vol. 8**: pp. 429-474.
- [7] Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2016) Label-free optical biosensors for monitoring cellular processes and cytotoxic agents at interfaces using guided modes and advanced phase-contrast imaging techniques. In: *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications* (Nikolelis, D. P., Nikoleli, G.-P., Eds.), (Springer, Cham, Switzerland) pp. 443-468.
- [8] Székács, A., Maloschik, E., Levkovets, I., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2005) Immobilization techniques of macromolecules and small analytes onto silica surfaces for the development of optical (OWLS) immunosensors. *FEBS J*, **272(Suppl.1)**: 528.
- [9] Székács, A., Adányi, N., Székács, I., Majer-Baranyi, K., Szendrő, I. (2009) Optical waveguide lightmode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring. *Appl Optics B*, **48**: 151-158.
- [10] Adányi, N., Szendrő, I., Székács, A. (2017) OWLS based nanosensors for agro-environmental and food safety. *J Adv Agric Technol*, **4(4)**: 335-339.
- [11] Nabok, A., Tsargorodskaya, A., Mustafa, M. K., Székács, I., Starodub, N. F., Székács, A. (2011) Detection of low molecular weight toxins using an optical phase method of ellipsometry. *Sens Actuators B*, **154**: 232-237.
- [12] Oldal, B., Maloschik, E., Uzinger, N., Anton, A., Székács, A. (2006) Pesticide residues in Hungarian soils. *Geoderma*, **135**: 163-178.
- [13] Maloschik, E., Ernst, A., Hegedûs, Gy., Darvas, B., Székács, A. (2007) Monitoring water polluting pesticides in Hungary. *Microchem J*, **85**: 88-97.



- [14] Maloschik, E., Mörtl, M., Székács, A. (2010) Novel derivatisation technique for the determination of chlorophenoxy acid type herbicides by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **397**: 537-548.
- [15] Székács, A., Mörtl, M., Darvas, B. (2015) Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary – surveys in 1990-2015. *J Chem*, **2015**: Article ID 717948, 15 pages.
- [16] Mörtl, M., Kereki, O., Darvas, B., Klátyik, Sz., Vehovszky, Á., Győri, J., Székács, A. (2016) Study on soil mobility of two neonicotinoid insecticides. *J Chem*, **2016**: Article ID 4546584, 9 pages.
- [17] Mörtl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Győri, J., Székács, A. (2017) Occurrence of neonicotinoids in guttation liquid of maize – soil mobility and cross-contamination. *Int J Envir Anal Chem*, **97(9)**: 868-884.
- [18] Mörtl, M., Klátyik, Sz., Molnár, H., Tömösközi-Farkas, R., Adányi, N., Székács, A. (2018) The effect of intensive chemical plant protection on the quality of spice paprika. *J Food Comp Anal*, **67**: 141-148.
- [19] Mörtl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Győri, J., Székács, A. (2019) Contamination of the guttation liquid of two common weeds with neonicotinoids from coated maize seeds planted in close proximity. *Sci Total Environ*, **649**: 1137-1143.
- [20] Mörtl, M., Takács, E., Klátyik, Sz., Székács, A. (2019) Aquatic toxicity and loss of linear alkylbenzenesulfonates alone and in a neonicotinoid insecticide formulation in surface water. *Sci Total Environ*, **652**: 780-787.
- [21] Mörtl, M., Vehovszky, Á., Klátyik, Sz., Takács, E., Győri, J., Székács, A. (2020) Neonicotinoids: spreading, translocation and aquatic toxicity. *Int J Environ Public Health*, **17**: 2006.
- [22] Mörtl, M., Takács, E., Klátyik, Sz., Székács, A. (2020) Appearance of thiacloprid in the guttation liquid of coated maize seeds. *Int J Environ Public Health*, **17**: 3290.
- [23] Klátyik, Sz., Darvas, B., Oláh, M., Mörtl, M., Takács, E., Székács, A. (2017) Pesticide residues in spice paprika and their effects on environmental and food safety. *J Food Nutr Res*, **56(3)**: 201-218.
- [24] Klátyik, Sz., Bohus, P., Darvas, B., Székács, A. (2017) Authorization and toxicity of veterinary drugs and plant protection products: residues of the active ingredients in food and feed and toxicity problems related to adjuvants. *Front Vet Sci*, **4**: 146.
- [25] Takács, E., Klátyik, Sz., Mörtl, M., Rácz, G., Kovács, K., Darvas, B., Székács, A. (2017) Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna* – the role of active ingredients and co-

- formulants. *Int J Envir Anal Chem*, **97(9)**: 885-900.
- [26] Jung, F., Székács, A., Hammock, B.D. (1990) An immunochemical approach to the detection of aminotriazoles using selective amino group protection by chromophores. *J Agric Food Chem*, **39**: 129-136.
- [27] Székács, A., Jung, F., Hammock, B.D. (1995) Chemical modification of haptens – Selective amino group protection by chromophores for an immunoassay for aminotriazoles. In: *New Frontiers in Agrochemical Immunoanalysis*. (Kurtz, D.A., Skerritt, J.H., Stanker, L., Eds.), (American Org. Anal. Chem., Washington, D.C.) pp. 65-75.
- [28] Mörtl, M., Németh, Gy., Juracsek, J., Darvas, B., Kamp, L., Rubio, F., Székács, A. (2013) Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchem J*, **107**: 143-151.
- [29] Defarge, N., Takács, E., Lozano, V., Mesnage, R., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., Székács, A. (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int J Environ Res Pub Health*, **13**: 264.
- [30] Klátyik, Sz., Takács, E., Mörtl, M., Földi, A., Trábert, Zs., Ács, É., Darvas, B., Székács, A. (2017) Dissipation of the herbicide active ingredient glyphosate in natural water samples in the presence of biofilms. *Int J Envir Anal Chem*, **97(10)**: 901-921.
- [31] Farkas, E., Szekacs, A., Kovacs, B., Olah, M., Horvath, R., Szekacs, I. (2018) Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: a proof of principle study on glyphosate. *J Hazard Mater*, **351**: 80-89.
- [32] Szekacs, I., Farkas, E., Gemes, B. L., Takacs, E., Szekacs, A., Horvath, R. (2018) Integrin targeting of glyphosate and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical biosensing. *Sc. Reports*, **8**: 17401.
- [33] Maderthaner, M., Weber, M., Takács, E., Mörtl, M., Leisch, F., Römbke, J., Querner, P., Walcher, R., Gruber, E., Székács, A., Zaller, J. (2020) Commercial glyphosate-based herbicides effects on springtails (Collembola) differ from those of their respective active ingredients and vary with soil organic matter content. *Environ Sci Poll Res*, **27 (14)**: 17280-17289.
- [34] Zaller, J., Weber, M., Maderthaner, M., Gruber, E., Takács, E., Mörtl, M., Klátyik, Sz., Györi, J., Römbke, J., Leisch, F., Spangl, B., Székács, A. (2021) Effects of glyphosate-based herbicides and their active ingredients on earthworms, water infiltration and glyphosate leaching are influenced by soil properties. *Environ Sci Eur*, **33**: 51.

- [35] Székács, A., Darvas B. (2012) Forty years with glyphosate. In: *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds* (Hasaneen, M. N. A. E.-G., Ed.), (InTech, Rijeka, Croatia) pp. 247-284.
- [36] Székács, A., Darvas, B. (2018) The re-registration of glyphosate in the European Union. *Front Environ Sci*, **6**: 78.
- [37] Hegedűs, Gy.; Bélai, I. and Székács, A. (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Anal Chim Acta*, **421**: 121-133.
- [38] Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via OWLS detection. *Anal Chim Acta*, **487**: 31-42.
- [39] Keresztes, Zs., Kálmán, E., Ernst, A., Székács, A. (2004) Atomierő-mikroszkóp alkalmazása OWLS alapú immunoszenzor felületének vizsgálatára. *Biokémia*, **XXVIII**: 2-4.
- [40] Krikunova, V., Hegedűs, Gy., Le, H.M., Eremin, S., Natangelo, M., Benfenati, E., Székács, A. (2002) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide propanil. *Int J Envir Anal Chem*, **82**: 865-878.
- [41] Hegedűs, Gy., Krikunova, V., Bélai, I., Eremin, S., Székács, A. (2002) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of acetochlor. *Int J Envir Anal Chem*, **82**: 879-891.
- [42] Le, H.M., Székács, A., Tőkés, G., Ferguson, B.S. (1996) Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical (ELISA) method. *J Environ Sci Health B*, **30**: 459-464.
- [43] Székács, A., Hammock, B.D. (1995) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the triazole fungicide myclobutanil. *J Agric Food Chem*, **43**: 2083-2091.
- [44] Székács, A.; Cairoli, S.; Le, H.M. and Pagani, S. (1996) Comparative studies on enzyme-immunoassays (ELISA) for the triazole fungicides tetraconazole and myclobutanil. *Acta Phytopathol Entomol Hung*, **31**: 293-301.
- [45] Le, H.T.M., Szurdoki, F., Székács, A. (2003) Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples. *Pest Manag Sci*, **59**: 410-416.
- [46] Székács, A., Le, H.T.M., Szurdoki, F., Hammock, B.D. (2003) Optimization and validation of an enzyme immunoassay for the insect growth regulator fenoxycarb. *Anal Chim Acta*, **487**: 15-29.
- [47] Szurdoki, F., Székács, A., Le, H.M., Hammock, B.D. (2002) Synthesis of haptens and protein conjugates for development of immunoassays for the

- insect growth regulator fenoxycarb. *J Agric Food Chem*, **50**: 29-40.
- [48] Dedos, S.G., Szurdoki, F., Székács, A., Shiotsuki, T., Hammock, B.D., Shimada, J., Fugo, H. (2002) Fenoxycarb levels and their effects on general and juvenile hormone esterase activity in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Pestic Biochem Physiol*, **73**: 174-187.
- [49] Dedos, S.G., Szurdoki, F., Székács, A., Mizoguchi, A., Fugo, H. (2002) Induction of dauer pupae by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*, **48**: 857-865.
- [50] Székács, A. (1998) Enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the *Fusarium* toxin zearalenone. *Food Technol Biotechnol*, **36**: 105-110.
- [51] Pichler, H., Krska, R., Székács, A., Grasserbauer, M. (1998) An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by yolk antibodies. *Fresenius J Anal Chem*, **362**: 176-177.
- [52] Bánáti, H., Székács, A., Fehér-Tóth, Sz., Czéh, Á., Darvas, B. (2017) Determination of mycotoxin production of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* in genetically modified maize varieties by quantitative flow immunocytometry. *Toxins*, **9(2)**: 70.
- [53] Nabok, A., Tsargorodskaya, A., Mustafa, M.K., Székács, A., Székács, I., Starodub, N.F. (2009) Detection of low molecular weight toxins using optical phase detection techniques. *Proc Chem*, **1**: 1491-1494.
- [54] Nabok, A. V., Erokhin, V., Erokhina, S., Szekacs, A., Mustafa, M. K., Al-Ammar, R. (2013) Extraction of mycotoxins from aqueous solutions using functionalized polyelectrolyte-coated microparticles. *BioNanoSci*, **3**: 79-84.
- [55] Al-Jawdah, A., Nabok, A., Jarrah, R., Holloway, A., Tsargorodska, A., Takacs, E., Szekacs, A. (2018) Mycotoxin biosensor based on optical planar waveguide. *Toxins*, **10**: 272.
- [56] Nabok, A., Al-Rubaye, A., Al-Jawdah, A. M., Székács, A., Tsargorodska, A., Takacs, E., Catanante, G., Marty, J.-L. (2019) Novel optical biosensing technologies for detection of mycotoxins. *Optics Laser Technol*, **109**: 212-221.
- [57] Nabok, A., Al-Jawdah, A. M., Gémes, B., Takács, E., Székács, A. (2021) An optical planar waveguide-based immunosensors for determination of *Fusarium* mycotoxin zearalenone. *Toxins*, **13(2)**: 89.
- [58] Székács, I., Adányi, N., Szendrő, I., Székács, A. (2021) Competitive optical grating immunosensors for determination of *Fusarium* mycotoxin zearalenone. *Toxins*, **13(1)**: 43.
- [59] Majer-Baranyi, K., Adányi, A., Székács, A. (2021) Biosensors for deoxynivalenol and zearalenone determination in feed quality control.

- Toxins*, **13(2)**: 499.
- [60] <http://www.aquafluosense.hu>
- [61] Gémes, B., Takács, E., Gádoros, P., Barócsi, A., Kocsányi, L., Lenk, S., Csákányi, A., Kautny, Sz., Domján, L., Szarvas, G., Adányi, N., Nabok, A., Mörtl, M., Székács, A. (2021) Development of an immunofluorescence assay module for determination of the mycotoxin zearalenone in water. *Toxins*, **13**: 182.
- [62] Majer-Baranyi, K., Székács, A., Szendrő, I., Kiss, A., Adányi, N. (2011) Optical waveguide lightmode spectroscopy technique based immunosensor development for deoxynivalenol determination in wheat samples. *Eur Food Res Technol*, **233**: 1041-1047.
- [63] Majer-Baranyi, K., Zalán, Zs., Mörtl, M., Juracsek, J., Szendrő, I., Székács, A., Adányi, N. (2016) Optical waveguide lightmode spectroscopy technique-based immunosensor development for aflatoxin B1 determination in spice paprika samples. *Food Chem*, **211**: 972-977.
- [64] Al Rubaye, A. G., Nabok, A., Catanante, G., Marty, J.-L., Takács, E., Székács, A. (2018) Label-free optical detection of mycotoxins using specific aptamers immobilized on gold nanostructures. *Toxins*, **10**: 291.
- [65] Al-Jawdah, A., Nabok, A., Abu-Ali, H., Catanante, G., Marty, J.-L., Szekacs, A. (2019) Highly sensitive label-free *in-vitro* detection of aflatoxin B1 in aptamer assay using optical planar waveguide operating as polarization interferometer. *Anal Bioanal Chem*, **411**: 7717-7724.
- [66] Kosztik, J., Mörtl, M., Székács, A., Kukolya, J., Bata-Vidács, I. (2020) Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of lactobacilli. *Toxins*, **12(12)**: 756.
- [67] Bata-Vidács, I., Kosztik, J., Mörtl, M., Székács, A., Kukolya, J. (2020) Aflatoxin B1 and sterigmatocystin binding potential of non-Lactobacillus LAB strains. *Toxins*, **12(12)**: 799.
- [68] Al Rubaye, A., Nabok, A., Catanante, G., Marty, J.-L., Takacs, E., Szekacs, A. (2018) Detection of ochratoxin A in aptamer assay using total internal reflection ellipsometry. *Sens Actuators B*, **263**: 248-251.
- [69] Székács, A., Le, H.M., Knopp, D., Niessner, R. (1999) A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons. *Anal Chim Acta*, **399**: 127-144.
- [70] Székács, A., Hegedűs, Gy., Tóbiás, I., Pogány, M., Barna, B. (2000) Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. *Anal Chim Acta*, **421**: 135-146.

- [71] Polgár, L.A., Darvas, B., Völkl, W., Porcheron, P., Székács, A., Szelinger, Sz. (1996) Comparison of ecdysteroid concentrations in different morphs of aphids. *Comp Biochem Physiol*, **115**: 179-183.
- [72] Darvas, B., Székács, A., Fónagy, A., Szécsi, M., Tóth, I. (1997) Progesterone in *Periplaneta americana* and *Neobellieria bullata* adults from the procuticle phase until the first progeny production. *Gen Comp Endocrinol*, **107**: 450-460.
- [73] Adányi, N., Székács, I., Szendrő, I., Székács, A. (2014) Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors. *Food Agric Immunol*, **25(1)**: 20-33.
- [74] Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Berki, M., Darvas, B., Wang, B., Szendrő, I., Székács, A. (2017) Development of immunosensors based on optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) technique for determining active substance in herbs. *Sens Actuators B*, **239**: 413-420.
- [75] McCutchen, B.F., Uematsu, T., Székács, A., Huang, T.L., Lucas, A., Hammock, B.D. (1993) Development of surrogate substrates for juvenile hormone esterase. *Arch Biochem Biophys*, **307**: 231-241.
- [76] McCutchen, B.F., Székács, A., Huang, T.L., Shiotsuki, T., Hammock, B.D. (1995) Characterization of a spectrophotometric assay for juvenile hormone esterase. *Insect Biochem Molec Biol*, **25**: 119-126.
- [77] Székács, A., Hammock, B.D. (1991) Affinity-amplified immunoassay for the detection of insect juvenile hormone esterase. *Biokémia*, **XV**: 152-153.
- [78] Székács, A., Gee, S., Jung, F., McCutchen, B.F., Hammock, B.D. (1992) An affinity-amplified immunoassay for juvenile hormone esterase. *Anal Biochem*, **207**: 291-297.
- [79] Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Nagy, A., Németh, Gy., Szendrő, I., Székács, A. (2013) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensor for detection of carp vitellogenin. *Sens Actuators B*, **176**: 932-939.
- [80] Majer-Baranyi, K., Adányi, N., Nagy, A., Bukovskaya, O., Szendrő, Székács, A. (2015) Label-free immunosensor for monitoring vitellogenin as a biomarker for exogenous oestrogen compounds in amphibian species. *Int J Envir Anal Chem*, **95(6)**: 481-493.
- [81] Szekacs, A., Juracsek, J., Polgar, L. A., Darvas B. (2005) Levels of expressed Cry1Ab toxin in genetically modified corn DK-440-BTY (YIELDGARD) and stubble. *FEBS J*, **272(Suppl.1.)**: 508.
- [82] Székács, A., Lauber, É., Juracsek, J., Darvas, B. (2010) Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. *Environ Toxicol Chem*, **29**: 182-190.

- [83] Székács, A., Lauber, É., Takács, E., Darvas, B. (2010) Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. *Anal Bioanal Chem*, **396**: 2203-2211.
- [84] Takács, E., Nagy, A, Gelencsér, É., Székács, A. (2015) Internal quality control of an enzyme-linked immunoassay for Cry1Ab toxin detection applied in animal tissues. *Acta Alimentaria*, **44(4)**: 593-600.
- [85] Székács, A., Weiss, G., Quist, D., Takács, E., Darvas, B., Meier, M., Swain, T., Hilbeck, A. (2012) Inter-laboratory comparison of Cry1Ab toxin quantification in MON 810 maize by enzyme-immunoassay. *Food Agric Immunol*, **23(2)**: 99-121.
- [86] Takács, E., Darvas, B., Székács, A. (2012) Analytical difficulties and certain biological aspects of Cry1Ab toxin determination in *MON 810* genetically modified maize. *Acta Phytopathol Entomol Hung*, **47(2)**: 293-306.
- [87] Székács, A., Darvas B. (2012) Comparative aspects of Cry toxin usage in insect control. In: Advanced technologies for managing insect pests (Ishaaya, I., Palli, S. R., Horowitz, R., Eds.), (Springer-Verlag, Berlin) pp. 195-230.
- [88] Székács, A. (2020) Environmental analytical and ecotoxicological aspects of *Bt* maize in the Pannonian Biogeographical Region of the European Union. In: GMOs: Implications for Biodiversity Conservation and Ecological Processes. Topics in Biodiversity and Conservation. Vol. 19 (Hawksworth, D. L. Pessoa de Miranda, M., Chaurasia, A., Eds.) (Springer Nature. Cham, Germany) pp. 149-172.
- [89] Darvas, B., Bánáti, H., Takács, E., Lauber, É., Szécsi, Á., Székács, A. (2011) Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on MON 810 maize. *Insects*, **2(1)**: 1-11.
- [90] Hansen, L. S., Lövei, G. L., Székács, A. (2012) Survival and development of a stored product pest, *Sitophilus zeamais* (Col.; Curculionidae) and its natural enemy, the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera, Pteromalidae) on transgenic Bt-maize. *Pest Manag Sci*, **69**: 602-606.
- [91] Mesnage, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, A., Séralini, G.-E. (2013) Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J Appl Toxicol*, **33**: 695-699.
- [92] Székács, A., Darvas, B. (2012) Environmental assessment of *MON 810* maize in the Pannonian Biogeographical Region. *Acta Phytopathol Entomol Hung*, **47(2)**: 307-320.
- [93] Takács, E., Fónagy, A., Juracsek, J., Kugler, N., Székács, A. (2012) Characterisation of tritrophic effects of *DAS-59122-7* maize on seven-spotted

- ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *IOBC/wprs Bulletin*, **73**: 121-134.
- [94] Fejes, Á., Takács, E., Fekete, G., Darvas, B., Ferguson, B. S., Saxena, D., Székács, A. (2012) Aquatic effect duration and degradation study of Cry4 toxin with immunoassay and *Aedes aegypti* larval biotest. *Aquatic Insects*, **34(Suppl.)**: 211-226.
- [95] Graef, F., Römbke, J., Binimelis, R., Myhr, A. I., Hilbeck, A., Breckling, B., Dalgaard, T., Stachow, U., Catacora-Vargas, G., Bøhn, T., Quist, D., Darvas, B., Dudel, G., Oehen, B., Meyer, H., Henle, K., Wynne, B., Metzger, M. J., Knäbe, S., Settele, J., Székács, A., Wurbs, A., Bernard, J., Murphy-Bokern, D., Buiatti, M., Giovanetti, M., Debeljak, M., Andersen, E., Paetz, A., Dzeroski, S., Tappeser, B., van Gestel, C. A. M., Wosniok, W., Séralini, G.-E., Aslaksen, J., Pesch, R., Maly, S., Doeringhaus, A., Werner, A. (2012) A framework for a European Network for a systematic environmental impact assessment of genetically modified organisms (GMO). *BioRisk*, **7**: 73-97.
- [96] Hilbeck, A., Binimelis, R., Defarge, N., Steinbrecher, R., Székács, A., Wickson, F., Antoniou, M., Bereano, P. L., Clark, E. A., Hansen, M., Novotny, E., Heinemann, J., Meyer, H., Shiva, V. and Wynne, B. (2015) No scientific consensus on GMO safety. *Environ Sci Europe*, **27**: 4.
- [97] Székács, A. (2017) Environmental and ecological aspects in the overall assessment of bioeconomy. *J Agric Environ Ethics*, **30(1)**: 153-170.



## 100 ÉVES A DEBRECENI EGYETEM ORVOSI VEGYTANI INTÉZETE<sup>1</sup>

A magyar királyi gróf Tisza István Tudományegyetem Orvosi Karát 1918-ben alapították négy intézettel. Bár a Kar vezetői mindent megtettek annak érdekében, hogy az orvosképzést minél hamarabb beindítsák, az 1919-es forradalmi események, majd a Tiszántúl román megszállása miatt a teljeskörű oktatást csak az 1921/22. tanévben sikerült megkezdeni. Az első években oktatott természettudományi tárgyak bevezetése területén tapasztalható késedelem abból adódott, hogy a vesztes I. világháború után jelentkező orvoshiány enyhítésére az orvoskar elsősorban a katonai szolgálat miatt tanulmányaikat megszakító magasabb évfolyamok mielőbbi végzését kívánta elősegíteni. Ráadásul az összeomlott Monarchia romjain felépülő országban nehéz volt a követelményeknek megfelelő, tekintélyes oktatót találni. A szervezés nehézségeire utal az, hogy a tanév első féléve csak 1921. november 4-én kezdődött el, még hozzá úgy, hogy a karnak nem volt saját kémia tanára. Ideiglenes megoldásként Hatos Gézá, a Pallagi Gazdasági Akadémia Kémia Intézetének tanárát kérték fel az orvosi kémia oktatására.



**1. ábra. A DMKE hajdani debreceni épülete (Bocskai tér 1.)**

Forrás: <http://debrecenikepeslapok.blogspot.com/2016/06/volt-egyszer-egy-demke.html>

<sup>1</sup> Jelen közlemény a szerző által 10 éve írt „90 éves a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézete” című cikk (Biokémia XXXV: 17-20, 2011) kiegészített és javított változata.

A felkérésnek Hatos Géza oly módon tett eleget, hogy hetente két alkalommal másfél-másfél órás előadást tartott a Dél-magyarországi Közművelődési Egyesület (DMKE, köznyelven Demke) termében. A Bocskai tér 1. szám alatt, a mai Benedek Elek Általános Iskola helyén állott épület érdekessége, hogy többek között itt működött Debrecen város internátusa (középiskolai kollégiuma), központi szülőotthona és a Kenézy Gyula által vezetett bábaképző is (1. ábra). A kémia gyakorlatokra a Pallagon lévő laboratóriumban került sor hetente egy alkalommal. A fennmaradt dokumentumok szerint a diákság a gyakorlatokat gyéren látogatta, amit azzal indokoltak, hogy az utazás sok idejüket veszi el, és ráadásul a fűtetlen villamos-vasúton (a mai villamos elődjén) még meg is fázhattak. Verzár Frigyes, az orvoskar dékánja átlátta a probléma lényegét, és 1921. december 15-én kelt levelében javaslatot tett egy önálló *Chemiai* Tanszék felállítására. Ennek szellemében az Orvosi Kar Tanácsa XII. rendes ülésén 1922. március 17-én döntött az Orvosi Vegytani Tanszék visszamenőleges hatállyal történő létrehozásáról, amelynek az Orvosi Fizika Tanszékkel megosztva a DMKE épületében, az I. emeleten biztosítottak egy szobát. 2021-ben ennek az (utólagos) intézetalapításnak ünnepeljük a századik évfordulóját. A százéves intézmény vezetőit és megnevezéseit a kezdetektől napjainkig az 1. táblázat foglalja össze.

### 1. táblázat. Intézeti vezetők és szervezeti egységek az elmúlt 100 évben

Időszak	Név	Beosztás és a szervezeti egység megnevezése
1921-1922	Hatos Géza	gazdasági akadémiaitanár, megbízott előadó (1921-től Vegytani Tanszék)
1922/23. tanév	Doby Géza	nyilvános rendes tanár, igazgató (1922-től Orvosi Vegytani Intézet)
1923-1950	Bodnár János	nyilvános rendes tanár, igazgató (1924-től Chemiai Intézet) (1927-től Orvosi Vegytani Intézet)
1950-1952		magántanár, megbízott igazgató
1952-1953	Straub János	egyetemi docens, igazgató
1953-1956		egyetemi tanár, igazgató
1956/57. tanév	Porcsalmy Ilona	egyetemi adjunktus, igazgató
1957/58. tanév	Szarvas Pál	nyilvános rendes tanár, megbízott igazgató
1958-1961		egyetemi docens, megbízott igazgató
1961-1987	Bot György	egyetemi tanár, igazgató
1987-1988		egyetemi docens, megbízott igazgató
1988-2012	Gergely Pál	egyetemi tanár, igazgató
2012-	Virág László	egyetemi tanár, igazgató

Az Intézet rangjára emelt szervezeti egység vezetésére 1922-ben Doby Géza, a Budapesti Közgazdasági Egyetem magántanárának pályázatát fogadták el, különös tekintettel arra, hogy a jelölt jártas volt a *biochémi*ai kutatásokban, ami az orvosképzés szempontjából különösen fontos biológiai szemléletet biztosította. Doby Géza debreceni megbízatása azonban nem tartott sokáig, mert 1923-ban tanszékvezetői kinevezést nyert a Közgazdasági Egyetemre, így egy év után visszatért Budapestre. Később jelentős tudományos pályát futott be, 1934-ben a Magyar Tudományos Akadémia (MTA) levelező tagja lett, 1946-ban rendes taggá választották.

A megüresedett intézetvezetői pozícióra kiírt pályázatot Bodnár János, a szegedi Ferenc József Tudományegyetem helyettes tanára és megbízott tanszékvezetője nyerte el, aki elsősorban a mezőgazdasági kémia iránt érdeklődött, azonban újabb munkáit az *enzymologia* területén végezte. Érdekes módon Bodnár János 1923-ban egyszerre kapott nyilvános rendes tanári kinevezést a szegedi és a debreceni Tudományegyetemen, és ekkor ő Debrecenre választotta. Egy tanársegéd és három díjtalan gyakornok segítségével az ő vezetésével indult meg az orvostanhallgatók és a bölcsészhallgatók kémia oktatása az 1923/24. tanévben. 1924-ben javaslatára az intézmény nevét *Chemiai* Intézetre változtatták, azonban 1927-től visszatértek az eredeti Orvosi Vegytani Intézet megnevezésre, amelyet azóta is folyamatosan használunk. Az ő vezetése idején 1924-ben költözött az Intézet a Bem tér 18/B. (régebben Magoss György tér) alatt található, volt Tanítói Árvaház egyik épületébe (2. ábra). 1924-ben Bodnár János elvállalta a debrecen-pallagpusztai Magyar Királyi Dohánykísérleti Állomás laboratóriumának vezetését, és 1928-tól ő lett a budapesti Növénykémiai Intézet címzetes igazgatója is.

Érdekes adalék, hogy Tankó Béla, a Debreceni Egyetem Biokémiai Intézetének későbbi alapítója, iskolateremtő professzora és a Magyar Biokémiai Társaság első elnöke 1927-ben az ő irányításával kezdte el nagyívű tudományos pályafutását az Orvosi Vegytani Intézetben. Bodnár Jánost eredményei elismeréseként 1937-ben az MTA levelező tagjává választotta. Az 1930-1933 közötti három tanévben ő volt az Orvostudományi Kar dékánja, majd az 1943/44. tanévben a Tisza István Tudományegyetem rektorává nevezték ki. A következő tanévben rektorhelyettesként tevékenykedett, és a rektor távozása után gyakorlatilag ő irányította az Egyetemet. A II. világháború legsötétebb időszakában, 1945 őszén a helyén maradt, sőt számos elmenekült professzortársa helyettesítését is magára vállalta. A háború utolsó évében a

Vegytani Intézet épületét súlyos bombatalálat érte, ezért 1945-47 között a kémia oktatását a klinikatelepen lévő elméleti intézetekben kellett megoldani. Ebben a nehéz időszakban, 1947-ben az Orvosi Vegytani Intézet szerves kémiai csoportja kivált, és a bölcsészkar keretében megalakított Szerves Kémiai Intézetben folytatta munkáját.



**2. ábra.** Az Orvosi Vegytani Intézet épülete (Bem tér 18/B.). Balogh István fotója.

Bodnár János mindent megtett annak érdekében, hogy a megrongálódott Bem téri épületet helyreállítsák, és erőfeszítéseinek köszönhetően 1948-tól 1950-ben bekövetkezett nyugdíjba vonulásáig újra a régi környezetben folytathatta az oktatást és szerteágazó, az orvosigazságügyi, növényvédelmi, dohány- és ásványkémiai területeket felölelő kutatómunkáját. Idősebb korában, 1949-1950 között munkatársai, Straub János intézeti tanár és Andrassy Katalin tanársegéd helyettesítették a vezetésben. Végül 1950-ben Straub János vette át az intézet igazgatását. Ő 1953-ban kapott egyetemi tanári kinevezést az 1951-ben kialakított Debreceni Orvostudományi Egyetemen (DOTE). Néhány év alatt egységesítette a kutatási-profil, úgy, hogy elsősorban az ásványi és gyógyvizek

analitikájának fejlesztését helyezte előtérbe. 1956-ban bekövetkezett váratlan halála után Porcsalmi Ilona egyetemi adjunktus kapott ideiglenes vezetői megbízatást, majd az 1957/58. tanévben Szarvas Pál professzor, a Természet-tudományi Kar Szervetlen és Analitikai Tanszékének vezetője másodállásban látta el az intézet igazgatását.

A vezetőkésztés nehézségeit Bot György egyetemi docens 1958-ban történő igazgatói megbízása oldotta meg. Korábban (1955–1957) a DOTE oktatási dékánhelyettese volt, és kinevezése után az 1959/60. tanévben a DOTE oktatási rektorhelyettesi feladatait látta el. 1961-ben megkapta egyetemi tanári kinevezését, és ilyen minőségben 1987-ig állt az Intézet élén. Nagy hangsúlyt fektetett az orvostanhallgatók kémia oktatására, „Általános és szervetlen kémia”, valamint „A szerves kémia alapjai” című tankönyvei számos kiadást értek meg. Egyetemtörténeti munkássága is jelentős: több, a Debreceni Orvostudomány Egyetem történetét bemutató könyv szerzője, illetve társszerzője volt. Irányítása alatt az intézet kutatási tevékenysége fokozatosan újra biokémiai jellegűt öltött. A szénhidrátanyagcsere, ezen belül a glikogénlebontás szabályozása vált az intézet fő témájává. A kutatók többsége, Andrassy Katalin, Fábri Gyuláné, Nagy Zoltánné és Porcsalmi Ilona átállt az új témára, Nagy Zoltán a Központi Kutató Laboratóriumban kapott állást, egyedül Dezső István folytatta tovább az intézetben a vasanyagcsere vizsgálatát. A kutatógárda kiegészült a következő években belépő Dósa Istvánnal, Vereb Györggyel és Csornai Mártával. A régebbi munkatársak analitikai kémiai jártassága szerencsésen ötvözött a fiatalabbak biokémiai érdeklődésével. Bot professzor témaválasztása nagyon szerencsésnek bizonyult, mert a glikogén lebontásában kulcsszerepet játszó glikogén foszforiláz idővel az enzimaktivitás allosztérikus és kovalens módosításon alapuló szabályozásának iskolapéldájává vált. Az intézet tudományos közleményei széleskörű elismerést váltottak ki, és utat nyitottak munkatársai számára ahhoz, hogy külföldi tanulmányutakon bekapcsolódjanak a nemzetközi színvonalú kutatások világába. Ez az indíttatás nagyon fontos volt az intézet jövője szempontjából, mert hozzájárult ahhoz, hogy többen elismert kutatókká váljanak. Varsányi Magdolna Németországban, a Bochumi Egyetemen ért el sikereket.

A legkiemelkedőbb tanítvány, Gergely Pál egyetemi docens 1987-ben lett az Orvosi Vegytani Intézet megbízott igazgatója, és egy év múlva, 1988-ban kapta meg egyetemi tanári és intézetigazgatói kinevezését. A fiatalabb munkatársak közül hárman: Dombrádi Viktor, Erdődi Ferenc és Csontos Csilla később érték el

a professzori címet. Gergely professzor számos hasznos újítást vezetett be az intézet életébe. Az ő nevéhez köthető az intézetben dolgozó önálló kutatócsoportok létrehozása (2. táblázat). Négy csoport Gergely Pál, Dombrádi Viktor, Erdődi Ferenc és Csontos Csilla vezetésével az enzimfehérjék szerkezete és funkciója közötti összefüggést, ezen belül a fehérje foszforilációt és defoszforilációt katalizáló protein kinázokat és foszfatázokat tanulmányozta. Vereb György németországi tanulmányútról visszatérve egy új témát vezetett be, amikor a foszfolipid metabolizmus egyik fő enzime, a foszfatidil-inozitol-4-kináz vizsgálatára tért át.

## 2. táblázat. Kutatócsoportok az Orvosi Vegytani Intézetben

Időszak	Vezető	Kutatócsoport
1987-2021	Gergely Pál	Jelátvitel és fehérje foszforiláció, később Glikogén anyagcsere kutatócsoport
1992-2021	Dombrádi Viktor	Protein defoszforilációs kutatócsoport
1993-2008	Vereb György	Foszfoinozítid jelpálya kutatócsoport
1992-	Erdődi Ferenc	Protein foszfatázok és molekuláris kölcsönhatások kutatócsoport
1998-2017	Csontos Csilla	Jelátvitel az endotéliumban kutatócsoport
2017-	Boratkó Anita és Csontos Csilla	
1999-	Virág László	ADP-riboszilációs kutatócsoport
2006-	Bay Péter	Sejtmetabolizmus kutatócsoport
2010-	Lontay Beáta	Izomadaptációs kutatócsoport majd Sejtbiokémiai kutatócsoport
2016-	Uray Karen	Bélmotilitás kutatócsoport
2016-	Tar Krisztina	Proteaszóma és mitokondriális dinamika kutatócsoport

Az általa 1993-ban létrehozott foszfoinozítid jelpálya kutatócsoportot 2008-ban bekövetkezett nyugdíjazásáig vezette. 1999-ben csatlakozott a Vegytani Intézethez Virág László, a Debreceni Egyetem Kórélettani Intézetének korábbi kutatója, aki 2005-ben szerezte meg az MTA doktora címet és 2007-ben kapta meg egyetemi tanári kinevezését. Az általa létrehozott új kutatócsoport a fehérjék ADP-riboszilálásával és az oxidatív stressz mechanizmusával foglalkozott. Az intézet szabadabb légköre, az intézetvezető által támogatott hazai és nemzetközi együttműködések hálózata, valamint az újonnan megnyíló pályázati lehetőségek és a PhD képzés bevezetése jelentős mértékben segítették a kutatómunkát és az eredmények színvonalas közleményekben

történi publikálását. Sikeres tudományos munkássága elismeréseként Gergely Pált 2004-ben az MTA levelező tagjává, 2010-ben pedig az MTA rendes tagjává választották. Az Intézet vezetésén túl jelentős tudományos közéleti szerepet játszott az Egyetem, illetve az MTA különböző bizottságaiban és szervezeteiben, a Magyar Biokémiai Egyesületben, az OTKA Élettudományi Kollégiumában, valamint a Magyar Akkreditációs Bizottságban. A tudományos munka megújításán kívül modernizálta az egyetemi oktatást. 1986-ban két kollégájával (Dombrádi Viktor és Farkas Ilona) elindította az angol nyelvű kémiaoktatást a külföldiek számára megnyitott térítéses orvostudományi képzés keretein belül. Támogatta és elősegítette a modern molekuláris biológiai szemlélet bevezetését az orvos és a biológus szakon. Az utóbbi új képzési forma akkreditálásában és irányításában Dombrádi Viktor, mint a Debreceni Egyetem Molekuláris Biológiai Szervezetének elnöke vállalt vezető szerepet. Gergely Pál munkatársaival (Erdődi Ferenc és Vereb György), valamint a társegyetemek professzoraival (Penke Botond és Tóth Gyula) megírta az orvostanhallgatók nemzedékei által használt „Általános és bioszervetlen kémia,” illetve a „Szerves és bioorganikus kémia” című tankönyveket. Az utóbbi kötet angol nyelven is megjelent. 1997-1999 között az ÁOK első dékánjaként, majd 1999-ben a DOTE tudományos rektorhelyetteseként előkészítette a Debreceni Egyetem (újra) egyesítését. 2000-2010 között a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségügyi Centrumának tudományos elnökhelyetteseként vett részt az egyetem irányításában. Munkájával hozzájárult ahhoz, hogy 2005-ben az Orvosi Vegytani Intézet az újonnan épített Élettudományi Központban (ÉTK) a Debreceni Egyetem középpontjához közel, egy modern épületben kapott elhelyezést, ahol a XXI. század követelményeinek megfelelő körülmények között folytathatja működését (3. ábra).

Az egyetemi rendszerváltás izgalmas évei után az utolsó évtizedben a konszolidálódás és a további fejlődés szakasza következett, ami a 2012-ben intézetvezetőnek kinevezett Virág László professzor irányítása alatt zajlott le. Az új vezető egy jól működő intézetet vett át, ahol nem volt szükség alapvető átalakításra, azonban az eddig elért eredmények megőrzése mellett választ kellett találni az új kihívásra, amit a hallgatói létszám jelentős növekedése okozott. Az angol nyelvű képzések sikere, az új tárgyak és képzési formák és az egyetem több karán (FOK, NEK, ETK, TTK) végzett átoktatás megsokszorozta az oktatási feladatainkat, miközben az oktatói álláson lévő munkatársak létszáma nem növekedett a feladattal arányos módon.

Ezt a kérdést csak a kutatási pályázatok (MTA Lendület, OTKA, GINOP) terhére felvett kollégáink és a PhD hallgatók bevonásával tudtuk megoldani. Egyetemi pályázatok támogatásával modernizáltuk a gyakorlati oktatást, és a hallgatók munkáját számos (elektronikus) tankönyv, jegyzet és oktatási segédanyag kiadásával segítettük elő. Sikeres tudományos pályázataink hozzájárultak az intézeti kutatási területek kiszélesítéséhez és új kutatócsoportok felállításához.



**3. ábra. Az új Élettudományi Épület és Könyvtár bejárata (Egyetem tér 1.).** A szerző felvétele.

Virág László tanítványa, Bay Péter 2006-ban egy új Sejtmetabolizmus kutatócsoportot alapított, amelyet 2014-ben elnyert Lendület pályázata segítségével megerősített és kibővített. 2015-ben megszerezte az MTA doktora címet majd 2018-ban megkapta egyetemi tanári kinevezését. 2010-ben az Erdődi munkacsoportból kivált Lontay Beáta lett az új Izomadaptációs munkacsoport vezetője, amely később a tematika kibővülése után Sejtbiokémiai kutatócsoport néven folytatta tovább a kutatásait. 2016-ban az Egyesült Államokból, a University of Texas Medical School-ból hazánkba érkezett Karen Uray létrehozta a bélkontraktilitást tanulmányozó csoportot, és az USA-beli tanulmányútjáról hazatérő Tar Krisztina megalakította a proteaszóma szerepét vizsgáló csoportot. Ezekkel együtt már nyolc kutatócsoport dolgozott



az intézetben (2. táblázat), melyek munkájában megerősödött a sejtbiológiai és az élettani szemlélet. A Lendület csoport elhelyezésére az Egyetem biztosított megfelelő helységeket az ÉTK 1. emeletén, továbbá az intézeti műhely átalakításával egy újabb laboratóriumi helységeket alakítottunk ki az alagsorban. A megnövekedett területen nagyobb létszámmal dolgozó csoportok publikációs tevékenysége egyenletesen magas színvonalon stabilizálódott (az intézet publikációs tevékenysége 2010-től napjainkig nyomon követhető a <https://chemistry.med.unideb.hu/hu/node/51> oldalon).

Az utóbbi időszak tudatos fejlesztési stratégiájának köszönhetően folyamatosan gyarapodott és modernizálódott az Orvosi Vegytani Intézet műszerparkja. A modern és drága eszközök jobb kihasználása érdekében három szolgáltató laboratóriumot hoztunk létre. A Biomolekuláris Interakciók Laboratórium (Erdődi Ferenc) a makromolekulák és a kisméretű ligandok közötti kölcsönhatások széles spektrumát tudja elemezni a rendelkezésre álló, egymást kiegészítő technikák segítségével. A plazmon rezonancián alapuló Biacore-3000 készülék és a hőváltozáson alapuló MicroCalITC200 izotermikus mikrokaloriméter alkalmas a vizsgált kölcsönhatás kinetikai és termodinamikai jellemzésére. A laborban található MonolithNT.LabelFree és MonolithNT.115 berendezésekkel az autofluoreszcenciát mutató, illetve a fluoreszcens jelölést hordozó molekulák változatos kölcsönhatásainak egyensúlyi állandóját határozzák meg a mikroskálás termoforézis elve alapján. Végül a fehérjék feltekeredését, illetve denaturálódását Prometheus NT.48 készülékkel lehet követni. A Bioenergetikai Központi Laboratórium (Bay Péter) eszközeivel, az Oroboros Oxygraph 2k és a Seahorse XF96 segítségével élő sejtek oxigénfelvételét és egyéb, metabolizmusra jellemző paramétereket (pl. a pH változása) lehet meghatározni. A High Throughput Screening Szolgáltató Laboratórium (Virág László) alpműszere, a Tecan Freedom EVO 150 folyadékkezelő robot nagyszámú minta előkészítését, pl. molekulakönyvtárak szűrését teszi lehetővé. A minták automatikus tesztelésére szolgál a Tecan Spark 20M Multimode mikroplate olvasó, illetve az Opera Phenix High-Content Screening System, ami egy nagy áteresztőképességű képképező és képanalizáló eszköz. Ezeket egészíti ki néhány kisebb, de fontos berendezés, mint a Novocyte 3000 asztali citométer, a BIO-SUN UV besugárzó, az NO mérésére használt Sievers Nitric Oxide Analyser és az ECIS (Elecric Cell-Substrate Impedance Sensor), amivel sejtrétegek impedanciája mérhető. (A műszerek teljes listája megtalálható a <https://chemistry.med.unideb.hu/hu/node/47> honlapon.) Természetesen ezek a nagy értékű eszközök nemcsak saját kutatásainkat segítik elő, hanem az egyetemen

dolgozók és az egész magyar kutatóközösség számára elérhetőek.

Az intézetben folyó kutatómunkába számos tehetséges hallgatót vontunk be, munkásságuk eredményét tükrözi a benyújtott és elfogadott szakdolgozatok, diplomamunkák, TDK pályamunkák, illetve PhD disszertációk, valamint az elnyert díjak nagy száma. A TDK munka szervezésében és irányításában fontos szerepet játszik Erdődi Ferenc professzor, aki 2013-óta a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Tudományos Diákköri Tanácsának elnöke. Ebben az időszakban intézetünk kutatói számos konferencia szervezésében vettek részt, amelyek közül a legemlékezetesebbek a Debrecenben Virág László által szervezett két FEBS kurzus (2003 és 2010), valamint a budapesti PARP 2017 (Bay Péter) és a debreceni Europhosphatase 2019 (Lontay Beáta és Erdődi Ferenc) nemzetközi tudományos találkozók voltak. Az egyre sokrétűbb és bonyolultabb oktatási és kutatási adminisztráció lebonyolítására Virág professzor átszervezte és megerősítette az irodai munkát végző csapatot. Kétségtelen, hogy az ő háttérmunkájuk is hozzájárult az intézet sikeres működtetéséhez.

Végül a szép történet utolsó éveiben beköszöntött a pandémia, ami szigorú higiéniai szabályaival, a kötelező távolságtartással, a távoktatással és az online konferenciákkal eddig még nem látott próbatétel elé állított mindenkit. Az első hullám során begyűjtött tapasztalatokat felhasználva a második hullám közben viszonylag könnyen átköltöztettük oktatásunkat a virtuális térbe, bevezettük az elektronikus írásbeli tesztek rendszerét, és megszerveztük a biztonságos vizsgáztatás feltételeit. Legnagyobb eredményünk az volt, hogy a vizsgaidőszakban oktatóink és hallgatóink közül senki nem fertőződött meg. Bár a vizsgák átlaga egy kicsit csökkent, a hallgatók többsége sikeresen átvészelte a szokatlan körülmények közötti megmérettetést. Közleményeink száma és minősége töretlen maradt, és egy rövid kényszerszünet után a PhD védések és a tudományos konferenciák is áttértek a „virtuális” és „hibrid” kerékvágásba. Ezt illusztrálja az, hogy az aktuális helyzetnek megfelelően Virág László és Szekanecz Zoltán professzorok közösen egy nagy érdeklődés kiváltó *online* COVID-19 szeminárium sorozatot szerveztek. Úgy tűnik, hogy kutatómunkánk a munkatársak elkötelezettsége révén kiállta a próbát. Most a széleskörű immunizálás nehézségeit látva elgondolkodhatunk elődeink példáján, akik a legnehezebb időszakok (pl. világháborúk) után elkezdték, illetve újrakezdték a munkát és lehetővé tették azt, hogy most megemlékezzünk az Orvosi Vegytani Intézet centenáriumáról.

Az Orvosi Vegytani Intézet tevékenysége megismerhető és folyamatosan nyomon követhető a <https://chemistry.med.unideb.hu/hu> honlapon. A centenáriumi rendezvény videó felvétele visszanezhető a <https://www.youtube.com/watch?v=Bc7fPBK4iCI> címen.

### **Forrásművek**

Bot György: A Debreceni Orvostudományi Egyetem története és professzorainak életrajza, 1918–1988. Csokonai Kiadó, Debrecen, 1990.

Bot György és Kapusz Nándor: Nyolcvanéves a debreceni orvostudományi intézetek és klinikák története, professzorainak életrajza 1918-1998. Debreceni Orvostudományi Egyetem, Debrecen, 1998.

Kapusz Nándor, Petrovics Alica, Vásárhelyi Ferencné: Kilencvenéves a debreceni orvostudományi intézetek és klinikák története, professzorainak életrajza 1918-1998. Debreceni Orvostudományi Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Debrecen, 2008.

Orosz István és ifj. Barta János szerkesztők: A Debreceni Egyetem története 1912–2012. Debreceni Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2012.

Oláh Éva szerkesztő: Az Általános Orvostudományi Kar története. Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Debrecen, 2012.

Mátyus László szerkesztő: 100 éves a debreceni orvostudományi intézetek és a tanszékek története; II. Az Általános Orvostudományi Kar professzorainak életrajza. Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Debrecen, 2019.

Virág László szerkesztő: 100 éves az OVI: 1921-2021. Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen, 2021.

**Dombrádi Viktor**  
**egyetemi tanár**  
**Debreceni Egyetem,**  
**Általános Orvostudományi Kar,**  
**Orvosi Vegytani Intézet**  
**e-mail: dombradi@med.unideb.hu**

## A HŐ-, FÁJDALOM- ÉS TAPINTÁSÉRZÉS RECEPTORAI: A 2021. ÉVI ORVOSI-ÉLETTANI NOBEL-DÍJ ÉS SZEGEDI VONATKOZÁSAI

**Jancsó Gábor és Sántha Péter**  
**Szegedi Tudományegyetem, SZAOK, Élettani Intézet**  
[gaborjancso@yahoo.co.uk](mailto:gaborjancso@yahoo.co.uk), [santha.peter@med.u-szeged.hu](mailto:santha.peter@med.u-szeged.hu)

*Ha sok cseresznyepaprikát madzagra fűzünk, abból lesz a paprikakoszorú. Ha viszont nem fűzzük fel őket, nem lesz belőlük koszorú. Pedig a paprika ugyanannyi, éppoly piros, éppoly erős. De mégse koszorú. Csak a madzag tenné? Nem a madzag teszi. Az a madzag, mint tudjuk, mellékes, harmadrangú valami. Hát akkor mi?  
Aki ezen elgondolkozik, s ügyel rá, hogy gondolatai ne kalandozzanak összevissza, hanem helyes irányban haladjanak, nagy igazságoknak jöhet a nyomára.  
/Örkény István: Az élet értelme/*

Az idei orvosi-élettani Nobel-díjat David Julius és Ardem Patapoutian, Egyesült Államokban dolgozó kutatóknak ítelték a hőmérséklet és a tapintás receptorainak felfedezéséért ("for their discoveries of receptors for temperature and touch."). A receptor megnevezés félreértésekre adhat alkalmat, hiszen ezt először az érző receptorok változatos megjelenésű struktúráira alkalmazták a morfológiában, majd a farmakológiában és a biokémiában a specifikusan kötődő agonisták, antagonisták és ligandok molekuláris kötőhelyének megjelölésére szolgált. Jelen esetben a receptor kifejezés a kémiai-, hő- és mechanikai ingerek által aktivált transzmembrán fehérjét, specifikus ioncsatornákat jelöli.

Nem túlzás azt állítani, hogy a hő-, fájdalom- és tapintás érzékelés molekuláris alapjainak felfedezése több évszázados kutatómunka betetőzése. „Die Geschichte einer Wissenschaft, ist die Wissenschaft selbst” (Goethe). Tekintsük hát át az érző receptorok/idegvégződések működésére vonatkozó lényegesebb elképzeléseket. Tudományos igénygel elsőként Descartes ismertette az érzékelés és a reflexműködés lehetséges élettani folyamataira vonatkozó elképzeléseit. Posztumusz művéből [1] ismert híres illusztrációja a tűz melege keltette inger által az idegeken keresztül a központi idegrendszerbe vezetett ingerület útját ábrázolja; az ingerületet az idegekben áramló „éltető szellem” (*spiritus animalis*) továbbítja a központi idegrendszer felé meghatározott idegi pályán. Bár ennek az elképzelésnek nem volt semmilyen kísérleti háttere, annyiban mindenképpen úttörő jelentőségű, hogy először vetette fel a szenzoros ingerek/ingerületek specifikus pályákon történő továbbítását. Hasonló jelentőségű ez a felvetés Franz Joseph Gall frenológiai elképzeléséhez – a koponya kidudorodásai és bemélyedései alapján kívánta meghatározni az emberek mentális/

intellektuális tulajdonságait –, amelynek semmilyen valós alapja nem volt, de elsőként vetette fel az ún. lokalizációs elvet, vagyis azt, hogy az eltérő agyi funkciók különböző agy(kérgi) területekhez kötöttek. Mindkét elképzelés megszabta a későbbi analitikus és kísérleti tudományos kutatómunka alapjait.

Igazi előrelépést az érző működések tudományos igényű vizsgálatában a 19. századi természettudósok vizsgálódásai jelentettek. Morfológiai, elsősorban ezüstimpregnációs, majd methylenkék-vitálfestéses módszerekkel számos jellegzetes struktúrájú érző idegvégződést, receptort írtak le, elsősorban a bőrben, mint pl. Merkel, Vater, Pacini, Meissner, Krause idegvégződéseket, valamint a szabad idegvégződéseket [2]. Johannes Müller megállapításai, amit a specifikus idegi energiák tanaként [Gesetz der spezifischen Sinnesenergien, 1826] [3] foglalt össze, a mai napig hatnak a szenzoros működéseket érintő elképzelésekre. Müller szerint az inger az adott érző receptorra jellemző érzetet vált ki; az ingerület specifikus, az adott modalitásra jellemző érző pályákon keresztül jut el a központi idegrendszerbe. Ezzel megalapozta a *specifitász teóriát*, amelyet Helmholtz azzal egészített ki, hogy a keletkező érzeteket az érintett idegek/pályák specifikus központi idegrendszeri kapcsolatai határozzák meg.

További előrelépést a 19. sz. végén és a 20. sz. első évtizedeiben tett elektrofiziológiai megfigyelések hoztak. Elsősorban Adrian klasszikus, az egyrost (single unit) aktivitásra vonatkozó vizsgálataiban állapította meg, hogy az érző receptorok nagymértékben specifikusak, ingerületet csak a rájuk jellemző adekvát ingerek váltanak ki bennük [4]. Ezt követően, több évtizedes kísérleti munka eredményeként részletesen jellemezték a bőrt, nyálkahártyát, harántcsíkolt izmot és zsigeri szerveket innerváló érző receptorokat; az elsődleges érző neuronok specifitása ma már minden vitán felül áll és a szenzoros fiziológia alapját képezi.

Különösen heves viták övezték a fájdalomérzés közvetítésében szerepet játszó neurális mechanizmusok természetére vonatkozó elképzeléseket, állatkísérletes vizsgálatokat és humán megfigyeléseket. Egyaránt sikerült érveket felsorakoztatni az intenzitás, ingerületmintázat (pattern) és a specifitász teória mellett. Ezt elsősorban a fájdalomérzés rendkívül bonyolult fiziológiai mechanizmusai, a kísérő autonóm (vegetatív) és magatartási reakciók, valamint – humán szempontból rendkívül jelentős – emocionális és pszichológiai kísérő jelenségek komplexitása magyarázza. Jelen írásunkban csak azokat a fájdalomérzés perifériás – az érző receptorok és elsődleges érző neuronok

működését érintő – mechanizmusokat tárgyaljuk, amelyek megértését a korai (nem kis részben Szegedhez köthető), és a későbbi, Nobel-díjjal elismert kutatások is jelentős mértékben előmozdították. Alapvető megállapítás, hogy a szomatoszenzoros idegrendszer fájdalomérző receptorai, a nociceptorok (Sherrington elnevezése) [5] nagymértékben specifikusak, csak nagy intenzitású, szövetkárosodást vagy a szövetkárosodás veszélyét magukban hordozó mechanikus, hő és kémiai ingerekre válaszolnak. A morfológiai, elektrofiziológiai és neurokémiai vizsgálatok a fájdalomkeltő ingerekre válaszoló nociceptív elsődleges érző neuronok anatómiájára, elektro- és membránfiziológiai, valamint neurokémiai sajátosságaira vonatkozóan óriási és jelentős ismeretanyagot szolgáltatottak. Ifj. Jancsó Miklós és Jancsó-Gábor Aranka szegedi farmakológusok megfigyelései mutattak rá először arra, hogy bizonyos fájdalomérző receptorok működése farmakológiai úton drámai módon befolyásolható. Gyulladáskeltő vegyületek vizsgálata kapcsán figyeltek fel arra, hogy a capsaicin, a paprika csípős anyaga, bár igen erős fájdalomkeltő, ismételt helyi vagy szisztémás adagolást követően jellegzetes érzéstelenséget, ún. capsaicin deszenzibilizációt hoz létre. A capsaicinnel kezelt állatok (patkány, tengerimalac, kutya) tartósan érzéketlenné váltak kémiai anyagokkal kiváltott fájdalommal és meleggel szemben, míg mechanikai ingerekkel fájdalomreakciók továbbra is kiválthatók maradtak. Ezen „szenzoros neuronblokkoló” hatás abban is megnyilvánult, hogy ezekben az állatokban az ún. neurogén gyulladás – kémiai irritánsokkal kiváltható, az érző beidegzés integritásához kötött szöveti reakció – sem volt kiváltható. Megállapították, hogy a fájdalomérző idegvégződések afferens funkciójuk mellett, vagyis amellet, hogy nociceptív ingerületet szállítanak a központi idegrendszer felé, ingerületi állapotukban végződéseikből egy közelebbről nem identifikált „neurohumor” felszabadítása révén befolyásolják az innervált szövet vaszkuláris reakcióit. Ezek a vizsgálatok alapozták meg a fájdalomérző idegvégződések kettős funkciójára vonatkozó – ma már tankönyvi szinten is megjelenő – elképzeléseket [6–11], és elsőként mutattak rá arra, hogy a fájdalomérző receptorok működése farmakológiai úton szelektíven gátolható, megalapozva ezzel a „szenzoros farmakológia” addig nem létező szakterületét [6, 12]. A capsaicin hatását perifériás – az érző neuronok szintjén megvalósuló – hatásnak tulajdonították, amit alátámasztottak Pórszász János és ifj. Jancsó Miklós elektrofiziológiai vizsgálatai is, miszerint a capsaicin a velőtlen, C-rostokra fejt ki hatását [13]. Megerősítették ezt az elképzelést Joó Ferenc elektronmikroszkópos vizsgálatai is, miszerint a capsaicin az érző ganglionok B típusú neuronjaiban mitochondriális károsodásokat okoz [14]. A capsaicin deszenzibilizáció jelenségét Ifj. Jancsó Miklós önkísérletben az emberi

bőrön végzett vizsgálataiban is igazolta, ami egyben azt is bizonyította, hogy a capsaicin farmakológiai hatásai emberben is hasonlóak a főleg kistrágyásokban megfigyelt hatásokhoz [10,15,16]. A capsaicinnal kiváltott kémiai és hő analgészia alapvetően különbözik a helyi érzéstelenítőkkel előidézhető érzéstelenségtől, ami nem korlátozódik csak a fájdalomérző idegekre; ezek általánosan gátolják az idegrostok ingerületvezetését, a nem-fájdalmas érzőmodalitásokat, valamint a motoros és vegetatív idegek funkcióit is. A helyi érzéstelenítők és a capsaicin farmakológiai hatásainak összehasonlítása során továbbá arra is rájöttek, hogy a capsaicinnal kiváltott neurogén gyulladási válasz akkor sem esik ki, ha a helyi érzéstelenítés teljesen megszüntette a capsaicinnal kiváltott fájdalom érzékelését. Többek között ezekből a megfigyeléséből vonta le ifj. Jancsó Miklós már 1955-ös nagy monográfiájában azt a következtetést, hogy a kémiai (és később általa bizonyított módon a hő) és mechanikai érzékelés az érző idegvégződéseiben teljesen eltérő „receptormechanismusokkal” valósulnak meg [10]. Érdemes itt eredetiben idézni ifj. Jancsó Miklós interpretációját és következtetéseit a capsaicin deszenzibilizáció jelenségével kapcsolatban, amit a „Speicherung” c. Monográfiájában (1955) írt. „A kísérleti eredmények egészen egyértelműen arra utalnak, hogy az érző idegvégződéseket a kémiai és mechanikai ingerek két különböző receptormechanizmus útján hozzák ingerületbe. Csak ennek feltételezésével válik érthetővé, hogy a tapintási ingerek teljes mértékben hatásosak maradnak, miközben a kémiai ingerlékenység gyakorlatilag teljesen eltűnik. A szaruhártyán megfigyelt jelenségeket legjobban úgy lehet magyarázni, hogy a mechanikus ingerek az érző idegvégződéseket direkt, fizikai úton hozzák ingerületbe\*, azaz nem kémiai anyag (mediátor) közvetítésével. [\*Mindazonáltal elképzelhető, hogy a mechanoszenzitív idegvégződéseiben piezoelektromos struktúrák vannak jelen.] A kémiai ingerek más mechanizmus útján hatnak, ami capsaicinnal izolált módon kikapcsolható.” Ezek a megállapítások nagyon szépen „rezonálnak” a 2021. évi Nobel-díj indoklásával.

Napjainkban különös jelentőségre tett szert azon megfigyelése is, miszerint a capsaicin deszenzibilizált állatok magasabb környezeti hőmérsékleten nem képesek regulálni testhőmérsékletüket a hypothalamikus melegérző thermoreceptorok működésének kikapcsolása következtében (ld. lentebb) [10]. A capsaicin hőregulációra kifejtett hatásaira vonatkozóan Szegeden ifj. Obál Ferenc, Benedek György és munkatársaik tettek lényeges megfigyeléseket [17–20].

Későbbi vizsgálatokban Szolcsányi János, aki 1962-64 között Ifj. Jancsó Miklós munkatársa volt, egy-rost elektrofiziológiai vizsgálatokkal bizonyította, hogy a capsaicin szelektíven a polymodális nociceptorokat izgatja [21]. Szolcsányi és Jancsó-Gábor Aranka, az Ifj. Jancsó Miklós által megkezdett szerkezet-hatás vizsgálatokból kiindulva kísérletet tettek a capsaicin hatásért felelős feltételezett molekuláris struktúra meghatározására [22]. További kísérletekben Szolcsányi János Barthó Loránddal együtt bizonyította, hogy a capsaicin-érzékeny idegek szerepet játszanak zsigeri szöveti reakciók mechanizmusában [23, 24]. Később Szolcsányi János és munkatársai, Helyes Zsuzsanna, Pintér Erika és Pethő Gábor fontos megfigyeléseket tettek a capsaicin-szenzitív érző idegek és a TRPV1 receptor szenzoros működésekben és egyes szervek gyulladáshoz vezető folyamataiban betöltött szerepére vonatkozóan is [25–28].

A capsaicin sajátos farmakológiai hatásainak kísérletes alkalmazását jelentős mértékben hátráltatta, hogy egészen az 1970-es évek végéig nem sikerült azonosítani és jellemezni a capsaicin-hatás lehetséges morfológiai szubsztátumait, azaz azt a speciális érző neuron populációt, amelyre a capsaicin jellegzetes élettani és farmakológiai hatásait kifejti. Ennek lehetőségét az a felfedezésünk teremtette meg, miszerint újszülött állatokban (patkány, egér, kutya) a capsaicin az érző neuronok egy morfológiailag jól definiálható populációjának szelektív degenerációját hozza létre [29]. Megállapítottuk azt is, hogy újszülött állatokban az érintett érző neuronokban jelentős  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  akkumuláció figyelhető meg [30, 31]; ezt a jelenséget David Julius és munkatársai döntő módon használták ki a capsaicin receptort kifejező klónok identifikálásában. Az érintett capsaicin-szenzitív, helyesebben kemoszenzitív – hiszen ezek az érző receptorok más fájdalom- és gyulladáskeltő kémiai anyagokra is érzékenyek – primer szenzoros neuronok a kis, B-típusú, velőtlen, C-rostokkal rendelkező érző ganglionsejteknek felelnek meg. A capsaicin szelektív neurotoxikus hatását kihasználva először sikerült a fájdalomérzés közvetítésében alapvető szerepet játszó érző ganglionsejtek és a nociceptív primer afferensek központi idegrendszeri megoszlásának direkt morfológiai kimutatása ([32], ld. címlapfotó). Az újszülöttkorban capsaicinnel kezelt állatok egész életük során érzéketlenek a kémiai irritánsokkal, így a capsaicinnel kiváltott fájdalmas ingerekkel szemben és bőrükben a neurogén gyulladáshoz vezető válasz egyáltalán nem váltható ki. Az állatokban egyéb károsodások nem mutathatók ki, és nem-fájdalmas és fájdalmas (fájdalomreakciót kiváltó) mechanikai ingerekre a naiv állatokhoz hasonlóan reagálnak. Vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a capsaicin és rokon vegyületei szelektív szenzoros



*neurotoxinok* [33], amelyek a C-rosttal rendelkező elsődleges érző neuronokat, amelyek az összes érző ganglionsejt mintegy 50%-át teszik ki, szelektíven és irreverzibilisen elpusztítják. Ezért, az ilyen állatok kitűnő modellnek bizonyultak a fájdalomérzés mechanizmusainak, valamint olyan gyulladással, immun-, szekréciós-, zsigeri és egyéb szöveti folyamatok vizsgálatában, amelyekben feltételezték a kemoszenzitív, ill. nociceptív érző idegek szerepét. További kísérleteink során olyan kísérleti paradigmát vezettünk be (perineurális capsaicin kezelés), amely lehetővé teszi, hogy egy kiválasztott perifériás ideg ellátási területében szelektíven és tartósan felfüggeszünk a nociceptív/kemoszenzitív szomatikus és viscerális afferens C-rostok működését, lehetővé téve az adott terület nociceptív, vaszkuláris, reflex és gyulladással kapcsolatos mechanizmusainak vizsgálatát [34–40]. Ezeket a módszereket a világ szenzoros működésekkel és fájdalomkutatással foglalkozó vezető – köztük hazai – laboratóriumaiban is kiterjedten alkalmazták, ill. alkalmazzák.

Az újszülöttkori capsaicin kezelés paradigmát felhasználva sikerült a nociceptív primer szenzoros neuronok lehetséges ingerületátvivő anyagainak azonosítása. Fred Lembeck és munkatársai a P-anyagot (substance P) mint az antidrómos vazodilatáció mediátor anyagát azonosították [41]. Későbbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a szenzoros neurogén vazodilatáció valódi mediátora a CGRP [42–44]. Tomas Hökfelttel és munkatársaival kollaborációban végzett immunhisztokémiai vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a capsaicin-érzékeny érző neuronok valamint a spinális és medulláris afferensek a P-anyag mellett egyéb neuropeptideket, mint somatosztatint és egy CCK-szerű peptidet is tartalmaznak [45]. Később kimutatták, hogy a capsaicin-szenzitív neuronok jelentős populációja CGRP-t is tartalmaz [46]. Ennek – a gyakorlati medicina szempontjából is fontos – jelentőségére a migrén pathomechanizmusának vizsgálatára irányuló – Dux Mária által Szegeden is végzett – vizsgálatok mutattak rá [47–51]. Ezek az eredmények arra a ma már közismert tényre utaltak, hogy a nociceptív érző neuronok transzmitter anyagukat tekintve igen heterogén populációt képeznek.

A capsaicin szelektív neurotoxikus hatásának felismerése szerepet játszott a capsaicin receptor azonosítására irányuló vizsgálatokban, amint ezt Michael Caterina, a capsaicin receptor felfedezését ismertető 1997-es *Nature* cikk [52] első szerzője is kifejtette: „One early clue that nociceptive neurons might express signaling proteins distinct from those of other neuronal subtypes was the observation that exposure of neonatal rats to capsaicin, the main pungent

ingredient in hot peppers, produces a lifelong depletion of small-diameter sensory neurons, with no such effects on larger diameter neurons. As adults, these animals exhibit diminished responsiveness not only to subsequent capsaicin challenge, but also to other painful stimuli (Jancsó, G. et al., 1977)". Feltételezték, hogy a capsaicin szelektív hatásának oka abban keresendő, hogy ezek a neuronok nagy mértékben kifejezik a feltételezett capsaicin receptort, amelynek létezését, ganglionáris és gerincvelői lokalizációját a Szallasi és Blumberg [53] által felfedezett capsaicin analóggal, a resiniferatoxinnal végzett ligandkötési kísérletek is igazolták [54].

David Julius a capsaicin receptor azonosítására irányuló vizsgálataik megkezdéséről nemrégiben a következőképpen nyilatkozott [55]: „Amikor neurotranszmitterekkel dolgoztam, mindig egy kicsit frusztrálva éreztem magam, mert nagy volt a távolság a molekuláris biológiai kísérleti eredmények és a viselkedési (agyi funkcionális) jelenségek között. Úgy tűnt, hogy a szenzoros rendszerek vizsgálata esetében kicsit könnyebb lehet a helyzet. Ingereljük a rendszert, és közvetlenül megfigyelhetjük, hogy mi történik. Akkoriban a szenzoros rendszerek közül a fájdalomérzékelés tűnt a legkevésbé feltárt területnek. A fájdalomkutatókat, akik között akkor még nem sok molekuláris biológus akadt, olyan dolgok érdekelték, mint például a capsaicin. Addigra már elég sokat tanultam ezekről a dolgokról, hogy lássam, a capsaicinre úgy tekintenek, mint a Szent Grálra. Azt sejtettem, hogy az idegsejtek capsaicin érzékenységét a szenzoros neuronokban a már általunk korábban kimutatott ioncsatornákhöz, a P2X purinerg receptorokhoz vagy a 5-HT<sub>3</sub> szerotonin receptor altípushoz hasonlóan valamilyen még ismeretlen ioncsatorna közvetítheti. Emlékeztetnék arra, hogy abban az időben a genomika még kezdetleges volt, és egyáltalán nem volt egyszerű egy új gént/fehérjét beazonosítani. A fájdalom kutatók kemény munkával egymás után azonosítottak újabb és újabb P2X és 5-HT receptor altípusokat az érző neuronokból. És minden egyes alkalommal, amikor egy új típust felfedeztek, rögtön arra voltak kíváncsiak, hogy vajon mutat-e az új molekula capsaicin érzékenységet? Mi is próbálgattuk ezt egy darabig, de azután arra gondoltam, hogy tenni kell egy lépést hátra, és nem csak azokat a receptorokat kell vizsgálni, amelyeket már ismerünk és a kezünkben vannak, hanem valami gyökeresen újat. Ugyanakkor volt némi bizonytalanság és kockázat is a dologban. Egészen addig, amíg nem klónoztuk a capsaicin receptort, számos olyan közlemény jelent meg, amelyek megkérdőjelezték a capsaicin specifikus receptorális hatását. Ilyen előzmények után jól emlékszem arra a pillanatra, amikor a végső döntésem megszületett.

Egyszer egy szupermarket fűszerekkel tömött polcai előtt ácsorogtam (gondolataimba merülve). Majd előkerült Holly, a feleségem (Holly Ingraham, az UCSF professzora), és látva a töprengésemet, azt mondta: „Ez egy nagyon érdekes probléma! Hagyd abba a tökölést, és próbáld meg, vágj bele!” Akkor határoztam el, hogy megpróbálom beazonosítani a capsaicin receptort. Akkoriban Mike (Michael Caterina) éppen a GABA receptorokkal foglalkozott, azonban tudomásomra jutott, hogy Benny Bentlerék megtalálták és azonosították a GABAB receptort. Mondtam neki: „Tudod mit? Próbáljuk meg ezt a capsaicin dolgot! Vagy azt kockáztatod, hogy még dolgozol egy darabig a GABA receptoron, amit majd mások hamarabb leközölnek, vagy most belevágunk egy teljesen új dologba!” Végül az utóbbi mellett döntött.” [55].

David Julius, Michael Caterina és munkatársaik a capsaicin receptor azonosítására, a lehetséges cDNS klónok izolálására funkcionális szkrínelési stratégiát alkalmaztak [52, 56]. Az emlős sejt expressziós klónozási stratégia alkalmazását az tette lehetővé, hogy szenzoros neuronokban a capsaicin robusztus kalcium akkumulációt okoz *in vivo* [30, 31] és *in vitro* [57]. Feltételezték, hogy a capsaicin receptort kifejező cDNS ezt a tulajdonságot nem-neuronális sejtekre is átviszi, és ezekben capsaicin hatására intracelluláris kalcium akkumulációt detektálhatnak racionális kalcium imaging technikával. Ezért egér és patkány hátsógyöki ganglionsejtekből készített kevert poly-adenylált mRNS frakciót izoláltak, majd ebből plazmid cDNS könyvtárat hoztak létre, amelynek  $2,4 \times 10^6$  klónját 144 alkönyvtárba osztották szét. Az így létrejött alkönyvtárakat HEK293 sejt vonal sejtjeibe transzfektálták, és a sejt kultúrákat capsaicin adásával tesztelték a kalcium akkumuláció igazolására. Az egyes kultúrák tehát olyan sejteket tartalmaztak, amelyek a transzfeccióhoz használt 5-10000 különböző plazmidből számos (de nem az összes) plazmidnak megfelelő fehérjét expresszáltak egy, a sejtre jellemző egyéni kombinációban. Azokból a sejt kultúrákból, amelyek capsaicin hatására reagáló sejteket tartalmaztak, újabb 10 cDNS alkönyvtárat készítettek, és ezeket ismét transzfektálták naiv HEK293 sejt kultúrákba, majd tesztelték capsaicin érzékenységüket. Ezt a ciklust többször ismételve lehetővé vált a capsaicin receptort kódoló gén felszaporítása és a receptorra negatív klónok eliminációja. Végül a capsaicin érzékeny HEK293 sejtekből egy VR1 klónnak nevezett 3 kilobázispár hosszú DNS szekvenciát sikerült azonosítani. A szekvencia egy 838 aminosav hosszúságú, 95 kDa molekulatömegű fehérjét kódol, amely N- és C-terminusa egy-egy hosszabb intracelluláris, valamint 6 transzmembrán domént tartalmaz. Az 5. és a 6. transzmembrán domén között egy rövid hidrofób szekvenciát

tartalmaz, amelyről feltételezték, hogy a csatorna pórus régiójához tartozik. Az akkor elérhető fehérjeadatbázisokban végzett homológia kutatási vizsgálatok kimutatták, hogy a klónozott fehérje jelentős strukturális hasonlóságot mutatott a korábban *Drosophila*-ból izolált tranziens receptorpotenciál receptor (TRP) molekulákkal. Az elmúlt több mint két évtizedben a Julius laborból számos, igényesen megtervezett és elegánsan kivitelezett, a legmodernebb technikákat felvonultató közlemény jelent meg [58–62]. Ezek részletes ismertetése nem célja ennek a közlésnek, de megemlítjük, hogy TRPV1 knock-out egereket felhasználva jellemezték a receptor működéséhez kötött funkciókat [58] és kryoelektronmikroszkópos vizsgálatokban feltárták a TRPV1 receptor strukturális szerveződését [63, 64].

Később bebizonyosodott, hogy további, a VR1-hez hasonló, részben hőérzékeny TRP-csatornák is jelen vannak emlős sejtekben; ezeket a TRP csatornák vanilloid családjához sorolták, utalva a capsaicinre és más VR1 agonistákra jellemző vanilloid csoport jelenlétére [65].

Ardem Patapoutian és munkatársai felfedezésében, a piezo receptorok azonosításában is fontos szerepe volt a funkcionális klónozási technikáknak; ebben az esetben azonban már modernebb eljárásokat is használtak [56, 66]. Részben ennek is köszönhető a piezo csatornák sikeres azonosítása, ugyanis ezeket a csatornákat olyan nagy fehérjék alkotják, amelyek kódoló mRNS-ei extrém nagy méretük miatt gyakorlatilag alkalmatlanok a klasszikus cDNS könyvtár stratégia felhasználásával történő expressziós klónozásra [56]. A differenciális klónozás technika segítségével azonban RNS-microarray chipek felhasználásával és bioinformatikai módszerekkel azonosítottak olyan géneket, amelyek mechanoszenzitív emlős sejt vonalakban (végül a Neuro2A egér neuroblasztoma sejt vonalat használták) jelen vannak, de nem expresszálódnak mechanoszenzitív sejt vonalakban. A potenciálisan mechanoszenzitív fehérjéket kódoló szekvenciákat RNS chip technikával azonosították; olyan géneket kerestek, amelyek legalább 2 transzmembrán domént kódolnak, illetve ismert kation csatornákat, vagy még ismeretlen funkcióval rendelkeznek. Az így azonosított teljes génszekvenciák szelektív csendesítését a Neuro2A sejt vonalba történő specifikus siRNS transzfektálásával végezték. Ezt követően tesztelték a transzfektált sejtek mechanikai érzékenységét. Számos (72) potenciális mRNS tesztelését követően végül igazolódott, hogy a Fam38A szekvenciaként ismert gén csendesítésével szelektíven gátolható volt a mechanoszenzitív sejtek válaszkészsége; ezzel igazolódott, hogy a piezo1-nek nevezett fehérje

önmagában elegendő a sejtek mechanoszenzitivitásának biztosításához. Kimutatták továbbá, hogy a strukturális analóg Fam38B fehérje szintén mechanoszenzitív ioncsatornaként funkcionál, ezért ezt a csatornát piezo2-nek nevezték el. A későbbi vizsgálatok igazolták, hogy ez az utóbbi típus az, amely expresszáldódik az emlős szenzoros neuronok egy jól meghatározott populációjában (a neuronok ~20%-a egér hátsógyöki ganglionjaiban), továbbá a Merkel sejtekben is [67], és szerepe van a szomatoszenzoros rendszer mechanoszenzitív funkcióinak biztosításában. Mind a kiindulási sejtvonalak, mind a transzfektált sejtek vizsgálatában kulcsszerepe volt azoknak a technikai fejlesztéseknek, amelyek lehetővé tették, hogy a celluláris elektrofiziológiai vizsgálat során a sejtek membránját kontrollált módon deformálják egy piezoelektromos ingerlővel [66].

Maguk a piezo csatornák nagyon egyedi molekulaszervezettel rendelkeznek. A vizsgálatok szerint a piezo alegységek kb. 2500 aminosavból állnak, egy alegység 38 transzmembrán hélixet tartalmaz. Az alegységek a sejtmembránban jellegzetes homotrimér komplexumot alkotnak, propeller-szerű megjelenéssel [68]. Nyugalmi körülmények között a propeller „lemezei” görbült alakot vesznek fel, és a fehérje környezetében a sejtmembrán bemélyed („nanobowl”). A membrán mechanikai deformálása fokozza a membrán síkjában a feszülést, a karok kiegyenesednek és a konformáció változás valószínűleg szükséges a csatorna pórusának nyitásához. Bár a molekuláris folyamatok még nem tisztázottak minden részleteikben, a csatorna sajátos szerkezete és a sejtmembrán nagy területét lefedő kiterjedése nyilvánvalóvá teszi a fehérje sejt szintű mechano-transzdukcióban betöltött szerepét [69].

A klónozott capsaicin receptor fehérje funkcionális elektrofiziológiai vizsgálata számos szempontból igazolta azokat a várakozásokat és feltételezéseket, amelyek a capsaicin-érzékeny elsődleges érző neuronok korábbi funkcionális (elektrofiziológiai) vizsgálataiból származó kísérletes eredmények már valószínűsítették [57, 70, 71]. A VR1 receptort heterológ expressziós rendszerben (*Xenopus laevis* oocyta) expresszáltatva, a teljes sejt (whole cell) feszültségzár technikát alkalmazva kimutatták, hogy negatív nyugalmi membránpotenciálon mérve mind a capsaicin, mind a capsaicin analóg resiniferatoxin (RTX) dózis függő befelé irányuló transzmembrán áramokat indukál. A korábbi, szenzoros neuronokon végzett megfigyelésekhez hasonlóan a capsaicin  $EC_{50}$  koncentrációja ~700 nM-nak adódott, az RTX, mint ultrapotens agonista kb. 20x alacsonyabb koncentrációban váltott ki hasonló aktivációt.

Igazolódott továbbá, hogy ezeket az ionáramokat mind a kompetitív antagonistá capsazepine, mind a nem kompetitív antagonistá ruténium vörös kivédi. Érdekes megfigyelés, hogy az *in vitro* expresszálatott VR1 receptor a szubjektív pszichofiziológiai mérések alapján csípősségi sorrendbe (Scoville skála) állított paprikafajtákból készített alkoholos extraktumokkal stimulálva nagyon jó egyezéssel arányosságot mutatott a kiváltott ionáram amplitúdója és a szubjektíven megfigyelt „csípősség” tekintetében. Igazolták továbbá, hogy a VR1 cDNS HEK293 sejtekbe történő transzfekcióját követően a transzfektált sejtekben csak a capsaicin okozott aktiválódást (kalcium akkumulációt), de a sejtek érzéketlennek bizonyultak számos ismert, a nociceptorok aktivációját kiváltó kémiai algogénnel szemben, mint pl. az adenozin-trifoszfát, hisztamin, szerotonin, acetilkolin, glutaminsav, bradykinin, P-anyag (substance-P) és a hiperozmoláris sóoldat [52, 59].

Az emlős sejtvonalon végzett teljes sejt feszültségzár vizsgálatok igazolták továbbá, hogy míg ionos kalcium jelenlétében az ismételt capsaicin adminisztráció során a capsaicinnel kiváltott ionáram amplitúdójának gyors csökkenése, a receptor deszenzitizációja figyelhető meg, kalcium mentes közegben az ismételt capsaicin adást követően hasonló deszenzitizációs tendenciát nem figyeltek meg. A capsaicinnel kiváltott ionáram feszültség függésének vizsgálata egyrészt igazolta az áram kifelé mutatott rektifikációját, és 0 mV közeli fordulási potenciálját, ami a klónozott VR1 csatorna nem szelektív kation permeabilitására utalt. Az ion-helyettesítéses vizsgálatokban megállapították, hogy a csatorna nagyon magas relatív permeabilitással rendelkezik a kalcium ionok tekintetében, de permeabilis magnézium, nátrium, kálium és cézium ionokra is. A magas kalcium permeabilitás összemérhető az NMDA glutamát és a nikotinergerg  $\alpha 7$  acetilkolin receptoroknál megfigyelt értékekkel. A capsaicinnel kiváltott membrán áram ezen tulajdonságai összhangban vannak az izolált hátsógyöki ganglionsejteken végzett korábbi elektrofiziológiai vizsgálatok eredményeivel [57, 70–72].

A VR1 transzfektált HEK293 sejtek sejtmembránjából izolált membrán „foltokon” végzett egy-csatorna (single channel) mérések igazolták, hogy a capsaicin applikáció egységes amplitúdójú ionáramokat aktivált, ami igazolta, hogy a capsaicin receptor egy olyan ioncsatorna, amely capsaicin hatására szolubilis citoplazmatikus faktoroktól függetlenül képes aktiválódni. Az egy-csatorna mérések igazolták továbbá, hogy ezek a csatorna áramok fő jellemzőiket tekintve (rektifikáció, fordulási potenciál) megegyeznek a teljes sejt mérésekkel

szerzett adatokkal, illetve a korábban a natív szenzoros neuronokon végzett mérések eredményeivel. A capsaicin mind az izolált membrán külső (outside-out) mind a belső felszínére (inside-out) applikálva aktiválta a csatornát, ami nem zárja ki a capsaicin feltételezett kötőhelyét a csatorna intracelluláris felszínén, tekintettel a molekula hidrofób jellegéből következő nagyfokú lipid (membrán) permeabilitására.

A VR1 transzfektált HEK293 sejteken igazolták, hogy magas, 3  $\mu\text{M}$  capsaicinnal történő több órás inkubálás során a sejtek nekrotikus jellegű károsodása és elhalása detektálható, amely valószínűleg a kalcium nagymértékű beáramlásnak és intracelluláris akkumulációjának tulajdonítható. Ez összhangban van a korábbi eredményekkel, miszerint *in vivo* a capsaicinnal kiváltott érző neuron degeneráció során, hisztokémiailag és  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  autoradiográfiával nagyfokú intracelluláris kalcium akkumuláció mutatható ki a capsaicin-szenzitív érző ganglionsejtekben [30, 31]. Megjegyzendő, hogy az *in vitro* rendszerekben a VR1 ioncsatorna expressziója sokszorososa lehet a fiziológias körülmények között a szenzoros neuronok által expresszált csatornafehérje mennyiségének, így a receptor capsaicinnal kiváltott aktivációjával kiváltott kalcium ionáram és akkumuláció felülmúlhatja a hasonló körülmények között a natív sejtekben mért változások mértékét.

Northern blot és *in situ* hybridizációs technikával igazolták, hogy a VR1 receptort kódoló mRNS kimutatható egér hátsógyöki és trigeminus ganglionsejtek egy nagyobb populációjában. A korábbi vizsgálatokat megerősítve az mRNS szignál elsősorban a kis és közepes, feltehetően nociceptív neuronokban volt detektálható. Nem mutattak ki mRNS szignált a gerincvelő hátsó szarvában, ami arra utal, hogy a korábbi kísérletekben megfigyelt RTX kötés [54], és axon terminális degeneráció [29, 32, 73] ezen a területen az ide projiciáló capsaicin-érzékeny idegvégződéseken preszinaptikusan lokalizálódó VR1 receptorokkal hozható összefüggésbe.

A capsaicin érzékeny neuronokban korábbi vizsgálatok is kimutattak fájdalmas hőingerekkel aktiválható ionáramokat. A VR1 transzfektált HEK293 sejteket rövid idejű hőingerekkel (max. 45 °C) stimulálva jelentős kalcium akkumuláció volt megfigyelhető a sejtekben. A sejtek a rövid hőingerlést követően megőrizték életképességüket és a későbbi capsaicin ingerléssel szembeni érzékenységüket, igazolva, hogy a hőingerlés VR1 függő specifikus válaszreakciót váltott ki, nem pedig a sejtmembrán dezintegrációját, vagy a sejtek

közvetlen károsodását. A feszültségzár kísérletek igazolták, hogy a rövid hőingerek a capsaicin aktivációhoz hasonló amplitúdójú, befelé rektifikáló és ismételt hő stimulációra deszenzitizáló, nem szelektív kation beáramlást váltanak ki, ami a VR1 csatorna közvetlen hőaktivációjával magyarázható. Ezekből a megfigyelésekből arra következtettek, hogy a VR1 csatorna hő-érzékeny transzducer molekulának tekinthető. A VR1 expresszió nem emlős sejt környezetben (VR1 transzfektált *Xenopus oocyta*) is hasonló, hőaktivált áramokat indukált, amelyeket a capsaicin nem kompetitív gátlószere, a ruténium vörös alkalmazása a capsaicin válaszhoz hasonló mértékben gátolt. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azokkal a korábbi feltételezésekkel, hogy a capsaicin receptora a fájdalmas hőingerek lehetséges molekuláris transzducere, ugyanakkor a capsaicin receptor nem esszenciális a nem-fájdalmas hőingerek érzékeléséhez. Ma már ismert, hogy a capsaicin receptor más TRP csatornákkal heteromer fehérjekomplexeket is képezhet, és együttesen felelősek a hőérzékelés szignalizációjáért [74, 75].

A gyulladásszerű és iszkémiás szöveti reakciók az intersticium helyi savasodásához vezetnek, és szubjektív tünetként fájdalommal is járnak. Korábbi vizsgálatok már felvetették, hogy a proton koncentráció szöveti emelkedése a feltételezett capsaicin (vanilloid) receptor aktiválódásához vagy funkciójának módosulásához vezet. Mivel a VR1 *Xenopus laevis* oocytákban történő expresszióját követően a vizsgált sejtek csak kb. 10%-ban mutattak ki pH függő aktivációt (pH 7,6-5,5), arra következtettek, hogy a proton nem közvetlen aktivátora a VR1 csatornának. Szubmaximális (300 nM) capsaicinnal kiváltott ionáram amplitúdóját azonban a savas pH (pH 6,3) reverzibilis módon a többszörösére fokozta, igazolva, hogy a protonok jelenléte jelentős mértékben fokozza a capsaicin választ és befolyásolja a receptor aktivációt [52].

A legfontosabb megállapításokat a következőkben foglalhatjuk össze:

- 1) Igazolták, hogy a VR1/capsaicin (később TRPV1-nek elnevezett) receptor a capsaicin (és egyéb vanilloidok) membrán receptora, amely egy nem szelektív kation csatorna;
- 2) A VR1 szerkezeti hasonlóságot mutat a TRP csatornákkal, és ezekhez hasonlóan nagyfokú kalcium permeabilitással rendelkezik;
- 3) A vanilloid természetű kémiai aktivátorokon kívül a csatorna hő érzékeny a fájdalmat keltő meleg hőmérséklet-tartományban (> 43°C);



4) Feltételezhető egyéb, nem kalcium függő és capsaicin-inszenzitív termoszenzitív mechanizmusok/ioncsatornák létezése, és nem igazolt, csak valószínű, hogy a hőmérséklet érzékenység a VR1 csatorna intrinszik fizikai tulajdonságaiból származik;

5) Bár a kísérletek nem igazolták egyértelműen a VR1 protonokkal történő aktivációját, a capsaicinnel kiváltott aktivációt a savi pH reverzibilisen potenciározta (előzetes eredmények szerint a hő stimulusra adott választ is). A VR1 aktiváció szerepet játszhat a gyulladáshoz hiperalgézia kialakulásáért (ezt azóta többszörösen igazolták).

6) A VR1 receptor aktiválódása a VR1 receptort kifejező sejtekre direkt citotoxikus hatást fejt ki.

7) A VR1 receptor új típusú fájdalomcsillapító vegyületek célpontja lehet.

A capsaicin receptor molekuláris természetének tisztázása korszakos felfedezés nemcsak a hő- és fájdalomérzés molekuláris mechanizmusainak megismerése, hanem új típusú, közvetlenül a nociceptív érző neuronokon ható fájdalomcsillapító szerek kifejlesztésének lehetősége szempontjából is. Ilyen új típusú „nociceptor analgéziát” [76] TRPV1 agonisták és antagonisták egyaránt előidézhetnek [77, 78]; utóbbiak fejlesztésére több nagy gyógyszergyár is ambiciózus projekteket indított. Egyelőre azonban, elsősorban a TRPV1 antagonisták hypertermiás hatása miatt ezek a vegyületek a humán medicinában nem alkalmazhatók [79–81]. Újabban azonban biztató eredményekről számoltak be hasonló mellékhatásokkal nem rendelkező TRPV1 antagonisták fejlesztéséről [82, 83]. Az új típusú fájdalomcsillapító vegyületek iránti érdeklődés fölöttébb indokolt. A modern farmakológiai tankönyvek vonatkozó fejezetei nem sok újdonsággal szolgálnak: az elmúlt ötven évben kevés új szer került bevezetésre a klinikai gyakorlatba: a gold standard még mindig a morphin és származékai; jól illusztrálja ezt William Osler kiemelkedő kanadai orvos, a Johns Hopkins Medical School egyik alapító atyja nem éppen újkeletű, de máig érvényes megállapítása: „Morphine is, as expected of God’s own medicine, very hard to beat”. Rendelkezésre állnak még a nem-steroid gyulladásgátlók (NSAID), az antidepresszánsok és antiepilepticumok [84]. Közismert, hogy ezen vegyületek közül egy sem tekinthető ideális fájdalomcsillapítónak. Az utóbbi két évtizedben megismert, specifikusan a fájdalomérző elsődleges érző neuronokban kifejeződő ioncsatornák

befolyásolása lehetőségeket rejt új típusú fájdalomcsillapító vegyületek kifejlesztésére. Eddig azonban ezek az erőfeszítések nem hoztak látványos sikereket. A TRPV1 receptor működését befolyásoló készítmények közül egy capsaicint magas koncentrációban tartalmazó tapasz került bevezetésre a klinikai gyakorlatban. És ez sem nevezhető igazán újdonságnak. Nem lehet kétséges azonban, hogy a fájdalomérzés molekuláris alapjainak megismerése a nem túl távoli jövőben elvezethet új típusú analgetikumok kifejlesztéséhez.

Az idei Nobel-díjjal kapcsolatban a capsaicin, mint kísérleti eszköz jelentőségét nem lehet túlhangsúlyozni. A capsaicin szelektív szenzoros izgató, deszenzibilizáló és neurotoxikus hatásának felismerése alapvetően járult hozzá a capsaicin receptor molekuláris azonosításához. Szegedi eredményeink elismerését jelzi, hogy a Nobel honlapon a David Julius munkáját méltató cikkben (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/advanced-information/>) hivatkoznak 1977-es *Nature* cikkünkre. A magyar kutatók eredményeit méltatva David Julius Kavli-díjjal történő kitüntetése alkalmával pedig a következőképpen nyilatkozott: „Jancsó and his team in Hungary had famously shown that capsaicin, the pungent principle in chili peppers, was an excitatory agent for a subset of somatosensory neurons, making capsaicin sensitivity a defining functional hallmark of nociceptors. Thus, identifying a mythical capsaicin receptor became something of a Holy Grail in the pain field, but also a frustratingly elusive goal” [85]. David Julius Nobel Előadásában is kiemelte a szegedi kutatók eredeti megfigyeléseinek jelentőségét, amit a Jancsó házaspárról készített fényképpel, Pórszász János és ifj. Jancsó Miklós publikációjával [13], valamint *Nature* cikkünk [29] bemutatásával is illusztrált [<https://www.youtube.com/watch?v=4TkmSJnhcFo>].

A kutatómunkában a megfelelő kísérleti modell vagy farmakon megtalálása az eredeti megfigyelések *sine qua non*-ja. Otto Loewi, grazi farmakológus professzor, aki a kémiai ingerületátvitel egyértelmű kísérletes bizonyításáért kapott Nobel-díjat, azt tartotta, hogy a farmakonok kísérleti alkalmazásának igazi jelentősége az, hogy segítségükkel élettani jelenségek mechanizmusait tárhatjuk fel [86]. A capsaicin alkalmazása erre kitűnő iskolapélda. A megfelelő modell jelentőségét fényesen példázta a tintahal óriás axonjának alkalmazása az akciós potenciál ionális mechanizmusának feltárásában. Az ismert anekdota szerint egy kongresszusi vacsorán, ahol Alan Hodgkin – aki Andrew Huxley-vel együtt kapott ezekért a felismerésekért Nobel-díjat – is jelen volt, egy kitűnő neurofiziológus köszöntő beszédében azt találta mondani, hogy a Nobel-díjat

valójában a tintahalnak kellett volna kapnia („It’s the squid that really ought to be given the Nobel Prize”, [87]). Hasonlóképpen nem járunk messze az igazságtól, ha kijelentjük, hogy az idei Nobel-díjat a capsaicinnek kellett volna ítélni.

### Köszönetnyilvánítás

A közlemény elkészítésének feltételeit a Szent-Györgyi Albert Kari Oktatási Támogatás és az OTKA 138568K pályázat biztosította.

### Irodalomjegyzék

- [1] Descartes, R. (1664) L’home., Chez Charles Angot, Paris.
- [2] Cohnheim, J.F. (1866) Über die Endigung der sensiblen Nerven in der Hornhaut. *Virchow’s Arch Patho. Anat Physiol Klin Med*, **38**: 343386.
- [3] Müller, J. (1826) Zur vergleichenden Physiologie des Gesichtssinns., Hölscher, Koblenz.
- [4] Adrian, E.D. (1931) The messages in sensory nerve fibres and their interpretation. *Proc R Soc*, **109**: 1–23.
- [5] Sherrington, C.S. (1906) The Integrative Action of the Nervous System. Scribner, New York.
- [6] Jancsó, G. (1994) Histamine, capsaicin and neurogenic inflammation. A historical note on the contribution of Miklós (Nicholas) Jancsó (1903-1966) to sensory pharmacology. In: *Advences in Psychoneuroimmunology*. (Bérczi, I., Szelényi, J. Eds.), (Plenum Press, New York) pp. 17–23.
- [7] Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. (1949) Érzőidegvégződés deszenzibilizálása. *Kísérl Orvostud* **2**: 15.
- [8] Jancsó N. (1960) Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull Millard Fill Hosp*, **7**: 53–77.
- [9] Jancsó N. (1966) Desenzitisation with capsaicin as a tool for studying the function of pain receptors. In: *Pharmacology of Pain. Proceedings of the 3rd International Pharmacological Meeting*. (Press, P., Ed.), (Oxford) pp. 33–55.
- [10] Jancsó, N. (1955) Speicherung. Stoffanreicherung im Retikuloendothel und in der Niere. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [11] Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. (1959) Dauerausschaltung der chemischen Schmerzempfindlichkeit durch Capsaicin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Für Exp Pathol Und Pharmakologie*, **236**: 142–145.
- [12] Jancsó, G., Sántha, P. (2015) The foundation of sensory pharmacology: Nicholas (Miklós) Jancsó and the Szeged contribution. *Temperature*,

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23328940.2015.1045683>

- [13] Pórszász, J., Jancsó, N. (1959) Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, **16**: 299–306.
- [14] Joó, F., Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A. (1969) Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin. *Life Sci*, **8**: 621–626.
- [15] Jancsó, N. (1960) Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull Millard Fill Hosp*, **7**: 53–77.
- [16] Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., Jancsó, N. (1970) Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *J Physiol*, **206**: 495–507.
- [17] Hajós, M., Jancsó, G., Mari, Z., Obál, F., Obál, F. Jr. (1991) Ruthenium Red Inhibits Tail Skin Vasodilatation Evoked by Intracerebroventricular Injection of Capsaicin in the Rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **343**: 431–433.
- [18] Hajós, M., Obál, F., Jancsó, G., Obál, F. (1983) The Capsaicin Sensitivity of the Preoptic Region Is Preserved in Adult-Rats Pretreated As Neonates, But Lost in Rats Pretreated As Adults. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **324**: 219–222.
- [19] Obál, F., Jancsó, G., Jancsó-Gábor, A., Obál, F. (1983) Vasodilatation on Preoptic Heating in Capsaicin-Treated Rats. *Experientia*, **39**: 221–223.
- [20] Obál, F., Bari, F., Benedek, G., Obál, F. (1982) Elevation of thermoregulatory vasodilatation threshold in the rat after capsaicin treatment. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, **59**: 203–207.
- [21] Szolcsányi, J. (1977) A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol (Paris)*, **73**: 251–259.
- [22] Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A. (1975) Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain producing potency of pungent agents. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res*, **25**: 1877–1881.
- [23] Barthó, L., Szolcsányi, J. (1978) The site of action of capsaicin on the guinea-pig isolated ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **305**: 75–81.
- [24] Szolcsányi, J., Barthó, L. (1982) Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci Lett*, **34**: 247–251.

- [25] Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Z., Pethő, G. (2011) Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutical implications. *Curr Top Med Chem*, **11**: 2253–2263.
- [26] Beckers, A.B., Weerts, Z.Z.R.M., Helyes, Z., Masclee, A.A.M., Keszthelyi, D. (2017) Review article: transient receptor potential channels as possible therapeutic targets in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, **46**: 938–952.
- [27] Borbély, É., Botz, B., Bölcskei, K., Kenyér, T., Kereskai, L., Kiss, T., Szolcsányi, J., Pintér, E., Csepregi, J.Z., Mócsai, A., Helyes, Z. (2015) Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun*, **45**: 50–59.
- [28] Helyes, Z., Thán, M., Oroszi, G., Pintér, E., Németh, J., Kéri, G., Szolcsányi, J. (2000) Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci Lett*, **278**: 185–188.
- [29] Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A. (1977) Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, **270**: 741–743.
- [30] Jancsó, G., Sávoy, G., Király, E. (1978) Appearance of histochemically detectable ionic calcium in degenerating primary sensory neurons. *Acta Histochem*, **62**: 165–169.
- [31] Jancsó, G., Karcsú, S., Király, E., Szebeni, A., Tóth, L., Bácsy, E., Joó, F., Párducz, Á. (1984) Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res*, **295**: 211–216.
- [32] Jancsó, G., Király, E. (1980) Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, **190**: 781–792.
- [33] Jancsó, G., Király, E. (1981) Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Res*, **210**: 83–89.
- [34] Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A. (1980) Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **313**: 91–94
- [35] Jancsó, G., Lynn, B. (1987) Possible use of capsaicin in pain therapy. *Clin J Pain*, **3**: 123–126.
- [36] Jancsó, G., Oszlács, O., Sántha, P. (2011) The capsaicin paradox: Pain relief by an algescic agent. *Anti-Inflamm Anti-Allergy Agents Med Chem*, **10**: 52–65

- [37] Jancsó, G., Such, G. (1983) Effects of Capsaicin Applied Perineurally to the Vagus Nerve on Cardiovascular and Respiratory Functions in the Cat *J Physiol*, **341**: 359–370.
- [38] Dux, M., Jancsó, G. (1994) A New Technique for the Direct Demonstration of Overlapping Cutaneous Innervation Territories of Peptidergic C-Fiber Afferents of Rat Hindlimb Nerves. *J Neurosci Methods*, **55**: 47–52.
- [39] Jancsó, G., Such, G., Rödel, C. (1987) A new approach to selective regional analgesia. In: Trends Cluster Headache. (Sicuteri, F., Vecchiet, L., Fanciullacci, M., Eds.), (Excerpta Medica, Amsterdam, New York) pp. 59-68.
- [40] Gamse, R., Petsche, U., Lembeck, F., Jancsó, G. (1982) Capsaicin Applied to Peripheral-Nerve Inhibits Axoplasmic-Transport of Substance-P and Somatostatin. *Brain Res*, **239**: 447–462.
- [41] Gamse, R., Holzer, P., Lembeck, F. (1980) Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol*, **68**: 207–213.
- [42] Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., MacIntyre, I. (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, **313**: 54-56
- [43] Jancsó, G. (2009) Neurogenic Inflammation in Health and Disease. Elsevier, Amsterdam.
- [44] Lynn, B., Schütterle, S., Pierau, F.K. (1996) The vasodilator component of neurogenic inflammation is caused by a special subclass of heat-sensitive nociceptors in the skin of the pig. *J Physiol*, **494**: 587-593.
- [45] Jancsó, G., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Király, E., Halász, N., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Elde, R., Said, S., Brown, M. (1981) Immunohistochemical Studies on the Effect of Capsaicin on Spinal and Medullary Peptide and Monoamine Neurons Using Antisera to Substance-P, Gastrin-Cck, Somatostatin, Vip, Enkephalin, Neurotensin and 5-Hydroxytryptamine. *J Neurocytol*, **10**: 963–980.
- [46] Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. (1985) Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptides*, **6**: 747–754.
- [47] Dux, M., Sántha, P., Jancsó, G. (2012) The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, **464**: 239-248.
- [48] Dux, M., Sántha, P., Jancsó, G. (2003) Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *J Physiol*, **552**: 859-867.

- [49] Ong, J.J.Y., Wei, D.Y.T., Goadsby, P.J. (2018) Recent Advances in Pharmacotherapy for Migraine Prevention: From Pathophysiology to New Drugs. *Drugs*, **78**: 411–437.
- [50] Hargreaves, R., Olesen, J. (2019) Calcitonin Gene-Related Peptide Modulators - The History and Renaissance of a New Migraine Drug Class. *Headache*, **59**: 951–970.
- [51] Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., Kanje, M., Edvinsson, L. (2002) Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett*, **81**: 135–139.
- [52] Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**: 816–824.
- [53] Szállási, A., Blumberg, P.M. (1989) Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, **30**: 515–520.
- [54] Szállási, Á., Blumberg, P.M. (1990) Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res*, **524**: 106–111.
- [55] Bautista, D.M. (2015) Spicy science: David Julius and the discovery of temperature-sensitive TRP channels. *Temperature*, **2**: 135–141.
- [56] Akopian, A.N. (2013) Approaches to cloning of pain-related ion channel genes. *Methods Mol Biol*, **998**: 3–19.
- [57] Wood, J.N., Winter, J., James, I.F., Rang, H.P., Yeats, J., Bevan, S. (1988) Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci*, **8**: 3208–3220.
- [58] Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**: 306–313.
- [59] Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, E.B., Basbaum, A.I., Julius, D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **21**: 531–543.
- [60] Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.E., Julius, D. (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, **448**: 204–211.
- [61] Mckemy, D.D., Neuhauser, W.M., Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.

- Nature*, **416**: 52–58.
- [62] Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**: 436–441.
- [63] Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, **504**: 107.
- [64] Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., Julius, D. (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal mechanisms of activation. *Nature*, **504**: 113.
- [65] Vay, L., Gu, C., McNaughton, P.A. (2012) The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol*, **165**: 787.
- [66] Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., Patapoutian, A. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, **330**: 55–60.
- [67] Woo, S.H., Ranade, S., Weyer, A.D., Dubin, A.E., Baba, Y., Qiu, Z., Petrus, M., Miyamoto, T., Reddy, K., Lumpkin, E.A., Stucky, C.L., Patapoutian, A. (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*, **509**: 622–626.
- [68] Saotome, K., Murthy, S.E., Kefauver, J.M., Whitwam, T., Patapoutian, A., Ward, A.B. (2017) Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature*, **554**: 481–486.
- [69] Kefauver, J.M., Ward, A.B., Patapoutian, A. (2020) Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature*, **587**: 567–576.
- [70] Cesare, P., Mcnaughton, P. (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 15435–15439.
- [71] Reichling, D.B., Levine, J.D. (1997) Heat transduction in rat sensory neurons by calcium-dependent activation of a cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 7006–7011.
- [72] Nagy, I., Rang, H.P. (1999) Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J Neurosci*, **19**: 10647–10655.
- [73] Jancsó, G., Lawson, S.N. (1990) Transganglionic Degeneration of Capsaicin-Sensitive C-Fiber Primary Afferent Terminals. *Neuroscience*, **39**: 501–511.
- [74] Vriens, J., Voets, T. (2019) Heat sensing involves a TRiPlet of ion channels. *Br J Pharmacol*, **176**: 3893–3898.



- [75] Vandewauw, I., De Clercq, K., Mulier, M., Held, K., Pinto, S., Van Ranst, N., Segal, A., Voet, T., Vennekens, R., Zimmermann, K., Vriens, J., Voets, T. (2018) A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*, **555**: 662–666.
- [76] Oszlács, O., Jancsó, G., Kis, G., Dux, M., Sántha, P. (2015) Perineural capsaicin induces the uptake and transganglionic transport of cholera toxin b subunit by nociceptive c-fiber primary afferent neurons. *Neuroscience*, **311**: 243–245.
- [77] Holzer, P. (2008) The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br J Pharmacol*, **155**: 1145–1162.
- [78] Jancsó, G., Dux, M., Oszlács, O., Sántha, P. (2008) Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. *Br J Pharmacol*, **155**: 1139–1141.
- [79] Kym, P.R., Kort, M.E., Hutchins, C.W. (2009) Analgesic potential of TRPV1 antagonists. *Biochem Pharmacol*, **78**: 211–216.
- [80] Gavva, N.R., Treanor, J.J.S., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, L., Bak, A., Darling, M, Gore, A., Jang, G.R., Kessler, J.P., Ni, L., Norman, M.H., Palluconi, G., Rose, G.J., Salfi, M., Tan, E., Romanovsky, A.A., Banfield, C., Davar, G. (2008) Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*, **136**: 202–210.
- [81] Garami, A., Shimansky, Y.P., Rumbus, Z., Vizin, R.C.L, Farkas, N., Hegyi, J., Szakacs, Z., Solymár, M, Csenkey, A., Chiche, D.A., Kapil, R., Kyle, D.J., Van Horn, W.D., Hegyi, P., Romanovsky, A.A. (2020) Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol Ther*, **208**: 214–221.
- [82] Gontsyan, A., McDonald, H.A., Schmidt, R.G., Daanen, J.F., Voight, E.A., Segreti, J.A., Puttfarcken, P.S., Reilly, R.M., Kort, M.E., Dart, M.J., Kym, P.R. (2015) TRPV1 ligands with hyperthermic, hypothermic and no temperature effects in rats. *Temperature*, **2**: 297–301.
- [83] Koivisto, A.P., Belvisi, M.G., Gaudet, R., Szállási, Á. (2021) Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov*, doi: 10.1038/s41573-021-00268-4. Online ahead of print.
- [84] Ritter, J.M., Rod, F., Henderson, J.G., Loke, Y.K., MacEwan, D., Rang, H.P. (2018) Rang and Dale's Pharmacology. 9<sup>th</sup> edition. Elsevier, New York.

- [85] The Kavli Prize. Autobiography by David Julius. <https://kavliprize.org/prizes-and-laureates/laureates/david-julius>
- [86] Lembeck, F., Giere, W. (1968) Otto Loewi Ein Lebensbild in Dokumenten., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- [87] Wickens, A.P. (2014) A history of the brain: from stone age surgery to modern neuroscience. Psychology Press, Taylor & Francis, Oxford.



**Jancsó Gábor** általános orvosi diplomáját Szegeden szerezte 1972-ben. Munkatársaival elsőként ismerte fel a capsaicin elsődleges érző neuronokra kifejtett szelektív neurotoxikus/neurodegeneratív hatását és morfológiailag identifikálta a fájdalomérzésben alapvető szerepet játszó érző neuronrendszert. Az orvostudomány doktora címet 1995-ben szerezte meg, egyetemi tanárrá 1995-ben nevezték ki (tanszékvezető 2009-2013), 2018-tól professor emeritus. Közlemények (in extenso) száma: 149, összesített impakt faktor: > 300; független hivatkozás: 4725; Hirsch index: 38.



**Sántha Péter** a szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetemen szerzett általános orvosi diplomát 1995-ben. Végzés után az egyetem Élettani Intézetében kezdte PhD ösztöndíjas tanulmányait Prof. Dr. Jancsó Gábor témavezetése mellett. Jelenleg az Szegedi Tudományegyetem Élettani Intézetének docense, a Funkcionális Neuromorfológiai Laboratórium munkatársa. Kutatási területe a perifériás és spinális nociceptív folyamatok tanulmányozása. Érdeklődésének középpontjában a membrán glikoszféngolipidek perifériás idegsérüléseket követő morfológiai jelenségek és szenzoros funkciózavarok mechanizmusában betöltött szerepének kutatása áll.

## FEHÉRJE MÉRETŰ MOLEKULÁK HUMÁN SEJTEKBE JUTTATÁSA LIPID-RAFT MEDIÁLT ENDOCITÓZISSAL

*Hetényi Anasztázia<sup>1</sup>, Imre Norbert<sup>1</sup>, Szabó Enikő<sup>2</sup>, Bodnár Brigitta<sup>1</sup>,  
Szkalisity Abel<sup>3</sup>, Gróf Ilona<sup>4</sup>, Bocsik Alexandra<sup>4</sup>,  
Deli A. Mária<sup>4</sup>, Horváth Péter<sup>3</sup>, Czibula Ágnes<sup>2</sup>, Monostori Éva<sup>2</sup>,  
Martinek A. Tamás<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet, <sup>2</sup>ELKH-SZBK, Genetika Intézet,  
<sup>3</sup>ELKH-SZBK, Biokémiai Intézet, <sup>4</sup>ELKH-SZBK, Biofizikai Intézet

### Összefoglaló

Fehérje-fehérje kölcsönhatások rendkívül fontos szerepet töltenek be, mind a fiziológias, mind a patofiziológias folyamatokban, ezért hatékony befolyásolásuk kulcsfontosságú a gyógyszeripar számára. Szükség van olyan módszerek kidolgozására, amelyek segítségével fehérjeméretű hatóanyagokat juttathatunk el az intracelluláris célpontjaikhoz. Egyes vírusos és bakteriális fehérjék funkcionális formában könnyen internalizálódnak a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózissal, de ennek a folyamatnak a terápiásan releváns koncentrációjú fehérje rakományokkal történő utánzása nagy kihívást jelent. Ebben a munkában a WYKYW pentapeptid szekvenciát vizsgáltuk, amely specifikusan kötődik a gangliozid GM1 glikán részéhez ( $K_D = 24$  nM). A WYKYW úgy segíti elő a fehérjék GM1-függő endocitózisát, hogy a rakományt terhelő kaveoszómák nem fuzionálnak lizoszómákkal. A szerkezetileg sértetlen immunglobulin G komplex (580 kDa) sikeresen bejutott az élő HeLa sejtekbe 20-160 nm közötti extracelluláris koncentráció mellett, és megfigyelhető volt a rakományfehérjék kiszökése a citoszolba. A rövid WYKYW-tag egy előnyös endocitózis útválasztó szekvencia a terápiás makromolekulák lipid raft-mediált sejtbe juttatásához, különösen a GM1-et túlzottan expresszáló rákos sejtek esetében.

### Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés egyik legnagyobb kihívása az emlősök sejtmembránja, mivel olyan gátat jelent, amely többnyire áthatolhatatlan az olyan extracelluláris fehérjék számára, amelyeknek szerepük lehet, mint specifikus, hatásos és biztonságos gyógyszerek [1, 2]. A fehérjeméretű hatóanyagok internalizációja elérhető lipid-raft mediált endocitózissal [3, 4], mely útvonalon gyakran közlekednek endogén fehérjék [5], bakteriális toxinok (kolera és tetanusz) [6], illetve vírusok (egér és poliómavírus [7], valamint echovírus 1 [8]). Ennek a klatrin-független útvonalnak az előnye, hogy az endoszómák csak nagyon hosszú idő után egyesülnek a lizoszómákkal, sok esetben azonban ez el is marad. Ez az endocitotikus folyamat egy fontos célpont

a funkcionális, degradáció mentes fehérjebevitelre, hiszen a képződő „szivárgó” endoszómák lehetőséget biztosítanak a rakomány kiszabadulására. A lipid betüremkedések és kaveolák felszíne gazdagon borított glikoszfinbolipidekkel, főként mono-, di-, és triszialotetrahexozil-gangliozidokkal (GM1, GD1a, GT1b), amelyek a fő receptorai az így bejutó molekuláknak. A gangliozidokhoz való kötődés és a gangliozidok kötegelése olyan endocitotikus folyamatot indít el [9, 10], ahol a lizoszómális lebomlás csekély, ezáltal lehetővé teszik a fehérjéknek, hogy eljussanak a sejtplazmába [11], vagy transzcitózissal más sejtekbe [12, 13]. A jelenleg elérhető sejtbejuttató rendszereknek számos hátrányát ismerjük: a rakomány lizoszómába kerül és lebomlik, esetleg az alkalmazandó koncentráció túl nagy, terápiásan irreleváns. A hátrányokat kiküszöbölhetjük, ha megértjük annak módját, hogy miként váltanak ki a gangliozidok endocitózist [14]. Ennek ismeretében tudjuk empirikusan értelmezni a glikán-kódot, és azt tudatosan alkalmazhatjuk későbbi sejtbejuttató rendszerek tervezésénél [15, 16]. A különböző gangliozid-kötő molekulák azonosítását célzó kutatások már munkánk előtt elkezdődtek, azonban a nagyaffinitású molekuláris felismerés még várat magára. A GM1 gangliozidhoz kötő molekulák különösen érdekesek lehetnek, mert bár számos emlőssejt expresszálja a molekulát, különféle tumorokban feldúsulnak [17, 18]. A fehérje alapú terápiákban az extracelluláris koncentráció tartomány jellemzően 100-500 nM [19], tehát egy nagyaffinitású kötődés szükséges ahhoz, hogy megfelelő sejtmembránban való dúsulást érzünk el, lehetővé téve a hatóanyagok kellő mértékben való beáramlását.

Célul tűztük ki, hogy nanomoláris koncentrációban juttassunk be humán sejtekbe fehérje méretű molekulákat lipid-raft mediált endocitózissal. Kerestünk egy rövid peptidet - egy nem mérgező minimális motívumot -, amely képes specifikusan a makromolekuláris rakományát egy olyan belépési útvonalhoz irányítani, amely utánozza a vírusok és bakteriális toxinok gangliozidok által közvetített internalizációját a fő lipid útvonalon/kaveoláris GM1-en keresztül. Egy szerkezetileg jól definiált receptorra fókuszálva és az interakció alapos biofizikai jellemzésével azt tűztük ki célul, hogy utat nyitunk a szerkezet alapú tervezés felé, ami ritka megközelítés a fehérje célba juttatásnál [20, 21]. Kimutattuk, hogy egy pentapeptid szekvencia (WYKYW) kis nanomoláris affinitással specifikusan köti a GM1 szénhidrát részét. Ennek a rövid endocitózist irányító peptidnek a nagy fehérjékhez való közvetlen kapcsolása elősegítette a makromolekulák lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózist terápiásan releváns nanomoláris koncentrációkban, és így elkerülte az endoszómális csapdázódást és a lizoszómális lebomlást.

## Módszerek

### *Izotermális titráló kalorimetria (ITC)*

A szintetizált peptidekkel, peptid-konjugátumokkal és a megcélzott gangliozidokkal (GM1, aszialo-GM1, GM3) izotermális titráló kalorimetriát végeztünk egy MicroCal VP-ITC kaloriméter segítségével. A gangliozid-dodecilszfokolin 1:5 bicellákat titráltuk a peptidekhez és konjugátumaikhoz (pH 7,2, 35 °C) 15 µM gangliozid koncentrációt alkalmazva.

### *Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás és analízis (FACS)*

A peptidek és peptid-komplexek internalizációját áramlásos citometriával mértük. A sejteket a peptidekkel vagy anélkül 37 °C-on inkubáltuk különböző időtartamokig, majd a sejteket mostuk, és tripszin-EDTA segítségével felszedtük a lemezekről. Sós foszfátpufferben tripánkék és propídium-jodid hozzáadása után mértük a sejteket egy FACSCalibur áramlási citométer segítségével. Az adatokat a FlowJo™ szoftver segítségével értékeltük ki. Az in vitro kompetíciós vizsgálathoz Jurkat sejteket kezeltünk a peptidekkel, miközben a hozzáadott galektin-1 koncentrációkat változtattuk. Az endocitózis inhibitorokkal való kísérletben a HeLa sejteket előinkubáltuk 37 °C-on metil-β-ciklodextrinnel, wortmanninnal vagy klórpromazinnal. A citometriás mérés elvégzése előtt a sejteket 60 percig inkubáltuk a peptid komplexekkel.

### *Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM)*

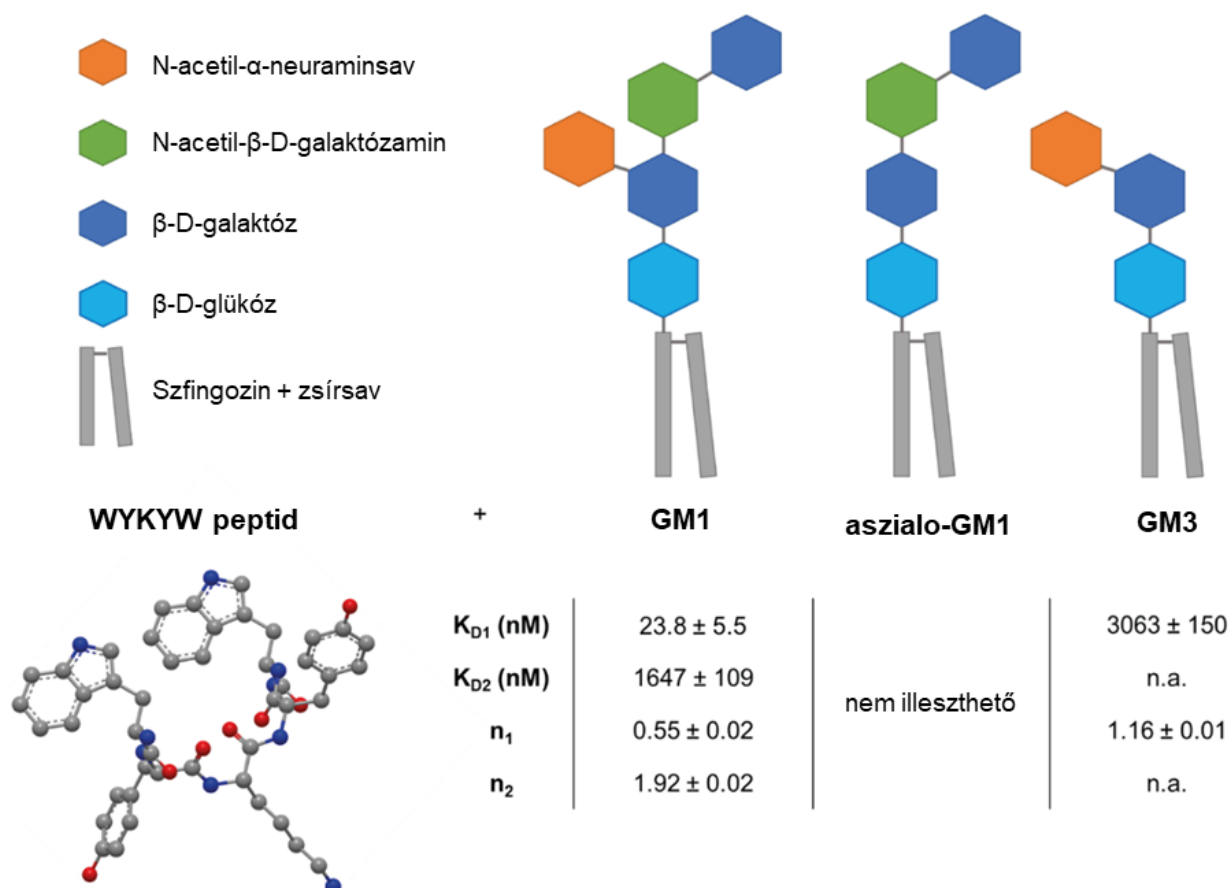
A vizsgált sejteket a tanulmányozott komplexekkel különböző koncentrációk alkalmazása mellett, különböző időhosszakig inkubáltuk 37 °C-on. Ezután a sejteket mostuk, majd Hoechst 33342 sejtmag-festékekkel 30 percig jelöltük. A koleratoxin kolokalizációs kísérletekben a sejteket a komplexek mellett FITC-jelölt koleratoxin B alegységgel is inkubáltuk. Az antitestek szerkezetét célzó kísérletekben a szokásos inkubáció után a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd szaponinnal permeabilizáltuk, végül pedig Atto488-konjugált galektin-1-gyel kezeltük őket 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az IgG komplexek méréséhez a sejtmembránokat FITC-jelölt WGA lektinnel jelenítettük meg. FITC-jelölt NeutrAvidin alkalmazásakor az extracelluláris fluoreszcencia kioltására tripánkéket használtunk. A rakomány lokalizációjának megfigyeléséhez a fluoreszcens festékekkel jelölt molekulákat egy Leica SP5 AOBS konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A Hoechst festéshez a 405 nm-es diódát, a FITC és Atto488 5 jelölésekhez a 488 nm-es argon lézert, az r-fikoeritrinhez és a LysoTrackerRed festékhez az 543 nm-es HeNe lézert, míg az Alexa Fluor 647-konjugátumokhoz a 633 nm-es HeNe lézert használtuk. Az emisszió detektálására

mindig a megfelelő spektrális szűrőt használtuk.

## Eredmények

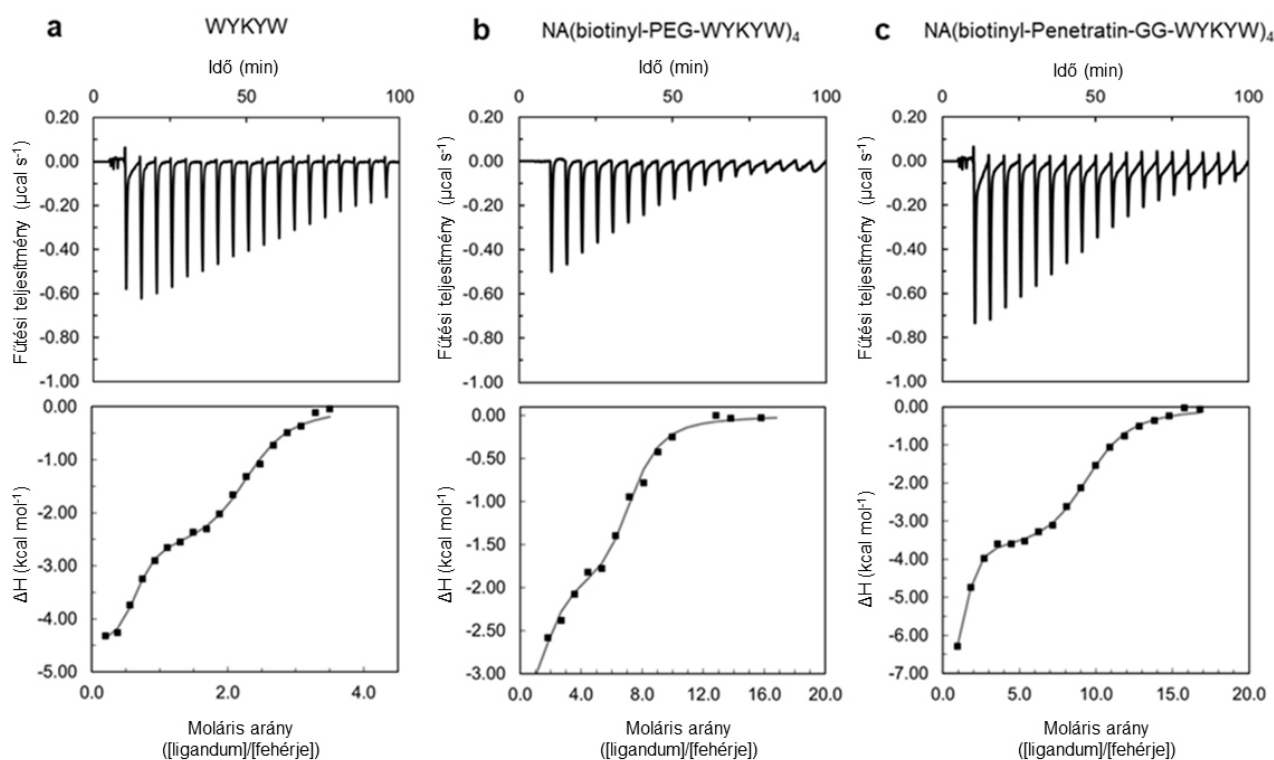
### A WYKYW pentapeptid nagy affinitással és specifitással köti a gangliozid GM1-et

A WYKYW vezérmolekulát (1. ábra) először Gabius és munkatársai [22-24] azonosították a Tyr-Xxx-Tyr-tartalmú pentapeptid család tagjaként, amelyről megfigyelték, hogy szétkapcsolja a galektin-1 - proteoglikán kölcsönhatásokat [24]. Korábbi munkánk során azt találtuk, hogy a proteoglikán-galektin-1 kölcsönhatás gátlásának oka a peptid kompetitív kötődése az aszialofetuin glikán részéhez [25]. Annak ismeretében, hogy a galektin-1 kötődik a GM1 gangliozidhoz [26], feltételeztük, hogy a WYKYW kölcsönhatásba lép a GM1 extracelluláris glikán részével is. A fentiek ismeretében szintetizáltuk a WYKYW peptidet, és izotermális titráló kalorimetriával (ITC) (1. ábra) megmértük az affinitását és vizsgáltuk a specifitását a különböző gangliozidokhoz.



**1. ábra. A kötődés célpontjául választott gangliozid GM1 és származékai, valamint a WYKYW vezérmolekula szerkezete.** A gangliozid-WYKYW kölcsönhatások ITC-vel mért kötési affinitásai ( $K_D$ ) és sztöchiometriái ( $n$ ). A paramétereket a GM1-nél két független kötőhely, a GM3-nál egy kötőhely modelljéhez illesztett nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével kaptuk. Asialo-GM1 esetében az ITC entalpogram nem mutatott illeszkedő jellemzőket. Forrás: [27].

Kétlépcsős kölcsönhatás figyelhető meg a GM1-gyel (2.a ábra), amelyben az első kötési lépcső alacsony nanomoláris affinitást mutatott 1:2-es GM1:WYKYW aránnyal. A második szakasz egy mikromoláris kölcsönhatás volt. A tiszta n-dodecil-foszfolinnal (DPC) végzett kontroll kísérletben nem találtunk kölcsönhatást. A szialilcsoport eltávolításával (aszialo-GM1) nem kaptunk illeszthető eredményeket. A GM3 gangliozid esetén, (hiányzik a terminális  $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc), csak gyenge kölcsönhatás volt megfigyelhető. Az ITC mérések eredményeiből megállapítottuk, hogy a WYKYW csak a GM1-et köti meg alacsony nanomoláris affinitással.



**2. ábra. ITC entalpogramok. a)** WYKYW, **b)** NA(biotinil-PEG-WYKYW)<sub>4</sub> és **c)** NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> esetén. A titrálásokat GM1:DPC 1:5 bicellákkal végeztük, és a nemlineáris legkisebb négyzetek illesztését a két független kötőhely modellhez hajtottuk végre. Forrás: [27].

## A WYKYW-peptid lipid-raft mediált/kaveoláris edocitózissal juttatja be a fehérje rakományt nanomoláris koncentráció mellett

A következő lépésben teszteltük azt a hipotézist, hogy a nagy affinitású WYKYW–GM1 kölcsönhatás endocitózist indukál-e, amikor a hordozó címkét egy fehérjéhez kapcsoljuk. Modellrakományként a FITC-jelölt NeutrAvidint (NA) választottuk; biotinil-PEG-WYKYW konjugátummal jelöltük meg (3. ábra), ahol a PEG 8-amino-3,6-dioxa-oktil-borostyánkősav monomer kapcsolásával kapott trimer linkert jelöl. Az NA négy biotinilezett szekvenciához kötődik, így a NA(biotinil-PEG-WYKYW)<sub>4</sub> tetramer fehérjekonstrukciót eredményez (3.a ábra).

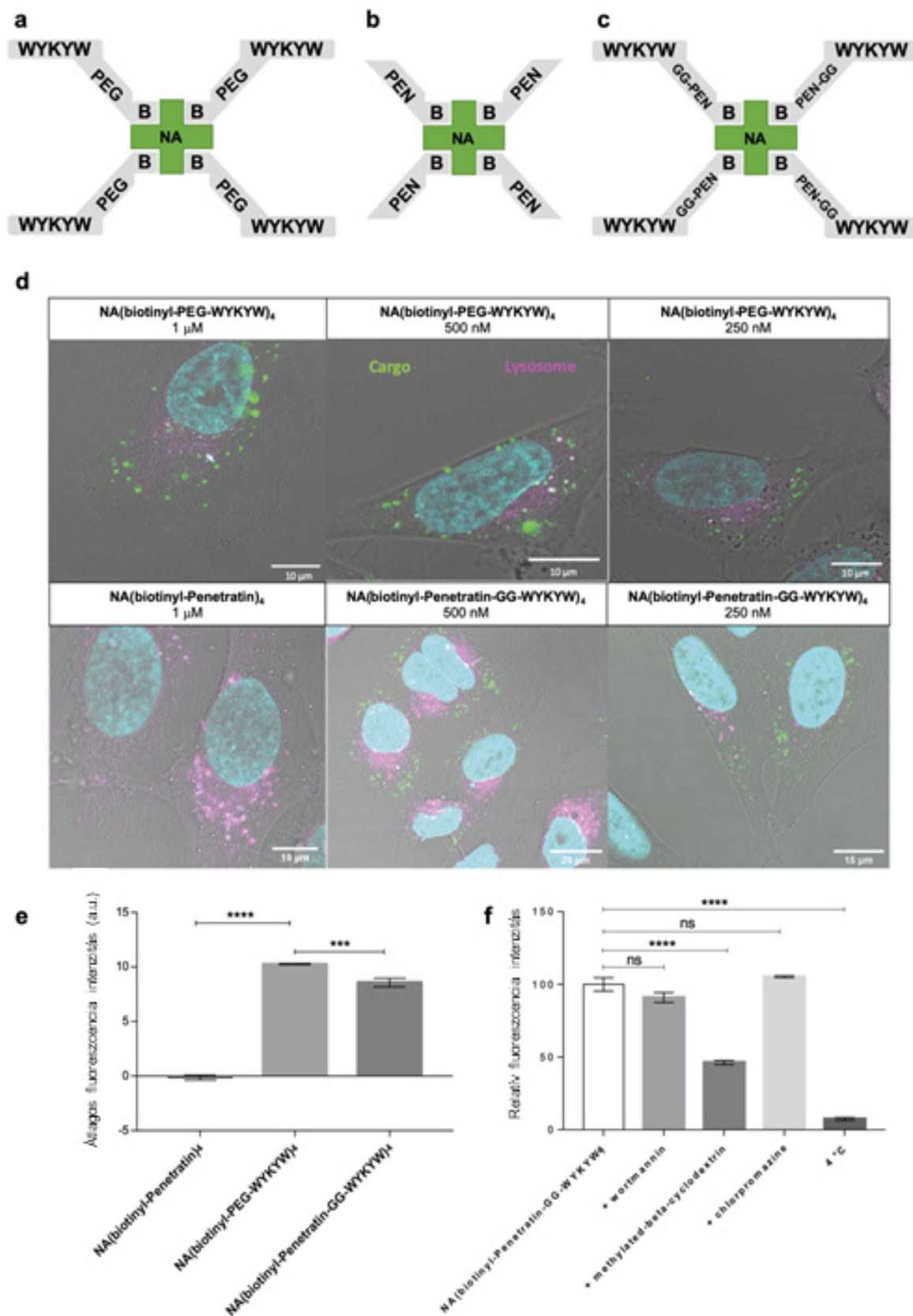
A WYKYW endocitózist-indukáló hatékonyságát egy referencia sejtbehatoló szekvenciához viszonyítva értékeltük, amit a FITC-NA biotinil-Penetrattal történő jelölésével kaptunk: NA(biotinil-Penetratin)<sub>4</sub> (3.b ábra). A WYKYW és a Penetratin additív és szinergikus hatásának mérésére egy biotinil-Penetratin-GG-WYKYW kimérát (NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub>) is használtunk (3.c ábra). Az ITC mérések megerősítették, hogy a NA(biotinil-PEG-WYKYW)<sub>4</sub> és NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> 14,5 ± 1,7 és 20,8 ± 2,7 nM-os K<sub>D</sub>-vel kötötte meg a GM1-et (2.b, c ábra). A kölcsönhatás sztöchiometriája 1:1 volt a jelölt fehérje feleslegében. A NA(biotinil-Penetratin)<sub>4</sub> nem mutatott affinitást a GM1-hez.

A WYKYW-tartalmú konjugátumok sejtekbe való bejutásának tesztelésére konfokális lézer pásztázó mikroszkópos (CLSM) kísérleteket végeztünk (3.d ábra). A 250–1000 nM közötti extracelluláris rakománykoncentráció-tartományban megfigyelhettük mind a NA(biotinyl-PEG-WYKYW)<sub>4</sub>, mind a NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> hatékony bejutását. Meglepő módon a NA(biotinyl-Penetratin)<sub>4</sub> ilyen körülmények között nem jutott be a sejtekbe (ez a CLSM-felvételeken is látható).

A hordozó-rakomány konstrukciók sejten belüli megjelenését fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (FACS) mérésekkel határoztuk meg 1 μM-es rakománykoncentrációnál (3.e ábra), tripánkéket használva extracelluláris fluoreszcencia kioltóként. A NA(biotinyl-PEG-WYKYW)<sub>4</sub> és NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> bejutási mértéke hasonló volt, míg a Penetratin-címkézett kontroll NA(biotinyl-Penetratin)<sub>4</sub> nem jutott be a sejtekbe. A CLSM és FACS eredmények alátámasztják, hogy a WYKYW GM1 felismerő szekvencia képes volt endocitózist kiváltani, ezzel szemben a Penetratin szekvencia nem indukálta a rakomány endocitózist azonos körülmények között (3.d,e ábra). A Penetratin jelenléte a WYKYW-tartalmú hordozó szekvenciában szignifikánsan nem változtatta a bejutás hatékonyságát a PEG linker származékhoz képest (additív vagy szinergikus hatások hiánya), ami azt jelzi, hogy a WYKYW megbízható endocitózist indukáló hatással rendelkezik, amely független a linker kémiától.

A lizoszómák festése 6 óra inkubáció után sem mutatott kolokalizációt a hordozó-rakomány komplexszel (3.d ábra). Ez azt jelzi, hogy a WYKYW képes sikeresen megcélozni a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis útvonalat.





**3. ábra.** Az **a)** NA(biotinil-PEG-WYKYW)<sub>4</sub>, **b)** NA(biotinil-Penetratin)<sub>4</sub> és **c)** NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> sematikus ábrázolása. **d)** A konstrukciók internalizálása különböző koncentrációkban HeLa sejtekkel 6 óra inkubáció után konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal meghatározva. A FITC-jelölt NA zöld színnel, a Hoechst 33342-jelölt sejtmagok ciánnal, a

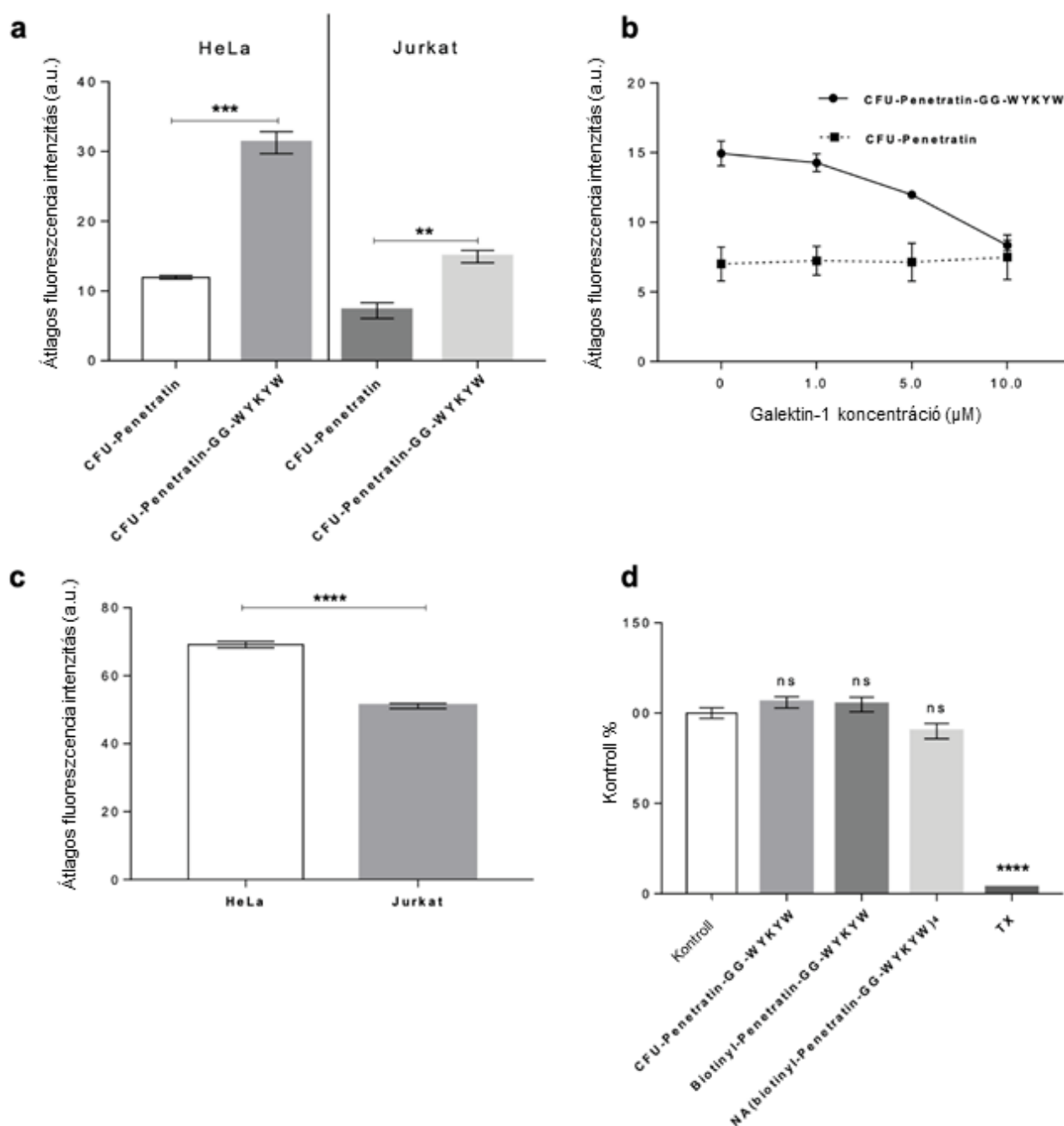
LysoTracker Reddel festett lizoszómák magenta színnel láthatók. **e)** A konstruktok bejutása  $1 \mu\text{M}$  koncentrációban HeLa sejtekkel 1 óra inkubáció után áramlási citometriával meghatározva. **f)** Az endocitózis inhibitor molekulák hatása a bejutásra áramlási citometriával meghatározva. A HeLa sejteket wortmannin (W), klórpromazin (CP) vagy  $\beta$ -metil-ciklodextrin (BMCD) inhibitorokkal  $37^\circ\text{C}$ -on 30 vagy 60 percig előinkubáltuk, majd NA (biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub>-gyel inkubáltuk.  $37^\circ\text{C}$ -on 60 percig. Kontroll kísérletet is végeztünk  $4^\circ\text{C}$ -on. Minden adatpont három mérés átlagát ábrázolja; a hibasávok az átlag standard hibáját mutatják. A statisztikai elemzést egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, post hoc Tukey szignifikáns különbség teszttel. \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Forrás: [27].

A sejtbejutási mechanizmus szelektivitásának további alátámasztására endocitózis gátlási kísérleteket végeztünk NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub>-nal HeLa sejtekben. A komplex internalizációja  $4^\circ\text{C}$ -on blokkolható volt, vagyis a transzlokáció energiatfüggő (3.f ábra). A sejtek különböző endocitózis gátlókkal történő előkezelése után azt tapasztaltuk, hogy a metil- $\beta$ -ciklodextrin (MBCD), amely egy ismert lipid-raft inhibitor, szignifikánsan csökkentette a komplex bejutását, míg a wortmannin és a klórpromazin nem mutatott szignifikáns hatást. Ez az eredmény megerősítette a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis útvonalat (3.f ábra), összhangban azzal a ténnyel, hogy a GM1 lipid-raftokban és kaveolákban lokalizálódik [28]. A lipid-raft mediált mechanizmus alátámasztására további kolokalizációs kísérletet végeztünk a másodlagos antitestten Alexa Fluor 647-tel jelölt hordozó-cargo komplexszel és FITC-jelölt koleratoxin B alegységével. A koleratoxinról ismert, hogy GM1 kötéssel és lipid-raft mediált útvonalon jut be a sejtekbe [6]. Korrelációt találtunk a koleratoxin és a hordozó-rakomány komplex jelei között, ami arra utal, hogy a hordozó-rakomány komplex lipid-raft mediált mechanizmuson keresztül jutott be a sejtekbe.

### **Egyetlen WYKYW-peptid elegendő a gangliozid GM1 kötődésen keresztül az endocitózis kiváltásához**

Helenius és Pelkmans rámutatott, hogy a GM1 gangliozid multivalens kötődése/klaszterezése szükséges a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis kiváltásához [9]. Modellünk hordozó-rakomány komplexének tetramer természete összhangban van ezzel a megfigyeléssel. Másrészt az endocitózishoz szükséges hordozó szekvenciák száma döntő lehet, különösen, ha a hordozó-cargo komplexet rekombináns szintézissel állítják elő. Ennek vizsgálatára teszteltük a monovalens CFU-Penetratin-GG-WYKYW konjugátum felvételét, amely  $141 \pm 45$  nM-os  $K_D$ -t mutatott a GM1-hez. Kontrollként CFU-Penetratint használtunk, amely nem rendelkezik GM1-kötési affinitással. A szekvenciák humán HeLa és Jurkat sejt vonalak sejt felvételét FACS-al (4.a ábra) mértük, tripánkéket használva extracelluláris fluoreszcencia kioltóként. A vivőanyagokat  $1 \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk, ami legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb a

penetratinhoz használt optimális koncentrációjánál [29], de megfigyeltük az önálló CFU-Penetratin sejtpenetrációját a fehérje rakomány nélkül.



**4. ábra. a)** Fluoreszcensen jelölt szekvenciák felvétele 1 μM koncentrációban HeLa és Jurkat sejteken 1 órás inkubáció után. **b)** CFU-Penetratin és CFU-Penetratin-GG-WYKYW 1 μM-os kompetíciója a galectin-1 0-10 μM-val. **c)** A GM1 sejtfelszíni expressziója HeLa és Jurkat sejtekben FITC-koleratoxin festéssel mérve. **d)** A CFU-Penetratin-GG-WYKYW, biotinil-Penetratin-GG-WYKYW és NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub> citotoxicitása 10 μM-en a HeLa sejtekre 24 óra elteltével bioimpedancia mérésekkel meghatározva. Triton X-100-at használtunk toxicitási kontrollként. Minden adatpont három mérés átlagát jelenti, a hibasávok pedig az átlag standard hibáját mutatják. A páratlan Student t-próbát használtuk az a) és c) panelen látható adatok statisztikai elemzéséhez: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Egyutas varianciaanalízis (ANOVA) post hoc Tukey szignifikáns különbség teszttel a d) panelben bemutatott adatok statisztikai elemzéséhez: \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Forrás: [27].

A CFU-Penetratin-GG-WYKYW komplex háromszoros, illetve kétszeres növekedést mutatott a sejtpenetráció hatékonyságában a HeLa és Jurkat sejtvonalakon, a makromolekuláris rakomány nélküli CFU-Penetratinnal kapott értékkel összehasonlítva.

Az intracelluláris rakomány mennyisége kétszer akkora volt a HeLa sejtekben, mint a Jurkat sejtekben. Feltételeztük, hogy a WYKYW sejtfüggő teljesítménye összefügg a GM1 sejt felszíni expressziós szintjével. A GM1 kötő koleratoxinnal 4 °C-on végzett kötődési kísérletek (ami megakadályozza az endocitózist) azt mutatták, hogy a HeLa sejtek magasabb szintű GM1-et expresszáltak, mint a Jurkat sejtek (4.c ábra). Ezt követően az endocitózis közvetlen GM1-függését teszteltük egy kompetíciós kísérletben, amelyben a terminális digalaktózidokhoz mikromoláris affinitással [30] kötő galectin-1-et alkalmaztunk inhibitorként.

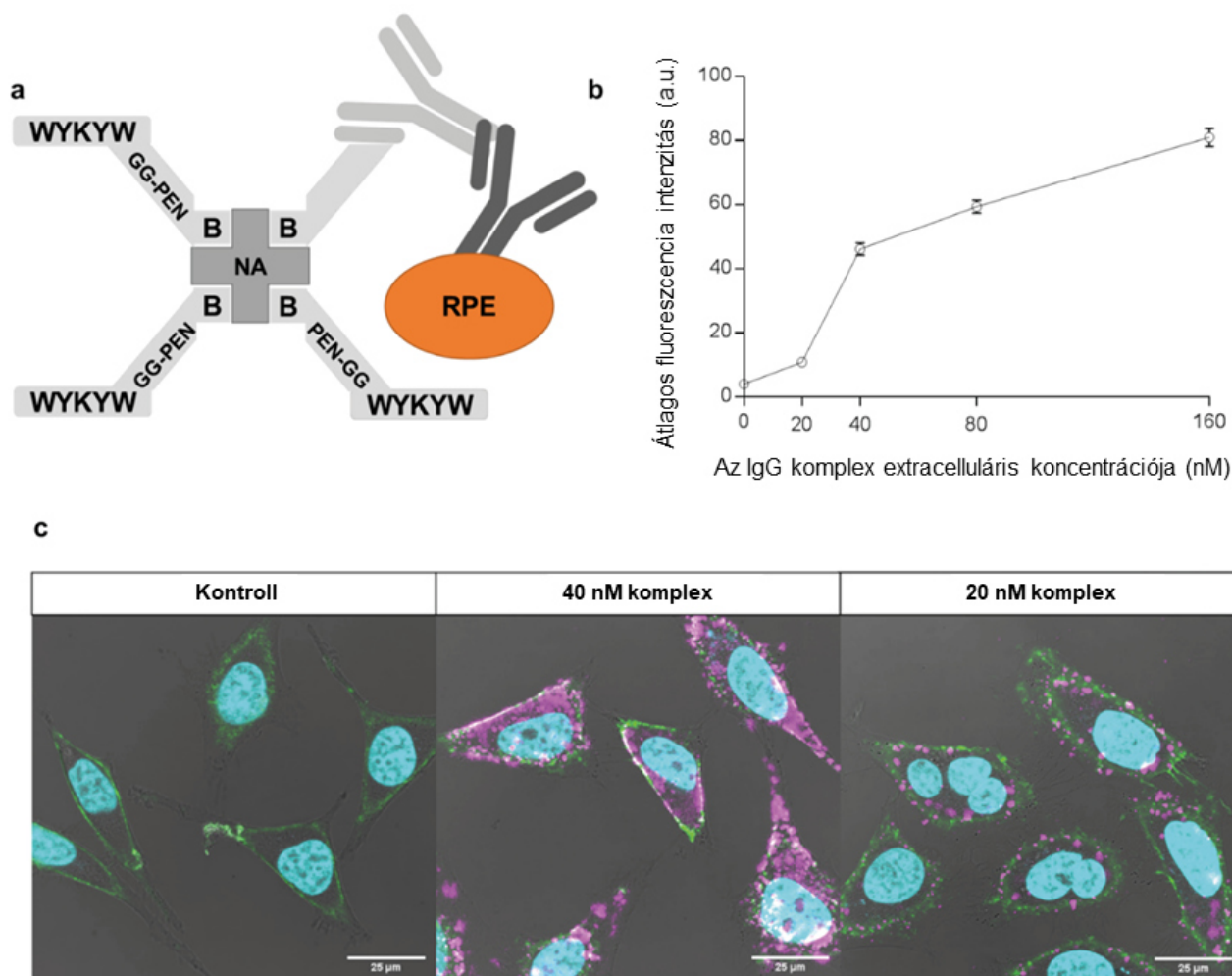
A galectin-1 10 µM-os koncentrációban csökkentette a CFU-Penetratin-GG-WYKYW felvételét a CFU-Penetratin által elért alapszintre (4.b ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy egyetlen WYKYW szegmens elegendő a GM1 kötődésen keresztül az endocitózis kiváltásához. Az internalizált rakomány mennyisége korrelált a GM1 sejt felszíni expressziós szintjével (4.c ábra). A WYKYW-tag számos előnyös tulajdonságot mutatott, és a sejtes kísérletek során nem észleltünk citotoxicitásra utaló jeleket. A CFU-Penetratin-GG-WYKYW lehetséges citotoxicitását magasabb koncentrációkban is teszteltük, és 10 µM-ig nem volt toxikus a HeLa-sejtekre (4.d ábra), így a molekula biztonságos a további kísérletekhez.

### **A WYKYW-jelölt szekvenciák képesek antitest méretű komplexeket intracellulárisan bejuttatni terápiás szempontból releváns nanomoláris koncentrációkban**

Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a WYKYW-jelölés képes-e az immunglobulinok terápiásan releváns családjába tartozó nagy fehérje rakománynál endocitózist indukálni. Terveztünk egy 580 kDa-os konstrukciót, amely linkerként NA-t, a WYKYW-tartalmú biotinil-PEG-WYKYW-et vagy biotinil-Penetratin-GG-WYKYW-et, egy biotinilált primer immunglobulin G-t és egy r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet tartalmazott (5.a ábra).

A HeLa sejteket a nagy hordozó-cargo komplexszel 3 órán át inkubáltuk különböző extracelluláris koncentrációkban. Célunk az volt, hogy teszteljük az affinitásvezérelt endocitikus anyagáramlás lehetséges alsó határát; ezért a

kísérleteket a hordozó-hub komplex affinitásához ( $K_D = 21$  nM) közeli koncentrációban végeztük el. A felülethez kötött frakció eltávolítása érdekében a mintákat alapos mosásnak vetettük alá jelöletlen NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)<sub>4</sub>-gyel. A hordozó-IgG komplex a biotinil-Penetratin-GG-WYKYW konjugátummal 20-160 nM-es koncentrációtartományban internalizálódott (5. ábra).



**5. ábra. a)** Sematikus reprezentációja az általunk tervezett moduláris konstruktnak. **b)** Mesterséges intelligenciával segített kvantitatív elemzése a felvett CLSM képeknek. A HeLa sejtek 6 órán át voltak inkubálva különböző koncentrációkban a tervezett IgG komplex molekulával. **c)** Az IgG komplex sejtbefutása különböző koncentrációkban 3 órás inkubációt követően. Az r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitest magenta színnel, a WGA-FITC jelölt membrán zöld színnel, a sejtmagok cián színnel vannak megjelenítve. A kontroll sejteket r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet adtuk 160 nM koncentrációban 3 órás inkubációban. Forrás: [27].

A biotinil-PEG-WYKYW minta előkészítése során fehérje kicsapódás volt megfigyelhető. Ez arra utalt, hogy a linker régió testre szabható szegmenseként funkcionálhat a szállító-teher komplex oldatban történő stabilizálására. Fontos, hogy a kaveoszómák között a citoplazmában diffúz fluoreszcenciát figyeltünk meg, amikor a komplexet 40 nM feletti koncentrációban alkalmaztuk, vagyis a

rendszer képes kiszabadulni az internalizált rekeszekből [31]. Az alaposabb elemzés azt támasztotta alá, hogy az internalizált rakomány mennyisége 20 nM-ban csökkent. Elvégeztük a CLSM-képek mesterséges intelligenciával segített kvantitatív elemzését (5.b ábra). Az eredmények megerősítették, hogy a WYKYW GM1 felismerő szegmenst tartalmazó komplex robusztus hordozóanyag, amely endocitózist és az 580 kDa-os rakomány transzlokációját váltotta ki a terápiás protokollok alsó tartományának megfelelő extracelluláris koncentrációkban (kb. 100 nM). A bejutott rakomány relatív mennyiségének 20 nM körüli csökkenését az elemzés megerősítette, és ez a megfigyelés a WYKYW-GM1 kölcsönhatás  $K_D$  értékéhez közel helyezi az alkalmazhatóságot. Ez a jelenség, ami a tömeghatás törvényével magyarázható, alátámasztja azt az elképzelést, hogy a rakomány endocitózist a GM1 affinitás-tag irányította. Az r-fikoeritrin intenzív intracelluláris fluoreszcens emissziója a funkcionális fehérje árulkodó jele volt. A hordozó és az r-fikoeritrin közötti IgG komponensek lehetséges lebomlásának tesztelésére kolokalizációs kísérletet végeztünk FITS-NA-val a hordozóban és egy Alexa Fluor 647-tel jelölt másodlagos antitesttel a rakományban. Nagyon jó térbeli korrelációt találtunk a két fluoreszcens jel között, ami alátámasztja, hogy az elsődleges és a másodlagos antitest közötti molekuláris felismerés működőképes. Az elsődleges antitest szerkezeti integritásának további vizsgálataként a HeLa sejteket hordozó-cargo komplexszel kezeltük, amely csak egy primer anti-galektin-1 antitestet tartalmazott a hordozóhoz, és az internalizált IgG komponenst Atto 488-segítségével tettük láthatóvá. A hordozó-cargo komplexszel kezeltetlen kontrollsejtek nem mutattak fluoreszcenciát, míg az internalizált antitest megkötötte a fluoreszcens galektin-1-et a kezelt sejtekben, és fluoreszcenciát figyeltünk meg. Ez a jelenség alátámasztja, hogy az elsődleges antitest Fv-régiója szerkezetileg sértetlen.

### Eredmények megbeszélése

Az emlősök sejtmembránja szigorú kontrollt gyakorol a sejtmembránon keresztüli makromolekuláris transzporttal szemben. A lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis a legígéretesebb módszer a rakományfehérjék funkcionális formájukban való szállítására. Koncepciónk az volt, hogy a makromolekuláris rakományt a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis felé tereljük, és elkerüljük a klatrin által közvetített és a makropinocitózis útvonalakat. Az endocitotikus membrángödrökben előforduló kezdeti molekuláris felismerési eseményekre összpontosítottunk, mert ez elősegítette a mechanizmus kiválasztását és az alacsony koncentrációjú rakomány hatékony dúsítását a

belépési ponton. Azt találtuk, hogy a WYKYW-címke nagy affinitással köti a GM1 lipid raft receptor glikán részét. A GM3-mal és az aszialo-GM1-gyel való erős kölcsönhatások hiánya szelektív viselkedést jelez. Arra a következtetésre jutottunk, hogy mind a szialilcsoport, mind a terminális N-Ac-digalaktozid a GM1-ben lényeges szerkezeti jellemzők az alacsony nanomoláris kötődéshez.

A WYKYW-tag fontos tulajdonsága, hogy hatékonyan tudja irányítani a makromolekuláris rakományt a kívánt lipid raft-mediált/kaveoláris endocitózis belépési pontjához, és még nagy rakományt tartalmazó IgG fehérjékhez kapcsolódva is képes indukálni a folyamatot. A WYKYW specifikus affinitáson alapuló irányító hatása alapján definiáljuk az „endocitózis útválasztó szekvencia” kifejezést. Bár a kaveoláris GM1 multivalens kötődése szükséges az endocitózis kiváltásához, azt találtuk, hogy egyetlen WYKYW szegmens beépítése a láncba elegendő ahhoz, hogy a GM1 kötődésen keresztül beindítsa az internalizációt. Megjegyezzük, hogy a galectin-1 a GM1–WYKYW kölcsönhatás kompetitív inhibitoraként működött, de ez csak az endogén *in vivo* szérum galectin-1 100 ng x ml<sup>-1</sup> (6,7 nM) koncentrációjánál nagyságrendekkel magasabb koncentrációban fordult elő [32]. A megfigyelés alapján az endocitózis útválasztó hatás potenciális *in vivo* gátlásának kockázata alacsony.

Ahogy az várható volt a lipid-raft mediált/kaveoláris útvonal esetében, az internalizált kaveolák korai endoszómákká, majd később lizoszómákká való előrehaladása hiányzott vagy nagyon lassú volt [11, 15], ezért nem figyeltünk meg lizoszómákkal való kolokalizációt, ami megkímélte a rakományt a korai lebomlástól [33]. Ez elősegíthette a rakomány részleges kiszabadulását a kaveoszómákból, amit kísérleteink során diffúz intracelluláris fluoreszcenciaként lehetett megfigyelni. Ez a tulajdonság utat nyit az itt bemutatott endocitózisra irányító szekvencia továbbfejlesztéséhez. A fehérje rakomány jelölése a nagy fluoreszcens fehérjével, az r-fikoeritrinnel lehetővé tette számunkra, hogy teszteljük az intracelluláris fehérje funkcionalitását. A kiválasztott mechanizmus érintetlenül hagyta a fehérje rakományt, amint azt a fluoreszcencia mutatja az órákon át tartó inkubáció után is. Ezenkívül az elsődleges és másodlagos antitestek, valamint az elsődleges antitest és a külsőleg hozzáadott antigén közötti molekuláris felismerés működőképes volt, ami azt jelzi, hogy a hordozó-rakomány komplex nem bomlik le.

GM1 receptor alapú moduláris megközelítésünk hasznos alternatívája a jelenleg elérhető hordozóknak, mivel a nagyon rövid, könnyen felhelyezhető és nem

toxikus WYKYW-tag elősegíti a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózist hordozó által kiváltott módon, és terápiásan releváns koncentrációban működik a GM1-et expresszáló sejtek számára. Egyre fontosabb a rakományok sejt- és szövetspecifikus célzására szolgáló módszerek kidolgozása. A WYKYW-jelölt rakomány GM1-függő endocitózisa szelektivitást kínál az olyan sejtípusok számára, amelyek túlzottan expresszálják a GM1-et, amely számos tumorsejt jellemzője. Ezt a sejtípus-függő hatást alátámasztják HeLa és Jurkat sejtekkel végzett kísérleteink eredményei, amelyek különböző mennyiségű GM1-et jelenítenek meg a sejt felszínen.

### Köszönetnyilvánítás

A projekt a GINOP-2.2.1-15-2016-00007 és a TUDFO/47138-1/2019-ITM pályázatok támogatásából valósult meg.

### Irodalomjegyzék

- [1] Fosgerau, K., Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, **20(1)**: 122-128.
- [2] Sanchez-Navarro, M., Teixido, M., Giralt, E. (2017) Just passing through. *Nature Chemistry*, **9(8)**: 727-728.
- [3] Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118(6)**: 767-780.
- [4] Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, **3(5)**: 473-483.
- [5] Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G.J., Toth, G.K., Monostori, E. (2008) Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65(16)**: 2586-2593.
- [6] Montesano, R., Roth, J., Robert, A., Orci, L. (1982) Non-Coated Membrane Invaginations Are Involved in Binding and Internalization of Cholera and Tetanus Toxins. *Nature*, **296(5858)**: 651-653.
- [7] Smith, A.E., Helenius, A. (2004) How viruses enter animal cells. *Science*, **304(5668)**: 237-242.
- [8] Pietiainen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., Hyypia, T. (2004) Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Molecular Biology of the Cell*, **15 (11)**: 4911-4925.



- [9] Pelkmans, L., Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3 (5)**: 311-320.
- [10] Mayor, S., Rothberg, K.G., Maxfield, F.R. (1994) Sequestration of Gpi-Anchored Proteins in Caveolae Triggered by Cross-Linking. *Science*, **264 (5167)**: 1948-1951.
- [11] Kiss, A.L., Botos, E. (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation ? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13(7)**: 1228-1237.
- [12] Sprenger, R.R., Fontijn, R.D., van Marle, J., Pannekoek, H., Horrevoets, A.J.G. (2006) Spatial segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. *Biochemical Journal*, **400**: 401-410.
- [13] Moscariello, P., Ng, D.Y.W., Jansen, M., Weil, T., Luhmann, H.J., Hedrich, J. (2018) Brain Delivery of Multifunctional Dendrimer Protein Bioconjugates. *Adv Sci (Weinh)*, **5(5)**: 1700897.
- [14] Zorko, M., Langel, U. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57(4)**: 529-545.
- [15] Matsubara, T., Otani, R., Yamashita, M., Maeno, H., Nodono, H., Sato, T. (2017) Selective Intracellular Delivery of Ganglioside GM3-Binding Peptide through Caveolae/Raft-Mediated Endocytosis. *Biomacromolecules*, **18(2)**: 355-362.
- [16] O'Sullivan, D. (2002) Framework for managing business development in the networked organisation. *Computers in Industry*, **47(1)**: 77-88.
- [17] Fuster, M.M., Esko, J.D. (2005) The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, **5(7)**: 526-542.
- [18] Krengel, U., Bousquet, P.A. (2014) Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, **5**: 1-11.
- [19] Fischer, S.K., Yang, J.H., Anand, B., Cowan, K., Hendricks, R., Li, J., Nakamura, G., Song, A. (2012) The assay design used for measurement of therapeutic antibody concentrations can affect pharmacokinetic parameters Case studies. *Mabs*, **4(5)**: 623-631.
- [20] Kauffman, W.B., Guha, S., Wimley, W.C. (2018) Synthetic molecular evolution of hybrid cell penetrating peptides. *Nature Communications*, **9**: 2568.
- [21] Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells.

- Nature Biotechnology*, **19(12)**: 1173-1176.
- [22] Andre, S., Maljaars, C.E.P., Halkes, K.M., Gabius, H.J., Kamerling, J.P. (2007) Discovery of galectin ligands in fully randomized combinatorial one-bead-one-compound (glyco)peptide libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17(3)**: 793-798.
- [23] Maljaars, C.E.P., Andre, S., Halkes, K.M., Gabius, H.J., Kamerling, J.P. (2008) Assessing the inhibitory potency of galectin ligands identified from combinatorial (glyco)peptide libraries using surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, **378(2)**: 190-196.
- [24] Andre, S., Arnusch, C.J., Kuwabara, I., Russwurm, R., Kaltner, H., Gabius, H.J., Pieters, R.J. (2005) Identification of peptide ligands for malignancy- and growth-regulating galectins using random phage-display and designed combinatorial peptide libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13(2)**: 563-573.
- [25] Weber, E., Hetenyi, A., Vaczi, B., Szolnoki, E., Fajka-Boja, R., Tubak, V., Monostori, E., Martinek, T.A. (2010) Galectin-1-Asialofetuin Interaction Is Inhibited by Peptides Containing the Tyr-Xxx-Tyr Motif Acting on the Glycoprotein. *Chembiochem*, **11(2)**: 228-234.
- [26] Kopitz, J., vonReitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., Gabius, H.J. (1997) Galectin-1 is the major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *European Journal of Cell Biology*, **74**: 54-54.
- [27] Imre, N., Hetenyi, A., Szabo, E., Bodnar, B., Szkalicity, A., Grof, I., Bocsik, A., Deli, M.A., Horvath, P., Czibula, A., Monostori, E., Martinek, T.A. (2020) Routing Nanomolar Protein Cargoes to Lipid Raft-Mediated/Caveolar Endocytosis through a Ganglioside GM1-Specific Recognition Tag. *Adv Sci (Weinh)*, **7(4)**: 1902621.
- [28] Parton, R.G. (1994) Ultrastructural-Localization of Gangliosides - Gm(1) Is Concentrated in Caveolae. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **42(2)** 155-166.
- [29] El-Andaloussi, S., Jarver, P., Johansson, H.J., Langel, U. (2007) Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochemical Journal*, **407**: 285-292.
- [30] Brewer, C.F. (2002) Thermodynamic binding studies of galectin-1,-3 and-7. *Glycoconjugate Journal*, **19(7-9)**: 459-465.

- [31] Qian, Z.Q., Liu, T., Liu, Y.Y., Briesewitz, R., Barrios, A.M., Jhiang, S.M., Pei, D.H. (2013) Efficient Delivery of Cyclic Peptides into Mammalian Cells with Short Sequence Motifs. *Acs Chemical Biology*, **8(2)**: 423-431.
- [32] He, J.L., Baum, L.G. (2004) Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *Journal of Biological Chemistry*, **279(6)**: 4705-4712.
- [33] Torchilin, V.P. (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **8**: 343-375.



**Hetényi Anasztázia** 1978-ben született Mohácson. 2008 óta dolgozik a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetében, jelenleg egyetemi docens. Vegyész diplomával rendelkezik, PhD fokozatát 2006-ben szerezte, 2015-ben habilitált. Fő kutatási területe molekuláris felismerés és önrendeződés biomimetikus rendszerekben, mely témában több Q1-es cikke jelent meg, a cikk témájából nemzetközi szabadalom született.



**Martinek A. Tamás** 1973-ben született Szegeden. 2018 óta dolgozik a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetében, jelenleg tanszékvezető egyetemi tanár. Vegyész diplomával és közgazdasági szakoklevéllel rendelkezik, PhD fokozatát 2001-ben szerezte, 2008-ban habilitált, 2014-ben MTA doktora címet szerzett. Fő kutatási területe gyógyszerkutatás-hatóanyagtervezési módszerek fejlesztése, bioaktív molekulák molekuláris szerkezeti és kémiai tulajdonságainak vizsgálata, antimikrobiális foldamerek, fehérje-fehérje kölcsönhatások, mely témában számos rangos közleménye jelent meg, a cikk témájából nemzetközi szabadalom született.

## **FELHÍVÁS**

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 szerzők által 2021. szeptember 1-ig beküldött cikkek listája 2021. szeptemberi számunkban jelent meg először az „Áttekintő közlemények az MBKE tagjainak tollából” című rovatban.

A beküldés folyamatos.

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

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

(Szerkesztette: Sarkadi Balázs)

### A szerzők által 2021. szeptember – december között beküldött cikkek (a közlemények első oldala is mellékelve):

Bene K, Halasz L, Nagy L. Transcriptional repression shapes the identity and function of tissue macrophages. *FEBS Open Bio*. 2021 Dec;11(12):3218-3229. doi: 10.1002/2211-5463.13269. Epub 2021 Aug 14. PMID: 34358410; PMCID: PMC8634859. Link: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.13269>

Berzsenyi I, Pantazi V, Borsos BN, Pankotai T. Systematic overview on the most widespread techniques for inducing and visualizing the DNA double-strand breaks. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021 Jul-Dec;788:108397. doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108397. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34893162. Link: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357422100034X>

Borsos BN, Majoros H, Pankotai T. Emerging Roles of Post-Translational Modifications in Nucleotide Excision Repair. *Cells*. 2020; 9(6):1466. Link: <https://doi.org/10.3390/cells9061466> <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/6/1466>

Borsos BN, Majoros H, Pankotai T. Ubiquitylation-Mediated Fine-Tuning of DNA Double-Strand Break Repair. *Cancers*. 2020; 12(6):1617. Link: <https://doi.org/10.3390/cancers12061617> <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1617>

Buday L, Vas V. Novel regulation of Ras proteins by direct tyrosine phosphorylation and dephosphorylation. *Cancer Metastasis Rev*. 39:1067–1073 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09918-2> Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09918-2>

Ecsédi P, Gógl G, Nyitray L. Studying the Structures of Relaxed and Fuzzy Interactions: The Diverse World of S100 Complexes. *Front Mol Biosci*. 2021 Oct 11;8:749052. doi: 10.3389/fmolb.2021.749052. PMID: 34708078; PMCID: PMC8542695. Link: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.749052/fullBottom> of Form

Griñán-Ferré C, Bellver-Sanchis A, Izquierdo V, Corpas R, Roig-Soriano J, Chillón M, Andres-Lacueva C, Somogyvári M, Sóti C, Sanfeliu C, Pallàs M. The pleiotropic

neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Res Rev.* 2021 May;67:101271. doi: 10.1016/j.arr.2021.101271. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33571701. Link: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163721000180>

Kudlik G, Takács T, Radnai L, Kurilla A, Szeder B, Koprivanacz K, Merő BL, Buday L, Vas V. Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(21):8117. <https://doi.org/10.3390/ijms21218117> Link: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8117>

László L, Kurilla A, Takács T, Kudlik G, Koprivanacz K, Buday L, Vas V. Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells.* 2021; 10(3):667. <https://doi.org/10.3390/cells10030667> <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/3/667>. Link: <https://doi.org/10.3390/cells10030667>

Laszlovszky I, Barabássy Á, Németh G. Cariprazine, a broad-spectrum antipsychotic for the treatment of schizophrenia: Pharmacology, efficacy, and safety. *Adv Ther.* 38:3652–3673; 2021. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12325-021-01797-5.pdf>

Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol.* 2020 Apr 3;432(8):2462–2482. doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.028. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31682838. Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31682838/>

Sipeki S, Koprivanacz K, Takács T, Kurilla A, László L, Vas V, Buday L. Novel Roles of SH2 and SH3 Domains in Lipid Binding. *Cells.* 2021; 10(5):1191. <https://doi.org/10.3390/cells10051191>. Link: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/5/1191>

Szarka A, Kapuy O, Lőrincz T, Bánhegyi G. Vitamin C and Cell Death. *Antioxid Redox Signal.* 2021 Apr 10;34(11):831–844. doi: 10.1089/ars.2019.7897. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32586104. Link: [https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2019.7897?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2019.7897?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed)

Szilágyi K, Flachner B, Hajdú I, Szaszko M, Dobi K, Lőrincz Z, Cseh S, Dormán G. Rapid Identification of Potential Drug Candidates from Multi-Million Compounds' Repositories. Combination of 2D Similarity Search with 3D Ligand/Structure Based Methods and In Vitro Screening. *Molecules*. 2021; 26(18):5593. <https://doi.org/10.3390/molecules26185593> Link: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/18/5593>

Takács T, Kudlik G, Kurilla A, Szeder B, Buday L, Vas V. The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39:1051–1065. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09912-8>. Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09912-8>



REVIEW

## Transcriptional repression shapes the identity and function of tissue macrophages

Krisztian Bene<sup>1</sup> , Laszlo Halasz<sup>2</sup> and Laszlo Nagy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nuclear Receptor Research Laboratory, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>2</sup> Departments of Medicine and Biological Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, St. Petersburg, FL, USA

### Keywords

epigenome; genome; macrophage; repression; tissue-resident; transcription

### Correspondence

L. Nagy, Johns Hopkins All Children's Research and Education Building, Institute for Fundamental Biomedical Research, 600 Fifth Street S., 4th floor, Rm. 4402, St. Petersburg, FL 33701, USA  
 Fax: +727 767 8804  
 Tel: +727 767 8928  
 E-mail: lnagy@jhmi.edu

(Received 3 June 2021, revised 16 July 2021, accepted 5 August 2021)

doi:10.1002/2211-5463.13269

Edited by: Irene Díaz-Moreno

The changing extra- and intracellular microenvironment calls for rapid cell fate decisions that are precisely and primarily regulated at the transcriptional level. The cellular components of the immune system are excellent examples of how cells respond and adapt to different environmental stimuli. Innate immune cells such as macrophages are able to modulate their transcriptional programs and epigenetic regulatory networks through activation and repression of particular genes, allowing them to quickly respond to a rapidly changing environment. Tissue macrophages are essential components of different immune- and nonimmune cell-mediated physiological mechanisms in mammals and are widely used models for investigating transcriptional regulatory mechanisms. Therefore, it is critical to unravel the distinct sets of transcription activators, repressors, and coregulators that play roles in determining tissue macrophage identity and functions during homeostasis, as well as in diseases affecting large human populations, such as metabolic syndromes, immune-deficiencies, and tumor development. In this review, we will focus on transcriptional repressors that play roles in tissue macrophage development and function under physiological conditions.

Macrophages belong to the innate immune system and represent a highly plastic immune cell population at both transcriptional and functional level [1–3]. Macrophages possess several effector and regulatory functions in immunity including phagocytosis, inflammation, cell killing, antigen presentation, immune complex delivery, and tissue regeneration. These functions are determined by the local tissue and organ demands under physiological conditions. Resident macrophages as accessory cells are able to support the activity of local parenchymal

cells to maintain the integrity and the physiological function of the local tissue and organ [2].

The effector functions of macrophages are tightly regulated by environmental cues such as infectious agents, cytokines, chemokine, growth factors, lipids, and metabolites, enabling macrophages to rapidly adapt and respond to a given microenvironment and multiple stimuli [4]. A major goal of macrophage biology research is to uncover the molecular mechanisms of macrophage development and polarization and link

### Abbreviations

(G)M-CSF, (Granulocyte-) macrophage colony-stimulating factor; BACH1/2, BTB and CNC homology 1/2; BCL-6, B-cell lymphoma 6 protein; CHIP, chromatin immunoprecipitation; eRNA, enhancer RNA; GPS2, G protein pathway suppressor 2; HDAC, histone deacetylase; HMT, histone methyl transferase; IFN, interferon; IRF4/8, interferon regulatory factor 4/8; LDTF, lineage-determining transcription factor; LXR, liver X receptor; NCoR, nuclear receptor corepressor; NfκB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PRR, pattern recognition receptor; RXR, retinoid X receptor; SDTF, signal-dependent transcription factor; SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors; STAT, signal transducer and activator of transcription.

3218

FEBS Open Bio 11 (2021) 3218–3229 © 2021 The Authors. FEBS Open Bio published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Federation of European Biochemical Societies.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.





Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Mutation Research-Reviews in Mutation Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mutrev](https://www.elsevier.com/locate/mutrev)



Review

### Systematic overview on the most widespread techniques for inducing and visualizing the DNA double-strand breaks

Ivett Berzsényi<sup>1</sup>, Vasiliki Pantazi<sup>1</sup>, Barbara N. Borsos, Tibor Pankotai \*

Institute of Pathology, Albert Szent-Györgyi Medical School, University of Szeged, 1 Állomás Street H-6725, Szeged, Hungary



#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

DNA repair  
Chromatin immunoprecipitation  
Fluorescence microscopy  
Site-specific DSBs  
Laser microirradiation  
Immunostaining

#### ABSTRACT

DNA double-strand breaks (DSBs) are one of the most frequent causes of initiating cancerous malformations, therefore, to reduce the risk, cells have developed sophisticated DNA repair mechanisms. These pathways ensure proper cellular function and genome integrity. However, any alteration or malfunction during DNA repair can influence cellular homeostasis, as improper recognition of the DNA damage or dysregulation of the repair process can lead to genome instability. Several powerful methods have been established to extend our current knowledge in the field of DNA repair. For this reason, in this review, we focus on the methods used to study DSB repair, and we summarize the advantages and disadvantages of the most commonly used techniques currently available for the site-specific induction of DSBs and the subsequent tracking of the repair processes in human cells. We highlight methods that are suitable for site-specific DSB induction (by restriction endonucleases, CRISPR-mediated DSB induction and laser microirradiation) as well as approaches [e.g., fluorescence-, confocal- and super-resolution microscopy, chromatin immunoprecipitation (ChIP), DSB-labeling and sequencing techniques] to visualize and follow the kinetics of DSB repair.

#### 1. DNA damage response

The nucleotide sequence of the DNA encodes the genetic information responsible for all the biological processes of every living organism and thus, requires high fidelity between and during cell divisions. However, genotoxic stresses arising either endogenously (e.g., metabolic by-products) or exogenously (e.g., UV light or irradiation) constantly threaten the genome integrity and can give rise to a variety of DNA lesions. These impairments are among the leading causes of human cancerous diseases. It is worth mentioning that endogenous sources in human cells can also trigger genetic or even immune response variability during antibody production as part of the programmed developmental processes without leading to a detrimental outcome [1]. DNA damage response (DDR) can lead to the activation of the appropriate pathway for resolution of DNA damage [2]. For instance, replication errors are repaired by the mismatch repair pathway, whereas abasic sites, single-strand breaks and 8-oxoguanine (8-oxoG) are mainly removed by base-excision repair [3–5]. UV-induced photoproducts [e.g., cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts (6-4PPs)] and

bulky adducts [e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)] are recognized by nucleotide-excision repair (NER), which can be separated into two main sub-pathways: (I) global genomic NER (GG-NER), and (II) transcription-coupled NER (TC-NER), which are activated according to the presence of the stalled RNA polymerase II (RNAPII) [6]. Helix distorting lesions initiate the recruitment of TC-NER factors, which recognize the stalled RNAPII and participate in its backtracking or removal. On the other hand, GG-NER is activated by CPDs and does not require the presence of the stalled RNAPII. Nonetheless, the downstream steps are the same in both sub-pathways [7].

Undoubtedly, DSBs are the most hazardous DNA lesions for the cells. If left unrepaired or erroneously repaired, they can result in chromosomal translocations and genomic instability and subsequently, lead to tumorigenesis or cell death. Therefore, DNA double-strand break repair (DSBR) is an intricate process that can activate distinct pathways depending on the cell-cycle phase and the chromatin environment [8–11]. To this end, based on the presence of a sister chromatid—and thus the cell cycle phase—that can serve as a template for repair, DSBR is dominated by two major pathways: (I) non-homologous end joining

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [berzsényi.ivett@med.u-szeged.hu](mailto:berzsényi.ivett@med.u-szeged.hu) (I. Berzsényi), [vasiliki.pantazi@med.u-szeged.hu](mailto:vasiliki.pantazi@med.u-szeged.hu) (V. Pantazi), [borsos.barbara.nikolett@szte.hu](mailto:borsos.barbara.nikolett@szte.hu) (B.N. Borsos), [pankotai.tibor@szte.hu](mailto:pankotai.tibor@szte.hu) (T. Pankotai).

<sup>1</sup> Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108397>

Received 19 July 2021; Received in revised form 21 October 2021; Accepted 22 October 2021

Available online 29 October 2021

1383-5742/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Review

## Emerging Roles of Post-Translational Modifications in Nucleotide Excision Repair

Barbara N. Borsos, Hajnalka Majoros and Tibor Pankotai \*

Department of Oral Biology and Experimental Dental Research, Faculty of Dentistry, University of Szeged, 83 Tisza L. krt., H-6722 Szeged, Hungary; borsos.barbara.nikolett@gmail.com (B.N.B.); majoroshajnalka@gmail.com (H.M.)

\* Correspondence: pankotai@bio.u-szeged.hu or pankotai.tibor@stoma.szote.u-szeged.hu

Received: 18 May 2020; Accepted: 12 June 2020; Published: 15 June 2020



**Abstract:** Nucleotide excision repair (NER) is a versatile DNA repair pathway which can be activated in response to a broad spectrum of UV-induced DNA damage, such as bulky adducts, including cyclobutane-pyrimidine dimers (CPDs) and 6–4 photoproducts (6–4PPs). Based on the genomic position of the lesion, two sub-pathways can be defined: (I) global genomic NER (GG-NER), involved in the ablation of damage throughout the whole genome regardless of the transcription activity of the damaged DNA locus, and (II) transcription-coupled NER (TC-NER), activated at DNA regions where RNAPII-mediated transcription takes place. These processes are tightly regulated by coordinated mechanisms, including post-translational modifications (PTMs). The fine-tuning modulation of the balance between the proteins, responsible for PTMs, is essential to maintain genome integrity and to prevent tumorigenesis. In this review, apart from the other substantial PTMs (SUMOylation, PARylation) related to NER, we principally focus on reversible ubiquitylation, which involves E3 ubiquitin ligase and deubiquitylase (DUB) enzymes responsible for the spatiotemporally precise regulation of NER.

**Keywords:** TC-NER; GG-NER; E3 ligases; DUBs; ubiquitylation; K63 chains; K48 chains

### 1. Introduction

In eukaryotic cells exposed to UV-irradiation, two different modes of nucleotide excision repair (NER) are activated: (I) global genomic-nucleotide excision repair (GG-NER) and (II) transcription-coupled-nucleotide excision repair (TC-NER), which is involved in the recognition of distorted DNA and determines both spatial and time-related preferences [1,2]. NER contributes to the elimination of helix-distorting lesions, including cyclobutane-pyrimidine dimers (CPDs), 6–4 photoproducts (6–4PPs), and other bulky adducts; hence, it maintains genome stability. The complexity of NER pathways, the size and scaffold structure of the lesion, and the functions of the repair factors need to be orchestrated in a multi-stage process. The coordinated interactions of more than 30 proteins involved in NER are mainly controlled by various post-translational modifications (PTMs), including ubiquitylation, ADP-ribosylation (PARylation), and SUMOylation.

Ubiquitylation is catalyzed by E1 activating, E2 conjugating, and E3 ligase enzymes [3]. During ubiquitylation, one or more ubiquitin molecule(s) (referred to as monoubiquitylation and polyubiquitylation, respectively) can be transferred to the target protein, and this process results in different outcomes regarding the type of ubiquitin linkage. For instance, in most cases, K48-linked polyubiquitylation leads to the proteasomal degradation of the target protein, while K63-linked chains take part in other cellular processes [4]. During ubiquitylation, it is essential to maintain the balance between the E3 ligases and deubiquitylases (DUBs) responsible for the removal of the ubiquityl groups. CRL4<sup>DDB2</sup> and CRL4<sup>CSA</sup> (Cullin-RING ubiquitin ligase) E3 ligase complexes catalyze the



Review

# Ubiquitylation-Mediated Fine-Tuning of DNA Double-Strand Break Repair

Barbara N. Borsos, Hajnalka Majoros and Tibor Pankotai \* 

Department of Oral Biology and Experimental Dental Research, Faculty of Dentistry, University of Szeged, 83 Tisza L. Krt. H-6722 Szeged, Hungary; borsos.barbara.nikolett@gmail.com (B.N.B.); majoroshajnalka@gmail.com (H.M.)

\* Correspondence: pankotai@bio.u-szeged.hu or pankotai.tibor@stoma.szote.u-szeged.hu

Received: 11 May 2020; Accepted: 17 June 2020; Published: 18 June 2020



**Abstract:** The proper function of DNA repair is indispensable for eukaryotic cells since accumulation of DNA damages leads to genome instability and is a major cause of oncogenesis. Ubiquitylation and deubiquitylation play a pivotal role in the precise regulation of DNA repair pathways by coordinating the recruitment and removal of repair proteins at the damaged site. Here, we summarize the most important post-translational modifications (PTMs) involved in DNA double-strand break repair. Although we highlight the most relevant PTMs, we focus principally on ubiquitylation-related processes since these are the most robust regulatory pathways among those of DNA repair.

**Keywords:** DNA repair; DSB; PTM; ubiquitylation; deubiquitylation

## 1. Introduction

### *Signaling through Ubiquitylation*

Ubiquitylation is a reversible process, involving a cascade of E1 (ubiquitin-activating), E2 (ubiquitin-conjugating) and E3 (ubiquitin ligase) enzymes for ubiquitin addition and deubiquitylating enzymes (DUBs) for ubiquitin removal [1,2]. The enzyme cascade covalently links the small protein (76 amino acid residues) ubiquitin through its N-terminal glycine (G) residue to lysine (K) residues of the marked proteins.

Target proteins can be mono- or polyubiquitylated at different positions, leading to alternative responses that influence the stability of repair factors as well as their recruitment and localization. Although less information is known about monoubiquitylation, it has diverse effects on cellular processes. For instance, it plays a role in contributing to nuclear export-import, the chromatin recruitment or dissociation of certain proteins and also participates in protein degradation [3]. During polyubiquitylation, certain internal lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48 and K63) of ubiquitin serve as acceptor sites for the binding of additional ones [1]. According to these sites, proteins are marked for either participation in different cellular responses (e.g., K6, K27, K33 and K63) or for degradation by the 26S proteasome (e.g., K11 and K48).

Based on the type of DNA damage, different cellular processes and repair pathways can be activated, and these are tightly regulated by post-translational modifications (acetylation, methylation, phosphorylation, PARylation, SUMOylation, neddylation, ubiquitylation, etc.). Although, this is an extensively studied field, a comprehensive overview needs to be undertaken to enable a better understanding of the roles of these modifications in DNA double-strand break repair (DSBR).



## Novel regulation of Ras proteins by direct tyrosine phosphorylation and dephosphorylation

László Buday<sup>1,2</sup> · Virág Vas<sup>1</sup>

Received: 7 June 2020 / Accepted: 19 June 2020 / Published online: 16 September 2020  
 © The Author(s) 2020

### Abstract

Somatic mutations in the *RAS* genes are frequent in human tumors, especially in pancreatic, colorectal, and non-small-cell lung cancers. Such mutations generally decrease the ability of Ras to hydrolyze GTP, maintaining the protein in a constitutively active GTP-bound form that drives uncontrolled cell proliferation. Efforts to develop drugs that target Ras oncoproteins have been unsuccessful. Recent emerging data suggest that Ras regulation is more complex than the scientific community has believed for decades. In this review, we summarize advances in the “textbook” view of Ras activation. We also discuss a novel type of Ras regulation that involves direct phosphorylation and dephosphorylation of Ras tyrosine residues. The discovery that pharmacological inhibition of the tyrosine phosphoprotein phosphatase SHP2 maintains mutant Ras in an inactive state suggests that SHP2 could be a novel drug target for the treatment of Ras-driven human cancers.

**Keywords** Ras · Ras signaling · SOS · Tyrosine phosphorylation · SHP2 · Cancer therapy

### 1 Introduction

The products of the *RAS* family of proto-oncogenes are low-molecular-weight guanine nucleotide-binding proteins that mediate cell growth, survival, and differentiation *via* interactions with a variety of effector proteins [1, 2]. Ras proteins are enzymes capable of hydrolyzing bound GTP to GDP and inorganic phosphate. Cycling between GDP-bound inactive and GTP-bound active forms is facilitated by guanine nucleotide exchange factors (GEF) and GTPase-activating proteins (GAPs) *via* a mechanism that is common in the Ras superfamily [3, 4]. The three human *RAS* genes encode four highly similar proteins: H-Ras, N-Ras, and K-Ras4A and K-Ras4B. The expression of two protein products from the mammalian *K-RAS* gene results from the use of alternative fourth exons.

Single-base substitutions in codons 12, 13, or 61 of *RAS* are among the most frequent oncogenic mutations in human cancers [5]. These mutations activate Ras by eliminating its GTP

hydrolysis activity. Despite the high degree of similarity between the isoforms, K-Ras is the most frequently mutated; indeed, K-Ras mutations have been identified in 22% of all tumors investigated (compared with 8% for N-Ras and 3% for H-Ras) [6, 7].

#### 1.1 Conventional regulation of Ras activation

The first conceptualization of Ras activation was established in the early 1990s. According to this early model, growth factors, e.g., epidermal growth factor (EGF), induce a rapid dimerization and autophosphorylation of their receptors at the plasma membrane. Phosphotyrosine residues in the non-catalytic region of the receptors bind a variety of signaling molecules possessing SH2 or PTB domains, including the Grb2 adaptor protein. Grb2 is a small ubiquitously expressed and highly conserved protein with a central SH2 domain flanked by two SH3 domains. Binding of Grb2 to activated receptors *via* its SH2 domain recruits the SOS-Grb2 complex from the cytosol, placing SOS in proximity to the plasma membrane where it can stimulate the exchange of GDP for GTP on membrane-bound Ras. These early studies suggested that SOS translocation to the plasma membrane was sufficient for Ras activation [8–10].

However, the importance of Grb2-mediated membrane recruitment of SOS was challenged by several critical questions emerging from subsequent studies. For example, a

✉ László Buday  
 buday.laszlo@tk.hu

<sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Budapest 1117, Hungary

<sup>2</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, Budapest 1094, Hungary



# Studying the Structures of Relaxed and Fuzzy Interactions: The Diverse World of S100 Complexes

Péter Ecsédi<sup>1</sup>, Gergő Gógl<sup>2</sup> and László Nyitrai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, <sup>2</sup>Department of Integrative Structural Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U1258/CNRS UMR 7104/Université de Strasbourg, Illkirch, France

S100 proteins are small, dimeric, Ca<sup>2+</sup>-binding proteins of considerable interest due to their associations with cancer and rheumatic and neurodegenerative diseases. They control the functions of numerous proteins by forming protein–protein complexes with them. Several of these complexes were found to display “fuzzy” properties. Examining these highly flexible interactions, however, is a difficult task, especially from a structural biology point of view. Here, we summarize the available *in vitro* techniques that can be deployed to obtain structural information about these dynamic complexes. We also review the current state of knowledge about the structures of S100 complexes, focusing on their often-asymmetric nature.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Miquel Pons,  
University of Barcelona, Spain

### Reviewed by:

Mikael Akke,  
Lund University, Sweden  
Helen Mott,  
University of Cambridge,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

László Nyitrai  
laszlo.nyitrai@ttk.elte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Recognition,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 28 July 2021

Accepted: 06 September 2021

Published: 11 October 2021

### Citation:

Ecsédi P, Gógl G and Nyitrai L (2021)  
Studying the Structures of Relaxed and  
Fuzzy Interactions: The Diverse World  
of S100 Complexes.  
Front. Mol. Biosci. 8:749052.  
doi: 10.3389/fmolb.2021.749052

**Keywords:** S100 proteins, fuzzy interactions, X-ray crystallography, NMR, annexin A2, p53, RSK1, NM2A

## INTRODUCTION

In nature, most protein domains adopt a well-defined tertiary structure and are considered “ordered.” The formation of such globular structures was used to be considered necessary for proteins to display functional activity—and thus came the term “structure–function relationship.” However, forming a globular structure is no longer regarded as a universal requirement for proteins, since several regions and even full proteins have been shown to be disordered and functional at the same time (Dunker et al., 2001; Gsponer and Babu, 2009; Tompa, 2012; van der Lee et al., 2014). These regions and proteins are usually referred to as intrinsically disordered regions (IDRs) and intrinsically disordered proteins (IDPs), respectively. IDRs are very often targets of post-translational modifications (PTMs) (Gsponer and Babu, 2009; van der Lee et al., 2014) and contain linear motifs that participate in many protein–protein interactions (PPIs) (Weatheritt et al., 2012). Note here that although they lack a fixed conformation, typically in the absence of their interaction partners, many IDPs are promiscuous binders, complexed *via* multiple binding scenarios (Weatheritt et al., 2012; Uversky, 2013). Certain regions of a given IDR interact with its binding partner, while other sections do not necessarily form interactions and remain flexible. Such a complex can thus be described as a heterogeneous ensemble of different conformations (Arbesú et al., 2018). These IDR complexes represent a continuum of fuzzy complexes from the rather rigid polymorphic complexes, in which the bindings of IDRs are fixed with only a few stable alternative conformations, to the highly dynamic random complexes, where numerous binding scenarios can appear at nearly equal energy levels (Tompa and Fuxreiter, 2008; Uversky and Dunker, 2010; Sharma et al., 2015; Arbesú et al., 2018; Miskei et al., 2020). These binding modes are more permissive than the lock-and-key-like, the induced-fit, or the fluctuation-induced interaction modes, typically used to picture enzyme–ligand interactions (Tripathi and Bankaitis, 2017). In this traditional picture, the binding of a ligand to an



Contents lists available at ScienceDirect

Ageing Research Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/arr](http://www.elsevier.com/locate/arr)



Review

The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy



Christian Griñán-Ferré <sup>a,\*</sup>, Aina Bellver-Sanchis <sup>a</sup>, Vanessa Izquierdo <sup>a</sup>, Rubén Corpas <sup>b</sup>, Joan Roig-Soriano <sup>c</sup>, Miguel Chillón <sup>c,d,e,f</sup>, Cristina Andres-Lacueva <sup>g,h</sup>, Milán Somogyvári <sup>i</sup>, Csaba Solti <sup>i</sup>, Coral Sanfeliu <sup>b</sup>, Mercè Pallàs <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pharmacology Section, Department of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Neuroscience, University of Barcelona (NeuroUB), Av Joan XXIII 27-31, 08028, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, IDIBAPS and CIBERESP, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma Barcelona, Institut de Neurociències (INc), Universitat Autònoma Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>d</sup> Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Research Group on Gene Therapy at Nervous System, Passeig de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Unitat producció de Vectors (UPV), Universitat Autònoma Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>f</sup> Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Biomarkers and Nutrimental Laboratory, Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Xarxa, INSA, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Campus Torribera, University of Barcelona, Spain

<sup>h</sup> CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

<sup>i</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Antioxidants  
Resveratrol  
Neurodegeneration  
Klotho  
Epigenetic  
Senescence  
Gut microbiota

ABSTRACT

While the elderly segment of the population continues growing in importance, neurodegenerative diseases increase exponentially. Lifestyle factors such as nutrition, exercise, and education, among others, influence ageing progression, throughout life. Notably, the Central Nervous System (CNS) can benefit from nutritional strategies and dietary interventions that prevent signs of senescence, such as cognitive decline or neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's Disease. The dietary polyphenol Resveratrol (RV) possesses antioxidant and cytoprotective effects, producing neuroprotection in several organisms. The oxidative stress (OS) occurs because of Reactive oxygen species (ROS) accumulation that has been proposed to explain the cause of the ageing. One of the most harmful effects of ROS in the cell is DNA damage. Nevertheless, there is also evidence demonstrating that OS can produce other molecular changes such as mitochondrial dysfunction, inflammation, apoptosis, and epigenetic modifications, among others. Interestingly, the dietary polyphenol RV is a potent antioxidant and possesses pleiotropic actions, exerting its activity through various molecular pathways. In addition, recent evidence has shown that RV mediates epigenetic changes involved in ageing and the function of the CNS that persists across generations. Furthermore, it has been demonstrated that RV interacts with gut microbiota, showing modifications in bacterial composition associated with beneficial effects. In this review, we give a comprehensive overview of the main mechanisms of action of RV in different experimental models, including clinical trials and discuss how the interconnection of these molecular events could explain the neuroprotective effects induced by RV.

1. Introduction

According to 2015 United Nations report on the ageing of the world population, it is expected that the number of people aged 60 and over

worldwide will double in the next 35 years, reaching almost 2.1 billion people. Ageing is an inevitable and irreversible process characterized by the progressive functional decline of organisms at the molecular, cellular and physiological level (Sen et al., 2016; López-Otín et al.,

\* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain.

E-mail address: [Christian.grinan@ub.edu](mailto:Christian.grinan@ub.edu) (C. Griñán-Ferré).

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101271>

Received 23 February 2020; Received in revised form 3 February 2021; Accepted 3 February 2021



Available online 8 February 2021

1568-1637/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Review

## Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis

Gyöngyi Kudlik<sup>1</sup>, Tamás Takács<sup>1</sup>, László Radnai<sup>1,2,3</sup> , Anita Kurilla<sup>1</sup>, Bálint Szeder<sup>1</sup>, Kitti Koprivanacz<sup>1</sup>, Balázs L. Merő<sup>1</sup>, László Buday<sup>1,4</sup>  and Virag Vas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary; kudlik.gyongyi@ttk.hu (G.K.); takacs.tamas@ttk.hu (T.T.); lradni@scripps.edu (L.R.); kurilla.anita@abc.naik.hu (A.K.); szeder.balint@ttk.mta.hu (B.S.); koprivanacz.kitti@ttk.hu (K.K.); mero.balazs@ttk.mta.hu (B.L.M.); buday.laszlo@ttk.mta.hu (L.B.)

<sup>2</sup> Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, Jupiter, FL 33458, USA

<sup>3</sup> Department of Neuroscience, The Scripps Research Institute, Jupiter, FL 33458, USA

<sup>4</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, 1085 Budapest, Hungary

\* Correspondence: vas.virag@ttk.hu

Received: 29 September 2020; Accepted: 27 October 2020; Published: 30 October 2020



**Abstract:** Scaffold proteins are typically thought of as multi-domain “bridging molecules.” They serve as crucial regulators of key signaling events by simultaneously binding multiple participants involved in specific signaling pathways. In the case of epidermal growth factor (EGF)-epidermal growth factor receptor (EGFR) binding, the activated EGFR contacts cytosolic SRC tyrosine-kinase, which then becomes activated. This process leads to the phosphorylation of SRC-substrates, including the tyrosine kinase substrates (TKS) scaffold proteins. The TKS proteins serve as a platform for the recruitment of key players in EGFR signal transduction, promoting cell spreading and migration. The TKS4 and the TKS5 scaffold proteins are tyrosine kinase substrates with four or five SH3 domains, respectively. Their structural features allow them to recruit and bind a variety of signaling proteins and to anchor them to the cytoplasmic surface of the cell membrane. Until recently, TKS4 and TKS5 had been recognized for their involvement in cellular motility, reactive oxygen species-dependent processes, and embryonic development, among others. However, a number of novel functions have been discovered for these molecules in recent years. In this review, we attempt to cover the diverse nature of the TKS molecules by discussing their structure, regulation by SRC kinase, relevant signaling pathways, and interaction partners, as well as their involvement in cellular processes, including migration, invasion, differentiation, and adipose tissue and bone homeostasis. We also describe related pathologies and the established mouse models.

**Keywords:** scaffold protein; tyrosine kinase substrates; TKS4; TKS5; invasion; mesenchymal stem cells; adipose tissue; bone homeostasis; epithelial–mesenchymal transition


### 1. Introduction

Scaffold proteins modulate intracellular signaling by bringing regulatory proteins, enzymes, or cytoskeletal structures in close proximity [1]. TKS molecules are large scaffold proteins earning their name from the early observation that they serve as tyrosine kinase substrates of SRC kinase [2–4]. TKS4 and TKS5 contain one Phox Homology (PX) domain, conserved linear motifs, e.g., several proline-rich motifs (PRMs), and four or five SRC Homology 3 (SH3) domains, respectively. Other



Review

## Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology

Loretta László<sup>1,†</sup>, Anita Kurilla<sup>1,†</sup>, Tamás Takács<sup>1</sup>, Gyöngyi Kudlik<sup>1</sup>, Kitti Koprivanacz<sup>1</sup>, László Buday<sup>1,2</sup> and Virag Vas<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Research Centre for Natural Sciences, Institute of Enzymology, 1051 Budapest, Hungary; laszlo.loretta@ttk.hu (L.L.); kurilla.anita@ttk.hu (A.K.); takacs.tamas@ttk.hu (T.T.); kudlik.gyongyi@ttk.hu (G.K.); koprivanacz.kitti@ttk.hu (K.K.); buday.laszlo@ttk.hu (L.B.)

<sup>2</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, 1071 Budapest, Hungary

\* Correspondence: vas.virag@ttk.hu

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** The most commonly mutated isoform of RAS among all cancer subtypes is KRAS. In this review, we focus on the special role of KRAS mutations in colorectal cancer (CRC), aiming to collect recent data on KRAS-driven enhanced cell signalling, in vitro and in vivo research models, and CRC development-related processes such as metastasis and cancer stem cell formation. We attempt to cover the diverse nature of the effects of KRAS mutations on age-related CRC development. As the incidence of CRC is rising in young adults, we have reviewed the driving forces of ageing-dependent CRC.

**Keywords:** KRAS; colorectal cancer; RAS signalling; cancer stem cells; RAS-driven metastasis; CRC with age



**Citation:** László, L.; Kurilla, A.; Takács, T.; Kudlik, G.; Koprivanacz, K.; Buday, L.; Vas, V. Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells* **2021**, *10*, 667. <https://doi.org/10.3390/cells10030667>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 27 January 2021

Accepted: 10 March 2021

Published: 17 March 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. 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. Introduction

In spite of early-stage detection screening methods and innovative tumour therapies for colorectal cancer (CRC), CRC is still a cancer type that is a leading cause of death worldwide. Several risk factors as well as epigenetic and genetic alterations are implicated in CRC development. In addition to APC, TP53, and NMR gene-inactivating mutations and BRAF and PIK3CA activating mutations, the acquisition of mutated forms of RAS oncogene represent an important trigger for CRC development.

The RAS family consists of membrane-associated small GTPases which play essential roles in cell survival, proliferation, and differentiation. There are four RAS protein isoforms in humans: HRAS, NRAS, and two splice variants, KRAS4A and KRAS4B [1]. The most commonly mutated RAS gene in CRC is KRAS [2].

RAS proteins comprise two regions, the G domain and the C terminal hypervariable region. G domain sequences are highly homologous, while the hypervariable regions (HVR) differ across the RAS isoforms [3]. The G domain is responsible for catalytic activity and effector binding, while the function of the HVR is mainly binding to the plasma membrane [4]. The HVR region, which is responsible for plasma membrane (PM) association, undergoes a series of posttranslational modifications (PTMs) required for it to bind the membrane. Membrane attachment is indispensable for cellular RAS function [5]. One of the PTMs required for membrane localisation is prenylation, which occurs on the CAAX sequence at the C terminal end of the protein (Figure 1). This modification results in farnesylation of the cysteine residue in the CAAX motif by farnesyltransferase (FTase), which promotes proteolytic cleavage of the last three amino acids (AAX) by RAS-converting enzyme 1 (RCE1) [6]. Next, a methyltransferase catalyses carboxyl methylation of the new C terminus at the cysteine residue remaining from the CAAX motif, and this reaction neutralises the negatively charged end of the polypeptide chain and increases its membrane affinity [6,7]. These reactions, together called CAAX processing, boost the





REVIEW

## Cariprazine, A Broad-Spectrum Antipsychotic for the Treatment of Schizophrenia: Pharmacology, Efficacy, and Safety

István Laszlovszky · Ágota Barabássy · György Németh

Received: April 14, 2021 / Accepted: May 15, 2021 / Published online: June 6, 2021  
 © The Author(s) 2021

### ABSTRACT

Schizophrenia is characterized by positive, negative, cognitive, and affective symptoms. Antipsychotic medications, which work by blocking the dopamine D<sub>2</sub> receptor, are the foundation of pharmacotherapy for schizophrenia to control positive symptoms. Cariprazine is a dopamine D<sub>3</sub> receptor-preferring D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> partial agonist antipsychotic that is approved for the treatment of schizophrenia (USA and European Union [EU]) and manic and depressive episodes associated with bipolar I disorder (USA). Partial agonist agents have a lower intrinsic activity at receptors than full agonists, so they act as either functional agonists or functional antagonists depending on the surrounding neurotransmitter environment. Beyond efficacy against positive symptoms, the unique D<sub>3</sub>-preferring partial agonist pharmacology of cariprazine suggests potential advantages against negative symptoms, and cognitive and functional impairment, which are challenging to treat. The efficacy and safety of cariprazine in adult patients with schizophrenia have been demonstrated in four short-term randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials, two long-term open-label studies,

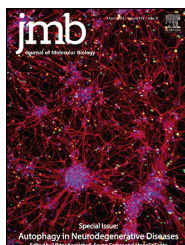
one relapse prevention study, and one prospective negative symptom study versus the active comparator risperidone. Additional post hoc investigations have supported efficacy across individual symptoms and domains in schizophrenia, as well as in diverse areas of interest including cognition, functioning, negative symptoms, hostility, and global well-being. This comprehensive review of cariprazine summarizes its pharmacologic profile, clinical trial evidence, and post hoc investigations. Collective evidence suggests that the pharmacology of cariprazine may offer broad-spectrum efficacy advantages for patients with schizophrenia, including effects against difficult-to-treat negative and cognitive symptoms, as well as functional improvements. Cariprazine was generally safe and well tolerated in patients with short- and long-term exposure and no new safety concerns were associated with longer-duration treatment.

**Trial registration** ClinicalTrials.gov identifiers, NCT00404573, NCT00694707, NCT01104766, NCT01104779, NCT01412060, NCT00839852, NCT01104792.

**Keywords:** Atypical antipsychotic; Cariprazine; Dopamine D<sub>3</sub> receptor; Dopamine D<sub>2</sub> receptor; Functional improvement; Partial agonist; Predominant negative symptoms; Schizophrenia

I. Laszlovszky (✉) · Á. Barabássy · G. Németh  
 Medical Division, Gedeon Richter Plc., Gyömrői út  
 19–21, 1103 Budapest, Hungary  
 e-mail: i.laszlovszky@richter.hu

△ Adis



## Autophagosome-Lysosome Fusion

Péter Lőrincz<sup>1,2</sup> and Gábor Juhász<sup>1,3</sup>

1 - Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology, Eötvös Loránd University, Budapest, H-1117, Hungary

2 - Premium Postdoctoral Research Program, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

3 - Institute of Genetics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, H-6726, Hungary

**Correspondence to Péter Lőrincz and Gábor Juhász:** Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology, Eötvös Loránd University, Budapest, H-1117, Hungary. [concrete05@gmail.com](mailto:concrete05@gmail.com), [szmrt@elte.hu](mailto:szmrt@elte.hu)  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.028>

Edited by Viktor Korolchuk

### Abstract

Macroautophagy is a conserved catabolic process observed in all eukaryotic cells, during which selected cellular components are transported to and broken down within lysosomes. The process starts with the capture of unnecessary material into autophagosomes, which is followed by autophagosome-lysosome fusion to generate autolysosomes that degrade the cargo. In the past quarter-century, our knowledge about autophagosome formation almost exponentially increased, while the later steps were much less studied. This fortunately changed in the past few years, with more and more publications focusing on the fate of the completed autophagosome. In this review, we aspire to summarize the current knowledge about the molecular mechanisms of autophagosome-lysosome fusion.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### A Brief Overview of Autophagy

Autophagy (cellular “self-eating”) is one of the two main degradation pathways in eukaryotes besides the proteasome system. Because proteasomes are limited to degrading individual ubiquitinated proteins, autophagy is used for en mass degradation of parts of the cytoplasm including whole organelles and large amounts of proteins, lipids, and glycogen. It is important to note that autophagic degradation is not simply a catabolic process, as breakdown is followed by recycling of resulting monomers in biosynthetic and energy production processes [1,2].

Several autophagic routes have been described and all of them have one thing in common: their ultimate goal is to transport cellular cargo into the lysosomal lumen. How a cell achieves this serves as the basis for the classification of different autophagic processes. The most common form of autophagy is macroautophagy, in which a membrane cistern called phagophore or isolation membrane grows around a certain portion of cytoplasm, thereby

isolating it into a double-membrane autophagosome. This organelle transfers the sequestered material to the lysosomal compartment via fusion of its outer membrane with the limiting membrane of the lysosome. The result is an autolysosome, which will degrade the autophagic cargo as well as the inner autophagosomal membrane. An autophagosome may also fuse with late endosomes to generate an amphisome, but the fate of the cargo remains the same, as amphisomes subsequently also fuse with lysosomes [1,2]. Late endosome-autophagosome fusion was even suggested to be an obligatory step that must precede lysosomal fusion in metazoans [3,4]. The lysosome itself is capable of taking up smaller amounts of cytoplasmic cargo via lysosomal membrane invaginations and engulfment, in a topologically similar manner to multivesicular body formation during endosome maturation. This form of autophagy is termed microautophagy. Finally, lysosomal membranes in mammalian, bird and possibly all vertebrate cells contain lysosome-associated membrane protein 2A (Lamp-2A), which



Review

## Novel Roles of SH2 and SH3 Domains in Lipid Binding

Szabolcs Sipéki<sup>1,†</sup>, Kitti Koprivanecz<sup>2,†</sup>, Tamás Takács<sup>2</sup>, Anita Kurilla<sup>2</sup>, Loretta László<sup>2</sup>, Virag Vas<sup>2</sup>   
and László Buday<sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Semmelweis University Medical School, 1094 Budapest, Hungary; sipéki.szabolcs@med.semmelweis-univ.hu  
<sup>2</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary; koprivanecz.kitti@ttk.hu (K.K.); takacs.tamas@ttk.hu (T.T.); kurilla.anita@ttk.hu (A.K.); laszlo.loretta@ttk.hu (L.L.); vas.virag@ttk.hu (V.V.)  
 \* Correspondence: buday.laszlo@ttk.hu  
 † Both authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Signal transduction, the ability of cells to perceive information from the surroundings and alter behavior in response, is an essential property of life. Studies on tyrosine kinase action fundamentally changed our concept of cellular regulation. The induced assembly of subcellular hubs via the recognition of local protein or lipid modifications by modular protein interactions is now a central paradigm in signaling. Such molecular interactions are mediated by specific protein interaction domains. The first such domain identified was the SH2 domain, which was postulated to be a reader capable of finding and binding protein partners displaying phosphorylated tyrosine side chains. The SH3 domain was found to be involved in the formation of stable protein sub-complexes by constitutively attaching to proline-rich surfaces on its binding partners. The SH2 and SH3 domains have thus served as the prototypes for a diverse collection of interaction domains that recognize not only proteins but also lipids, nucleic acids, and small molecules. It has also been found that particular SH2 and SH3 domains themselves might also bind to and rely on lipids to modulate complex assembly. Some lipid-binding properties of SH2 and SH3 domains are reviewed here.

**Keywords:** SH2 domain; SH3 domain; Src; protein tyrosine kinase; proline-rich sequences; lipid binding



**Citation:** Sipéki, S.; Koprivanecz, K.; Takács, T.; Kurilla, A.; László, L.; Vas, V.; Buday, L. Novel Roles of SH2 and SH3 Domains in Lipid Binding. *Cells* **2021**, *10*, 1191. <https://doi.org/10.3390/cells10051191>

Academic Editor: Gary S. Goldberg

Received: 29 March 2021

Accepted: 11 May 2021

Published: 13 May 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. 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. Introduction

Every cell must process information from its environment and appropriately respond to any changes. An understanding of the mechanisms that make this possible has long been a goal of biological research. In the three decades since the first reports that modular protein-binding domains interact with plasma membrane receptors and their downstream effectors, it has been established that such domains are involved in almost every corner of signaling in eukaryotes [1]. They allow signaling proteins to assemble into dynamic multiprotein complexes and provide mechanisms to translate one type of intracellular information into other types. For example, they help to convert enzyme-catalyzed chemical modifications of proteins and lipids into alterations in protein-protein interactions and protein subcellular localization [1]. They also drive evolution by providing ways to add new capabilities and connections to existing signaling networks [1].

Sadowski et al. first described a conserved, noncatalytic domain in cytoplasmic protein tyrosine kinases (PTKs), which comprises approximately 100 amino acid residues [2]. Analysis of the v-Fps/Fes cytoplasmic tyrosine kinase identified a region N-terminal to the kinase domain that, while not required for catalytic activity, was involved in the modification of the kinase activity and substrate recognition and was necessary for cellular transformation [2]. This element was termed the Src homology 2 (SH2) domain because this functionally important stretch of amino acids is conserved in Src and Abl tyrosine kinases and similarly positioned next to the kinase (SH1) domain [2]. The SH2 domain was defined as a reader responsible for the regulated assembly of signaling complexes



FORUM REVIEW ARTICLE

## Vitamin C and Cell Death

András Szarka,<sup>1</sup> Orsolya Kapuy,<sup>2</sup> Tamás Lőrincz,<sup>1</sup> and Gábor Bánhegyi<sup>2</sup>

### Abstract

**Significance:** Persistent oxidative stress is a common feature of cancer cells, giving a specific weapon to selectively eliminate them. Ascorbate in pharmacological concentration can contribute to the suspended formation of hydroxyl radical *via* the Fenton reaction; thus, it can be an important element of the oxidative stress therapy against cancer cells.

**Recent Advances:** The main components of ascorbate-induced cell death are DNA double-strand breaks *via* the production of hydroxyl radical and ATP depletion due to the activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1. Presumably, DNA damage can be the primary contributor to the anticancer activity of pharmacological ascorbate, as opposed to the rupture of bioenergetics. The caspase independency of high-dose ascorbate-induced cell death proposed the possible involvement of several types of cell death, such as ferroptosis, necroptosis, and autophagy.

**Critical Issues:** Ascorbate can target at least two key molecular features of cancer cells as a part of the anticancer therapy: the intrinsic or acquired resistance to cell death and the dysregulated metabolism of cancer cells. It seems probable that different concentrations of ascorbate alter the nature of induced cell death. Autophagy and necroptosis may play a role at intermediate concentrations, but caspase-independent apoptosis may dominate at higher concentrations. However, ascorbate behaves as an effective inhibitor of ferroptosis that may have crucial importance in its possible clinical application.

**Future Directions:** The elucidation of the details and the links between high-dose ascorbate-induced cancer selective cell death mechanisms may give us a tool to form and apply synergistic cancer therapies. *Antioxid. Redox Signal.* 34, 831–844.

**Keywords:** cell death, pharmacological ascorbate, reactive oxygen species, cancer therapy

### Introduction

ASCORBATE AS A water-soluble antioxidant plays an integral part in the cellular oxidative metabolism, as it efficiently scavenges reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species produced under various stress conditions (72). Ascorbate has important role in the reduction of the tocopheroxyl radical to tocopherol; tocopherol-mediated protection against lipid peroxidation could be significantly enhanced by the presence of ascorbate (and glutathione) (25, 69). Furthermore, ascorbate is an essential cofactor for multiple enzymes involved in the biosynthesis of carnitine (39) and catecholamines (7).

Ascorbate also maintains the catalytic activity of various Fe(II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases during the post-translational modification and folding of extracellular matrix proteins such as collagen (67). In this regard, it was also shown that ascorbate can upregulate procollagen mRNA transcription primarily by stabilizing the mRNA transcript (55, 70). In another aspect of protein folding, it is presumed that ascorbate has an important role during disulfide bond formation in the lumen of the endoplasmic reticulum (67).

Additional involvement of ascorbate in epigenetic regulation was found in specific histone lysine demethylases (termed JmjC-domain-containing histone demethylases) and DNA 5-methyl-cytosine hydroxylases (termed TET1–3),

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Applied Biotechnology and Food Science, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary.

<sup>2</sup>Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

Article

# Rapid Identification of Potential Drug Candidates from Multi-Million Compounds' Repositories. Combination of 2D Similarity Search with 3D Ligand/Structure Based Methods and In Vitro Screening

Katalin Szilágyi <sup>†</sup>, Beáta Flachner <sup>†</sup>, István Hajdú , Mária Szaszko, Krisztina Dobi, Zsolt Lőrincz, Sándor Cseh and György Dormán <sup>\*</sup>

TargetEx Ltd., Madách I. u. 31/2, 2120 Dunakeszi, Hungary; szilagyi@target-ex.com (K.S.); flachner@target-ex.com (B.F.); hajdu@target-ex.com (I.H.); szaszko@target-ex.com (M.S.); dobi@target-ex.com (K.D.); lorincz@target-ex.com (Z.L.); cseh@target-ex.com (S.C.)

<sup>\*</sup> Correspondence: dorman@target-ex.com

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Szilágyi, K.; Flachner, B.; Hajdú, I.; Szaszko, M.; Dobi, K.; Lőrincz, Z.; Cseh, S.; Dormán, G. Rapid Identification of Potential Drug Candidates from Multi-Million Compounds' Repositories. Combination of 2D Similarity Search with 3D Ligand/Structure Based Methods and In Vitro Screening. *Molecules* **2021**, *26*, 5593. <https://doi.org/10.3390/molecules26185593>

Academic Editor: Martin Vogt

Received: 10 August 2021

Accepted: 11 September 2021

Published: 15 September 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. 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/>).

**Abstract:** Rapid in silico selection of target focused libraries from commercial repositories is an attractive and cost-effective approach in early drug discovery. If structures of active compounds are available, rapid 2D similarity search can be performed on multimillion compounds' databases. This approach can be combined with physico-chemical parameter and diversity filtering, bioisosteric replacements, and fragment-based approaches for performing a first round biological screening. Our objectives were to investigate the combination of 2D similarity search with various 3D ligand and structure-based methods for hit expansion and validation, in order to increase the hit rate and novelty. In the present account, six case studies are described and the efficiency of mixing is evaluated. While sequentially combined 2D/3D similarity approach increases the hit rate significantly, sequential combination of 2D similarity with pharmacophore model or 3D docking enriched the resulting focused library with novel chemotypes. Parallel integrated approaches allowed the comparison of the various 2D and 3D methods and revealed that 2D similarity-based and 3D ligand and structure-based techniques are often complementary, and their combinations represent a powerful synergy. Finally, the lessons we learnt including the advantages and pitfalls of the described approaches are discussed.

**Keywords:** 2D similarity search; virtual screening; pharmacophore matching; 3D modelling; in vitro screening

## 1. Introduction: The Emergence of Virtual Screening

Virtual screening (VS) has become a popular technique [1] since it was expected to reduce the synthesis and biological screening cost and shorten the life cycles of the discovery phases. Over the past two decades, huge compound repositories were built exploiting historical collections as well as compound libraries. At the same time, the cheminformatics methods have developed rapidly and the computational power increased, allowing fast or real time calculations. In addition, deeper knowledge has been developed about the small molecule–protein interactions using state-of-the-art X-ray crystallography, docking, and 3D modelling [2]. The major elements and the most important VS approaches are shown in Figure 1. The in vitro screening of the focused libraries often result in a many fold increase in the hit rate compared with random screening of commercial libraries [3,4].



## The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome

Tamás Takács<sup>1</sup> · Gyöngyi Kudlik<sup>1</sup> · Anita Kurilla<sup>1</sup> · Bálint Szeder<sup>1</sup> · László Buday<sup>1,2</sup> · Virag Vas<sup>1</sup>

Published online: 9 July 2020  
 © The Author(s) 2020

### Abstract

The genetic alterations in cancer cells are tightly linked to signaling pathway dysregulation. Ras is a key molecule that controls several tumorigenesis-related processes, and mutations in RAS genes often lead to unbiased intensification of signaling networks that fuel cancer progression. In this article, we review recent studies that describe mutant Ras-regulated signaling routes and their cross-talk. In addition to the two main Ras-driven signaling pathways, i.e., the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways, we have also collected emerging data showing the importance of Ras in other signaling pathways, including the RAC/PAK, RalGDS/Ral, and PKC/PLC signaling pathways. Moreover, microRNA-regulated Ras-associated signaling pathways are also discussed to highlight the importance of Ras regulation in cancer. Finally, emerging data show that the signal alterations in specific cell types, such as cancer stem cells, could promote cancer development. Therefore, we also cover the up-to-date findings related to Ras-regulated signal transduction in cancer stem cells.

**Keywords** Mutant Ras protein · Signal transduction · Phosphorylation · Tumorigenesis

### 1 Introduction

Since the discovery of Ras as a key regulator of retrovirus-induced cell proliferation, a massive scientific effort has been devoted to identifying its critical roles in biology, especially in oncogenesis. Ras proteins are specialized guanine nucleotide-binding and hydrolyzing molecules that belong to the small G-protein superfamily [1]. The human genome contains three highly related RAS genes, namely, KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), and HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), which encode four highly homologous proteins, namely, H-Ras, K-Ras4A and K-Ras4B (two splice variants of K-Ras), and N-Ras. Ras proteins have a molecular weight of approximately 21 kDa, and each contains a soluble catalytic G-domain and a C-terminal flexible hyper-variable region (HVR) (Fig. 1.)

The majority of the mutations in RAS genes that lead to oncogenic events are single-base substitutions in well-

described positions in the G-domain. The most frequent oncogenic mutational hotspots are at codons 12, 13, and 61 in all four Ras isoforms. Less frequently, other codons in RAS genes are also affected by mutations, as summarized in Table 1. Oncogenic mutations in the G-domain allow Ras protein to constitutively activate downstream effectors. Interestingly, the different amino acid substitutions in the mutational hotspots distinctly alter the GTPase function of Ras and its interactions with signaling molecules. Moreover, mutant Ras proteins differently activate the RAF/MEK/ERK kinase cascade and other non-canonical downstream signaling molecules. The interdependence and cross-talk of downstream effectors regulated by mutant Ras proteins and recent advances in understanding the broad spectrum of the effects of Ras in cell biology are discussed here.

### 2 Structural basis of wild-type and mutant Ras activation kinetics

Several studies have demonstrated that the Ras protein level is elevated in cancer tissues and that increased Ras expression is correlated with poor prognosis [32, 33]. As the mechanisms regulating Ras protein level have significant pathological implications, the factors and signaling pathways influencing the stable and unstable degradable forms of Ras are possible determinants of cancer progression. Ras stability depends on the

✉ Virag Vas  
 vas.virag@ttk.hu

<sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Budapest, Hungary

<sup>2</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary

## PHD DISSZERTÁCIÓK BEMUTATÁSA BEHARANGOZÓ

Szenior kutatóként tisztában vagyok vele – s azt gondolom, a kísérletes munkát végző kutatótársaim nevében is állíthatom ezt –, hogy a szakmai eredményeim, eredményeink nem születhettek volna meg azok nélkül a doktoranduszok nélkül, akikkel együtt dolgozhattam, dolgozhattunk. Az utánpótlás, a fiatal munkatársak tehetsége és szorgalma a tudományos haladás egyik legfontosabb előmozdítója. Az utánpótlásnevelés legfelsőbb szintje intézményes formában a doktori iskolákban folyik, amely lezárásaként a doktoranduszoknak önálló kutatómunkájuk eredményeit egy disszertációban kell összefoglalniuk és azt egy tudós grémium előtt bemutatniuk. Amennyiben ezt sikerrel teljesítik, elnyerik a *Philosophiæ Doctor* (PhD) címet.

A középkori alapokon nyugvó, a mai értelemben a tudományos életpályára lépést szentesítő doktori fokozatot először az 1800-as években a berlini Humboldt (akkori nevén Friedrich-Wilhelm) Egyetemen adták át, majd a 20. század elejétől az angolszász országok vezették be, ma pedig az egész világon ugyanazt jelenti - a birtokosa hiteles kutatóként vehet részt a tudományok művelésében. Magyarországon 1993 óta a PhD az egyedüli tudományos fokozat, amelyet egyetemek jogosultak kiállítani, s az élettudományok területén jelenleg hat doktori iskolában lehet megszerezni.

Szabad legyen itt néhány statisztikai adattal bemutatni, hogy a magyar élettudományi kutatóközösség derékhadához a kezdetektől számítva az egyes doktori iskolák hány PhD fokozat kiállításával járultak hozzá (az adatok a <https://doktori.hu> weboldalról származnak; a 28 év összesített száma 1980):

- Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Debreceni Egyetem: 209
- Biológia Doktori Iskola, Eötvös Loránd Tudományegyetem: 707
- Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola, Pázmány Péter Katolikus Egyetem: 102
- Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola, Pécsi Tudományegyetem: 118
- Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem: 301
- Biológia Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem: 475
- Biológiai tudományi Doktori Iskola, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem: 78

A Biokémia folyóirat szerkesztőbizottságában felmerült, hogy a bárki számára

élőben meghallgatható, de korlátozott nyilvánosságú doktori védések és a szintén nem túl széles körben olvasott doktori disszertációk mellett egy új rovat keretében teremtsünk lehetőséget a kutatói pályára álló, a tudományos fokozatukat éppen megszerző fiatalok számára az eredményeik rövid formában történő bemutatására. Ugyan készül minden értekezés mellé egy téziszfüzet, de úgy gondoljuk, hogy egy pár oldalas, illusztrációkkal ellátott összefoglaló közlésével szélesebb nyilvánossághoz jutnak a tudomány jövőjét képviselő fiataljaink.

A rovat gondozását e sorok írója vállalta el, aki maga is egy doktori iskolát vezet (ELTE, BDI), és úgy érezte, hogy a doktoranduszok is örömmel veszik, ha „disszemináljuk” az eredményeiket. A rovat első jelentkezésekor, a jelen számban az ELTE Biológia Doktori Iskola négy, 2021-ben fokozatot szerzett doktorandusza mutatja be röviden az eredményeit.

A jövőt tekintve a ELTE végzett doktoranduszait én kérem fel az összefoglalók megírására. **Bíztatok minden, a Biokémiát olvasó doktori témavezetőt, hogy kérjék meg doktoranduszaikat, hogy éljenek ezzel a lehetőséggel, és kérek minden PhD védéshez közeledő doktorandusz olvasónkat is, hogy küldjenek nekem összefoglalókat a disszertációjukban bemutatott eredményeikről.**

A kéziratokat, a Biokémia újság honlapján (<http://mbkegy.hu/apps/mbkegy/pages/index.html#!/ContentById/900>) megtalálható formai követelmények betartásával, az itt közölt első összefoglalókat mintául véve írják meg és küldjék az e-mail címemre ([nyitray@elte.hu](mailto:nyitray@elte.hu)).

**Nyitray László**  
**rovatvezető**



## A NEURONÁLIS PENTRAXINOK, MINT KOMPLEMENT-KÖTŐ PARTNEREK JELLEMZÉSE A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN

**Kovács Réka Ágnes**  
**ELTE, TTK, Biokémiai Tanszék,**  
**ELTE NAP, Neuroimmunológiai Kutatócsoport**  
**ELTE, Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program**  
**e-mail: [koveszreka@gmail.com](mailto:koveszreka@gmail.com)**

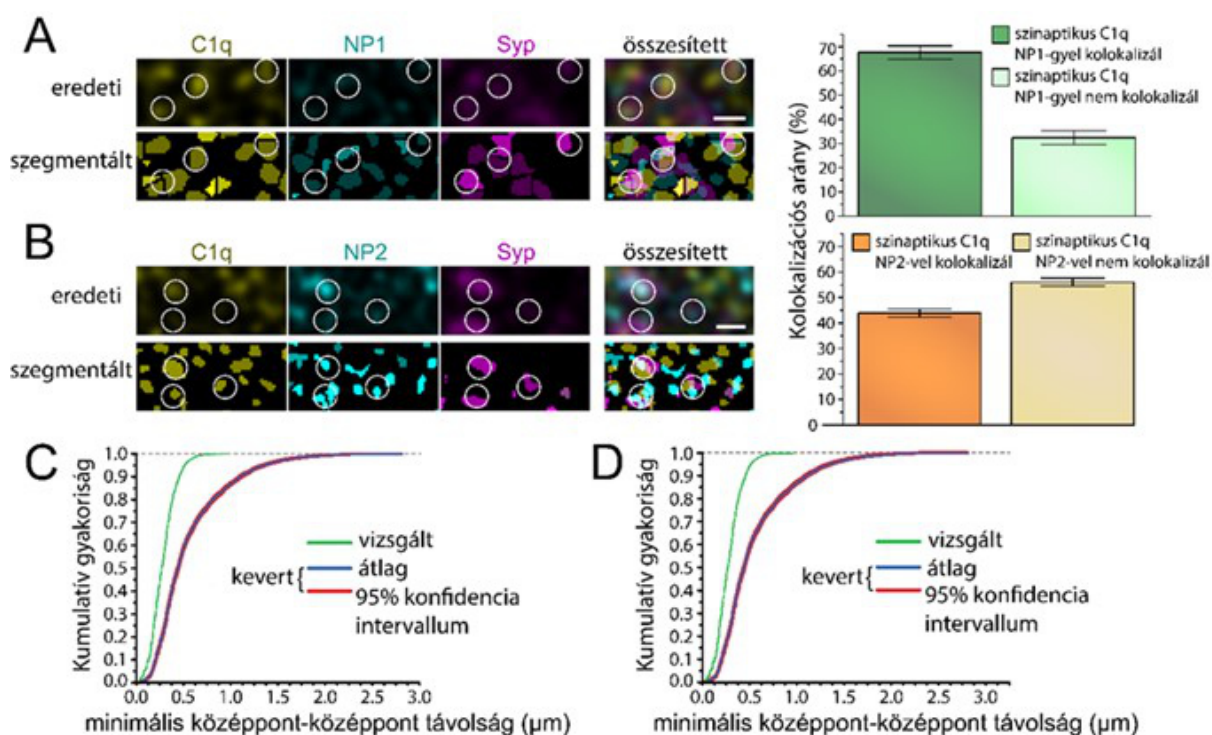
**Témavezetők: Dr. Kardos József és Dr. Kékesi Adrienna Katalin**

Az idegrendszer és az immunrendszer kapcsolatának vizsgálata az ezredfordulón vált igazán népszerű kutatási területté, ekkor látszott megdőlni az az elképzelés, hogy a két rendszer teljesen elkülönül egymástól. Számos tanulmány feltárta a veleszületett immunrendszer elemének, a komplement kaskád komponenseinek korábban nem ismert szerepét az embriogenezis és a központi idegrendszer fejlődésének folyamataiban, ideértve a neuronok proliferációját, a differenciálódási és migrációs mintázatokat, valamint a szinapsziseltávolítás folyamatát. E folyamatok molekuláris mechanizmusainak jobb megismerése érdekében kutatócsoportunk a komplement rendszer klasszikus útvonalának iniciátor fehérjéje, a C1q szerepét vizsgálta a központi idegrendszerben. Doktori munkám fő témája annak igazolása, hogy a neuronális pentraxinok (NP) komplementkötő partnerek, továbbá szerepük vizsgálata a komplement-mediált szinapszisvesztésben. Az NP-k C1q-hoz való kötődése eddig nem volt ismert és vizsgált, hipotézisünk azon alapult, hogy a vérben a C1q ismert kötőpartnerei az NP-khez hasonló pentraxinok. A dolgozatban a központi idegrendszerben jelenlévő komplementrendszer és az NP-k közti kapcsolat *in vitro* és *in vivo* kutatási eredményei kerülnek bemutatásra.

A szinaptikusan megnövekedett mitokondriális ROS-szint és a C1q-jelölés közötti összefüggést vizsgáltuk, hogy kapcsolatot találjunk a mitokondriális diszfunkció és a szinaptikus komplement lerakódása között. Kimutattuk, hogy a szinaptoszómák C1q-val jelölt alpopulációja szinte teljes mértékben pozitív volt a mitokondriális ROS-specifikus festékre, mind a vad típusú, mind az Alzheimer-modell egértörzseknél. Ezenkívül szignifikánsan magasabb C1q akkumulációt tapasztaltunk az idős (24 hónapos) APP/PS1 egerek szinapszisaiban, ami arra utal, hogy a komplementrendszer az agykéregben túlzottan aktiválódik [1].

ELISA esszében kimutattam, hogy a neuronális pentraxinok koncentrációfüggő módon kötnek a komplementrendszer különböző tagjaihoz, a C1q-hoz, a C1-

hez, a H-faktorhoz és a C4BP-hez. Továbbá, sikerült kimutatnom, hogy a pentraxinok szelektíven aktiválják a komplementrendszer klasszikus útvonalát. Az immuncitokémiai festések alátámasztották az NP1 és NP2 fehérjék primer idegsejt kultúrában lévő szinapszissal való kolokalizációját, másrészt feltárták, hogy eloszlásuk az NP1 és NP2 elkülönülő funkciójára utal. Koimmunprecipitációs vizsgálatok során feltártam, hogy az NP1 és a C1q valódi *in vivo* kötőpartnerek lehetnek. Áramlási citometriás mérések megmutatták, hogy a C1q szinte kizárólag az NP1 és NP2 pozitív szinaptoszómák felszínén van jelen. *In vivo* szinaptikus kolokalizációjuk bizonyítására nagyfelbontású immunhisztokémiai kísérleteket terveztem, melyben a szinaptikus C1q ~67%-a és ~44% -a kolokalizálódott az NP1 és az NP2 szinaptikus fehérjékkel, alátámasztva a közvetlen kölcsönhatásukkal kapcsolatos korábbi eredményeimet.

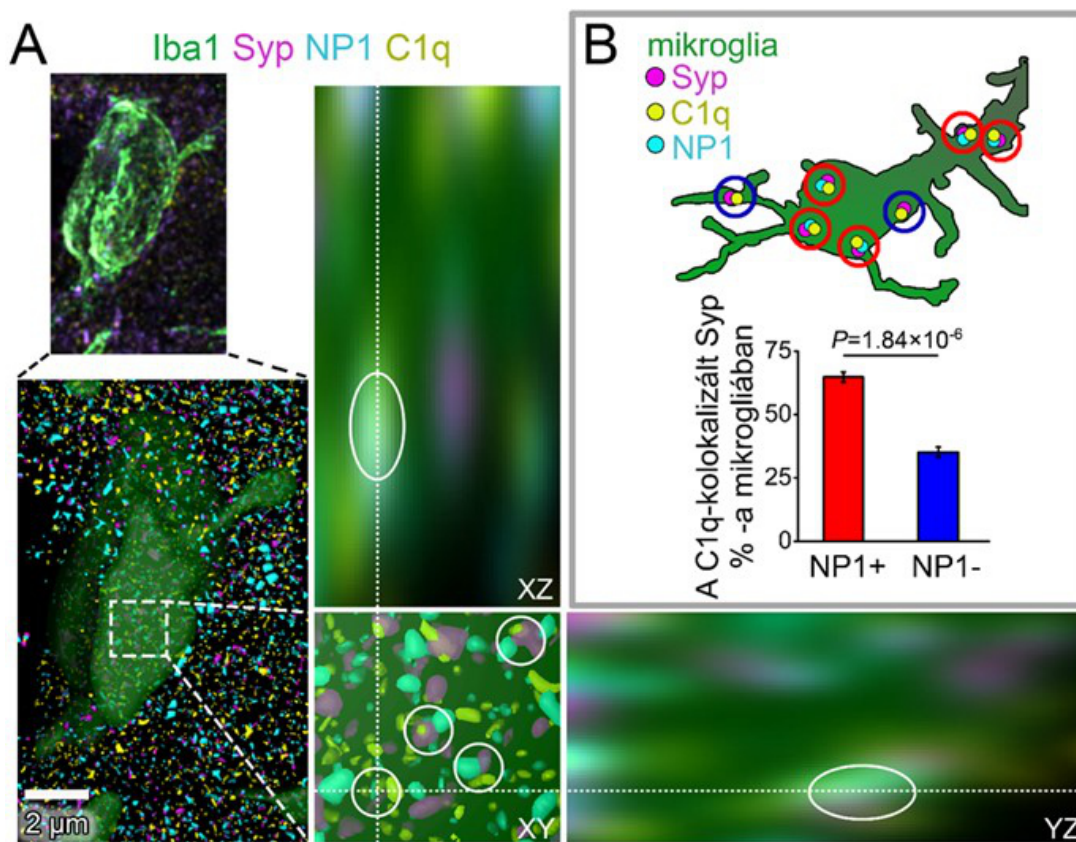


### 1. ábra. A szinaptikus C1q kolokalizációja a NPkkel egér kortikális metszeteken.

**A, B)** A hármas immunfestéssel jelölt agykérgi szakaszok nagy felbontású konfokális mikroszkópos képeit szétválasztottuk az egyes C1q, NP1/2 és Syp foltok azonosítása céljából. A fehér körök számos kolokalizáló szinaptikus C1q és NP1/2 foltot jelölnek, amelyeket az előre meghatározott kritérium alapján automatizálva azonosítottunk. Az elemzések kimutatták a szinaptikus C1q nagymértékű kolokalizációját a szinaptikus NPk-vel, különösen az NP1-gyel. (*t*-teszt eredményei: (NP1)  $P = 2,19007E-10$ , (NP2)  $P = 471338E-06$  normál eloszlású mintákon.) **C, D)** A szinaptikus C1q szoros közelsége az NP1-gyel **C)** és az NP2-vel **D)** nem pusztán annak következménye, hogy a minta sűrűn jelölt. A minimális középpont-középpont távolság kumulált frekvencia-eloszlásának mediánjai szignifikánsan különböznek a megfigyelt és a véletlenszerűen eloszlott minták között ( $P = 0,00019$ , Wilcoxon- post hoc teszt). Átlagok  $\pm$  SEM;  $n = 18$  3D kép 3 egér metszeteiből. Méretskála =  $0,5 \mu\text{m}$ . E) A kolokalizált fehérjék oldalnézete.

A mikroszkópos adatokat kiegészítve, megállapítottam, hogy a szinaptikus NP1

elsősorban a szinaptikus plazmamembrán frakcióban dúsul, míg az NP2 nagy része a szinaptikus citoplazmában található. Valószínűsíthető, hogy az eddig megfigyelt magas számú C1q-val kolokalizált szinaptikus NP1-fehérje elsősorban a szinaptikus felületben helyezkedik el, így fizikai közelségbe képesek kerülni, és kötődhetnek egymáshoz. Feltártam, hogy a mikroglia által körülvevett szinapszisokat kijelölő C1q-molekula elsősorban a NP1-gyel jelölt szinapszisokkal kolokalizál, alátámasztva a hipotézist, hogy a mikroglia túlnyomórészt komplement-függő módon kebelezi be azokat a szinapszisokat, amelyek felületükön NP1-et tartalmaznak.



**2. ábra. Az NP1 jelenléte a mikroglia által fagocitált C1q-címkével ellátott szinapszisokban. A)** Az egér agymetszeteken a mikrogliaikat Iba1-festéssel rekonstruáltuk, és azonosítottuk a fagocitált C1q-val és Syp-pel kolokalizált NP1 foltokat (fehér körök). Az ortogonális nézetek azt mutatják, hogy a mikroglia teljes mértékben körülveszi az egyik NP1-tartalmú, fagocitált, C1q-címkével ellátott szinaptikus anyagot. **B)** A képanalízis megmutatja, hogy a C1q-címkével ellátott mikroglialis Syp fehérjék 64,80 ± 1,97%-a NP1 pozitív is. (Átlagok ± SEM; n = 16 kép 3 egér agymetszetéről rögzítve. A csoportok között szignifikáns különbséget a kétmintás Student-féle párosított t-tesztel azonosítottuk.)

Összességében, eredményeim hangsúlyozzák a neuroimmunológiai kommunikáció szerepét a központi idegrendszer működésében, és további adatokat szolgáltatnak e kölcsönhatások háttérében álló molekuláris mechanizmusokról [2].

**Irodalomjegyzék (a doktori dolgozat alapjául szolgáló közlemények)**

- [1] Györffy, B.A., Tóth, V., Török, G., Gulyássy, P., Kovács, R., Vadászi, H., Micsonai, A., Tóth, M.E., Sántha, M., Homolya, L., Drahos, L., Juhász, G., Kékesi, K.A., Kardos, J. (2020) Synaptic mitochondrial dysfunction and septin accumulation are linked to complement-mediated synapse loss in an Alzheimer's disease animal model. *Cell Mol Life Sci*, **77(24)**: 5243–5258.
- [2] Kovács, R.A., Vadászi, H., Bulyáki, E., Török, G., Tóth, V., Mátyás, D., Kun, J., Hunyadi-Gulyás, E., Fedor, F.Z., Csincsi, A., Medzihradszky, K., Homolya, L., Juhász, G., Kékesi, K.A., Józsi, M., Györffy, B.A., Kardos, J. (2021) Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Front Immunol*, **11**: 599771

# A GÉNEXPRESSZIÓT SZABÁLYOZÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA: EGY SZÖVETSPECIFIKUS ALMA-PROMÓTER ELEMZÉSE ÉS A TRANZLÁCIÓT TERMINÁLÓ FAKTOR AUTOREGULÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA NEUROSPORA CRASSA GOMBÁBAN

**Kurilla Anita**  
**Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági**  
**Biotechnológiai Kutatóintézet, Növényi RNS Biológia Csoport**  
**ELTE, Biológia Doktori Iskola, Genetika Program**  
**e-mail: [kurilla.anita@ttk.hu](mailto:kurilla.anita@ttk.hu)**

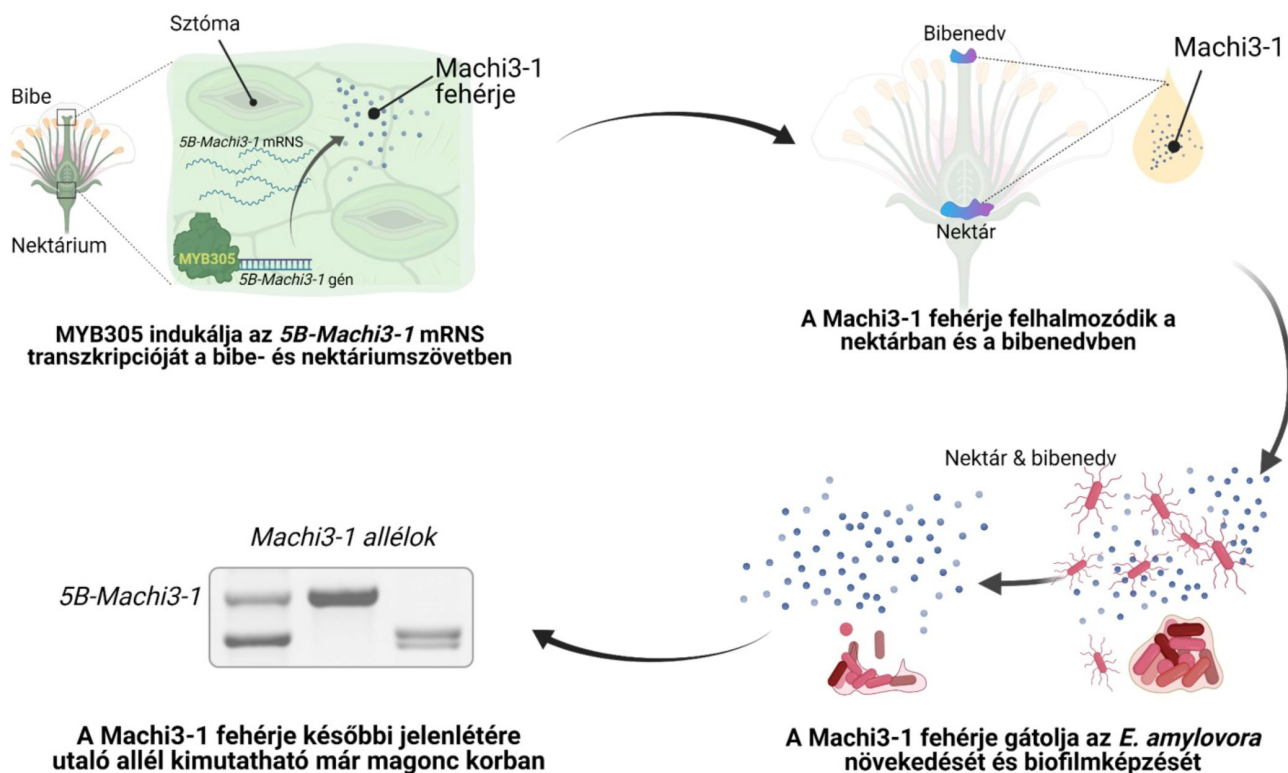
**Témavezető: Dr. Silhavy Dániel**

Az élőlények a génexpresszió pontos szabályozásán keresztül képesek biztosítani a fehérjék mennyiségi és minőségi tulajdonságait, mely nélkülözhetetlen a sejtek megfelelő működéséhez. Doktori munkám során különböző génexpressziót szabályozó mechanizmusokat vizsgáltam. Munkám első részében egy olyan transzkripcióval kapcsolt útvonalat elemeztem, mely egy antimikrobiális hatású növényi fehérje szövetspecifikus felhalmozódását szabályozza. A vizsgált gén szelekciós markerként alkalmazható az almatermésűek tűzelhalás nevű betegség ellenállóságának fejlesztését célzó nemesítési programokban. Doktori munkám másik része egy translációval kapcsolt autoregulációs mechanizmus evolúciójának vizsgálata volt, melyben a transláció befejezésében kulcsszerepet játszó fehérje stabil szintjének fenntartása a saját mRNS-ének destabilizálásán keresztül valósul meg.

## **A transzkripció útvonallal kapcsolatos eredmények – a Machi3-1 fehérje szövetspecifitása**

A tűzelhalás betegséget okozó *Erwinia amylovora* baktérium [1] óriási károkat okoz az almatermésűek termesztésében és a mai napig nincs hatékony védekezési módszer ellene. *Erwinia* rezisztens almafajta nincs, azonban vannak toleráns fajták, melyek nehezebben fertőződnek és enyhébb tüneteket mutatnak. Az ellenállóság fokozása különösen fontos, hiszen az újabb toleranciagének azonosítása és a nemesítésbe történő beépítése megakadályozza a rezisztencia gyakori - baktérium általi - letörésének lehetőségét és biztosítja a hosszabb távú toleranciát. Az *Erwinia* baktérium elsősorban a virágon keresztül fertőz, a kórokozó a bibe felületén megtapadva, majd a nektárba kerülve a nektárréseken képes bejutni a sejtközötti térbe és onnan tovább terjedve elpusztíthatja az egész növényt. A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Gyümölcs Genetikai Csoport korábban kimutatta,

hogy egy savas kitináz fehérje nagy mennyiségben halmozódik fel a toleráns almafajta nektárjában, míg a fogékony fajtákból hiányzik. Célkitűzésem volt megvizsgálni a fehérjét kódoló gén expressziójának szabályozását és szelekciós markerként történő hasznosíthatóságát. Doktori munkám során azonosítottam és jellemeztem egy alma promótert (*5B-Machi3-1*), mely a Machi3-1 (*Malus chitinase* class III.) savas kitináz felhalmozódását okozza egyes almafajták nektárjában és a bibenedvében, mely antimikrobiális hatással rendelkezik. A specifikus expresszióért a gén promóterében található öt ismétlődő régió és az ezeken található MYB305 transzkripciós faktor kötőhelyek felelnek. Eredményeim alapján felállítottam a *Machi3-1* gén expressziós modelljét (1. ábra), melynek lényege, hogy a MYB305 transzkripciós faktor indukálja a gén átírását, majd a képződő Machi3-1 fehérje felhalmozódik a bibenedvben és a nektárban, az *Erwinia* elsődleges fertőzési helyszínein.



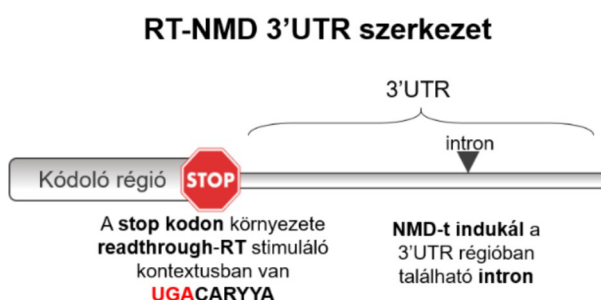
**1. ábra. A szövetspecifikus alma promóter vizsgálata és a Machi3-1 expressziós modellje.** Az *5B-Machi3-1* gén expressziója, a Machi3-1 savas kitináz *Erwinia* ellenes hatása és használhatósága a tűzelhalás toleranciáját célzó nemesítési programokban.

*In vitro* növekedésgátlási és biofilm bontási kísérletekkel igazoltam, hogy a fehérje gátolja a baktérium növekedését és biofilmképzését is, így jelenléte hatékony védekezést biztosít a növény számára. A fejlesztett PCR-marker segítségével pedig már magonc korban kimutatható a későbbi virágzás során

megjelenő Machi3-1 fehérje, így ez egy eddig ismeretlen, alkalmazható toleranciagén a tűzelhalás ellenállóság fejlesztését célzó nemesítési programokban (1. ábra).

### A translációs útvonallal kapcsolatos eredmények – az eRF1 fehérje autoregulációjának evolúciója

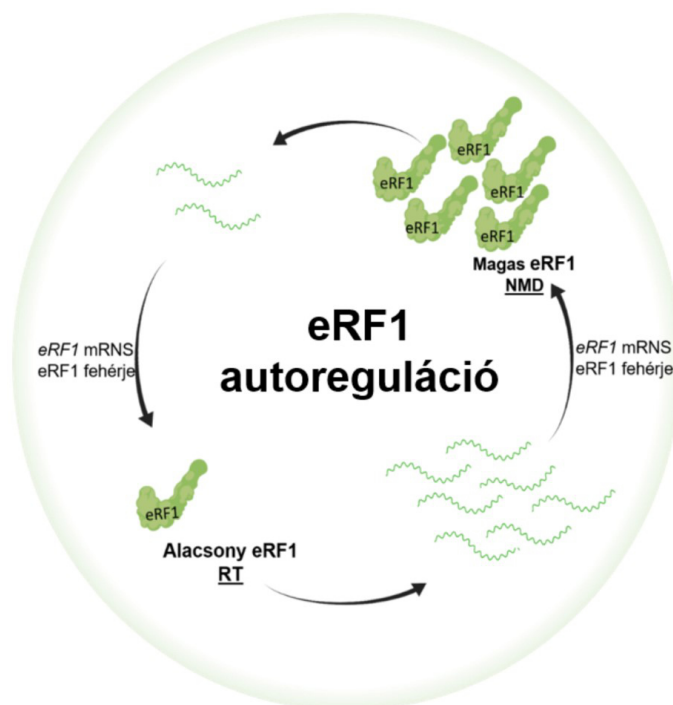
A doktori munkám során vizsgált másik génszabályozási útvonal a transláció folyamatával kapcsolatos. A hibás szerkezetű fehérjék felhalmozódásának megelőzése érdekében számos ellenőrzési rendszer alakult ki az evolúció során. Vannak olyan rendszerek, melyek a hibás mRNS-ek lebontásán keresztül akadályozzák meg az aberráns fehérjék képződését. Ilyen RNS-szintű ellenőrzési útvonal a Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), mely a transláció terminációjával kapcsolatos [2]. Az NMD rendszer bontja le a hibás szerkezetű mRNS-eket, beleértve a 3'UTR régióban intront tartalmazó transzkriptumokat is. Az NMD-vel ellentétesen hat a translációs átolvasás (Readthrough, RT), amely kimentheti az mRNS-t az NMD általi lebontás alól [3]. A termináció, az NMD és az RT egymással kapcsolatos és egymást befolyásoló folyamatok, melyek tehát együttesen képesek finomhangolni a génkifejeződést. Csoportunk korábban igazolta, hogy növényekben e három eseményen keresztül autoregulálódik a transláció befejezéséért felelős eRF1 (eukarióta transláció terminációs faktor 1) fehérje mennyisége [4]. Az autoreguláció alapja az eRF1 fehérjét kódoló mRNS különleges szerkezete, az ún. RT-NMD 3'UTR szerkezet (2. ábra).



**2. ábra. A növényi eRF1 mRNS RT-NMD 3'UTR szerkezete.**

A növényi eRF1 mRNS 3'UTR régiójában található egy NMD-t aktiváló intron, míg a stop kodon RT stimuláló kontextusban van, így a mRNS részben kimenekül az NMD általi lebontás alól. Az eRF1 autoreguláció lényege, hogy az alacsony eRF1 fehérjeszint megnöveli az eRF1 mRNS-en az RT gyakoriságát, - ami így jobban védi az mRNS-t az NMD-től - ezáltal megemelkedik az eRF1 mRNS és az eRF1

fehérje mennyisége. Az eRF1 fehérje koncentráció növekedésének következtében gyakrabban kötődik az *eRF1* mRNS stop kodonjához, így az RT gyakoriság csökken, ami az NMD rendszert aktiválva a transzkriptum lebontását eredményezi. A lecsökkent eRF1 fehérje mennyiségével az autoregulációs körforgás újraindulhat (3. ábra).



**3. ábra. Az *eRF1* autoregulációs mechanizmus modellje.**

Az *eRF1* az egyetlen ilyen szerkezetű mRNS növényekben és minden növényfajban ilyen az *eRF1* mRNS szerkezete. Semmilyen más eukariótában nincs jelen ez a különleges mRNS szerkezet, kivéve a gombák csoportjában, köztük a *Neurospora crassa* fonalas gombában [4]. A kutatás célkitűzése volt, hogy megvizsgáljam az eRF1 fehérje autoregulációs szabályozás alatt áll-e *Neurospora crassa*-ban is. Létrehoztam olyan transzgénikus gombatörzseket, melyek a luciferáz gént és az *eRF1* mRNS 3'UTR bizonyos régióit tartalmazzák. Ezekben a gombatörzsekben egyesével tudtam vizsgálni az autoregulációért felelős régiók (Readthrough stimuláló kontextusban lévő stop kodon, NMD-t indukáló 3'UTR régióban található intron) által okozott expressziós különbségeket. Kvantitatív PCR és luciferáz aktivitás mérési módszerekkel igazoltam, hogy a *N. crassa* *eRF1* mRNS RT-NMD 3'UTR szerkezete funkcionálisan működik a gombában és további kísérletekkel bizonyítottam, hogy ez biztosítja az eRF1 fehérje autoregulációs szabályozását *N. crassa*-ban. Számos gombafaj (124) és gombacsoport (9) *eRF1* mRNS szerkezeteit



megvizsgálva elmondható, hogy az RT-NMD 3'UTR szerkezet az ősbibb gombacsoportokból hiányzik, ami arra utal, hogy ez a különleges mRNS szerkezet és autoregulációs szabályozás konvergens evolúció útján jelent meg, egyszer a növények, egyszer a gombák csoportjában. Az eRF1 fehérje mennyiségének pontos szabályozása nagyon fontos az eukariótákban, így feltételezhetően számos egyéb, az eRF1 szintet szabályozó útvonal alakult ki az evolúció során, melyek egyike az általunk leírt RT-NMD szerkezeten alapuló eRF1 autoregulációs rendszer.

## Zárszó

PhD éveim során – ahogy legtöbb sorstársamnak - nem volt akadálymentes az út, ami a doktori fokozat megszerzéséhez vezetett. Azonban úgy érzem teljes mértékben megérte a küzdelem és az elmúlt évek során eldől számomra, hogy szeretnék a kutatói pályán maradni. Kiemelném Dr. Dallmann Gézát, korábbi mentoromat, aki segített ebben a döntésben. Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Silhavy Dánielnek, aki segítette pályafutásomat és rengeteget tanulhattam tőle. Másrészt hálás vagyok férjemnek, Varga Zoltánnak, aki az elmúlt években töretlenül támogatott. Nem utolsósorban kiemelném Dr. Buday Lászlót és kutatócsoportját, akik nemcsak szakmailag segítettek, de barátságukkal is megtiszteltek és nekik köszönhetően pozitívan kezdek el posztdoktori éveimet az ELKH, TTK, Enzimológiai Intézet Jelátviteli és Funkcionális Genomika Csoportjában.

## A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Kurilla, A., Toth, T., Dorgai, L., Darula, Z., Lakatos, T., Silhavy, D., Kerényi Z. & Dallmann, G. (2020). Nectar-and stigma exudate-specific expression of an acidic chitinase could partially protect certain apple cultivars against fire blight disease. *Planta*, **251(1)**: 20.

Kurilla, A., Szőke, A., Auber, A., Káldi, K., & Silhavy, D. (2020). Expression of the translation termination factor eRF1 is autoregulated by translational readthrough and 3'UTR intron-mediated NMD in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*, **594(21)**: 3504-3517.

## Irodalomjegyzék

[1] Van Der Zwet, T., & Keil, H. L. (1979) Fire blight, a bacterial disease of rosaceous plants. *Agricultural Handbook No. 510*, US Department of Agriculture.

- [2] Lykke-Andersen, S., & Jensen, T. H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature reviews Molecular cell biology*, **16(11)**: 665-677.
- [3] Baker, S. L., & Hogg, J. R. (2017). A system for coordinated analysis of translational readthrough and nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS One*, **12(3)**: e0173980.
- [4] Nyikó, T., Auber, A., Szabadkai, L., Benkovics, A., Auth, M., Mérai, Zs., Kerényi, Z., Dinnyés, A., Nagy, F., Silhavy, D. (2017). Expression of the eRF1 translation termination factor is controlled by an autoregulatory circuit involving readthrough and nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic acids research*, **45(7)**: 4174-4188.

## A MITOGÉN-AKTIVÁLT PROTEIN- (MAP) KINÁZOK NEM-KANONIKUS KÖLCSÖNHATÁSAI: ESETTANULMÁNY AZ ATF2 TRANSZKRIPCIÓS FAKTORRÓL

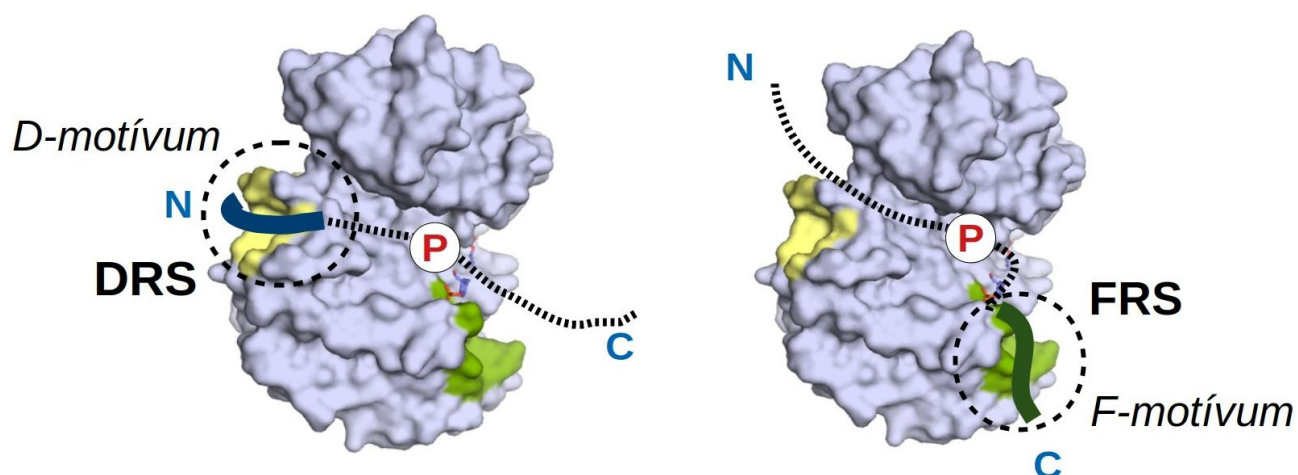
*Pongorné Kirsch Klára*  
*Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet,*  
*Biomolekuláris Kölcsönhatások Kutatócsoport*  
*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,*  
*Szerkezeti Biokémia Program*  
*e-mail: [klarakirsch4@gmail.com](mailto:klarakirsch4@gmail.com)*

**Témavezető: Dr. Reményi Attila**

A mitogén-aktivált proteinkinázok (MAPK) nélkülözhetetlen szereplői az emberi jelátviteli hálózatoknak, például a növekedési faktorokra vagy éppen a környezeti stresszre adott válaszokban is fontos közvetítő szerepük van. MAPK-ok (ERK1/2, p38, JNK and ERK5-kinázcsaládok) egy többszintű enzimkaszád alsó szintjét alkotják és aktiválódásuk után szubsztrátjaikat S/TP motívumon (Ser/Thr-Pro konszenzus szekvencia) foszforilálják. A foszforiláció hatására megváltozhat a szubsztrát enzimaktivitása (pl. szubsztrát-kinázok esetén) vagy kötődési erőssége más molekulákhoz (pl. az ún. foszfokapcsolók a transzkripciós faktorokban). Szubsztrátjaik és egyéb partnerfehérjék specifikus felismerésére a MAP-kinázok különálló fehérje-fehérje kölcsönhatási árkokat (DRS és FRS) használnak, amelyek meghatározott konszenzus szekvenciával rendelkező lineáris motívumokat (D- és F-motívum) kötnek (1. ábra). Ezek a klasszikus vagy **kanonikus** kölcsönhatások határozzák meg a MAP-kináz interakciójának jelentős részét. A klasszikus D-motívum-DRS interakciók szabályszerűségeinek leírásához kutatócsoportunk is jelentősen hozzájárult az utóbbi évtizedben, szerkezeti biológiai és bioinformatikai módszerekkel [1, 2]. Egy másik dokkoló árok az FxFP-motívumokat (Phe-X-Phe-Pro konszenzus szekvencia) ismeri fel (FRS), aminek különlegessége, hogy a kináz aktivált formája esetén lesz hozzáférhető. Az F(xFP)-motívum-FRS kölcsönhatás szerkezeti szempontból kevésbé ismert. Az irodalomban található olyan **nem-kanonikus** eseteket (eddig kb. egy tucat szerkezeti biológiai módszerrel karakterizált példát ismerünk), ahol a fehérje-fehérje komplex kialakulása egyedi, és nem jósolható meg az aminosavszekvencia alapján. Részletesen leírt példa a nem-kanonikus esetekre az ERK5-MKK5 komplex, ahol a kötődési erősség és a specificitás növelése érdekében egy extra domén-domén kölcsönhatás együttműködik a DRS-kötő lineáris motívummal [3]. Érdekes módon, még a mai napig található olyan széleskörűen tanulmányozott MAPK-szubsztrátokat, melyek kötődésének és aktiválódásának mechanizmusa nem

ismert.

A doktori munkám fókuszába egy ilyen vélhetően nem-kanonikus MAPK-szubsztrátot, az ATF2 (Activating transcription factor 2) transzkripciós faktort vizsgáltam. Az ATF2-ről ismert, hogy mind a JNK, mind a p38 útvonal transzkripciós válaszában egyik fontos mediátora, a transzaktivációért felelős TAD doménjén található T69/T71 foszfokapcsolón keresztül [4]. Kíváncsiak voltunk, hogy hogyan lehetséges, hogy az ATF2 foszfokapcsolót két MAPK is hatékonyan szabályozza, és hogy mi lehet a specifikus kölcsönhatásaik szerkezeti alapja.

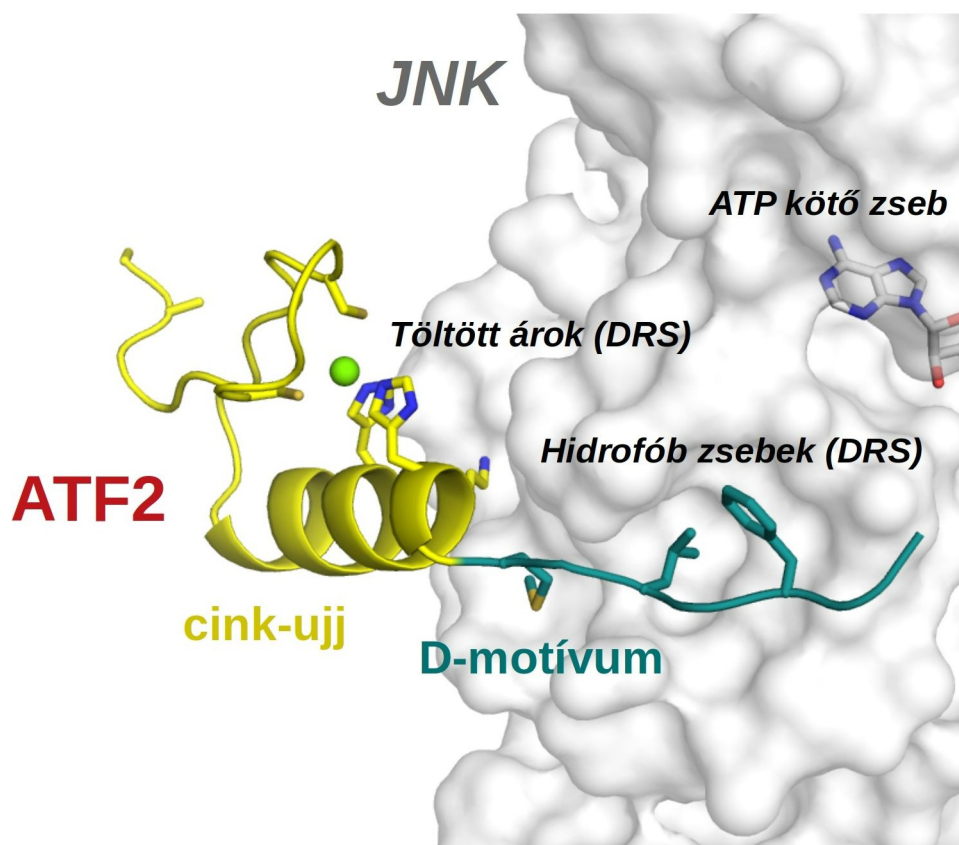


**1. ábra. Fehérje-fehérje interakciós árkok a MAP kináz felszínén.** A DRS és FRS árkok kanonikus módon rendezetlen fehérjeszakaszokat kötnek, melyek a foszforilációs helytől 10-30 aminosav távolságra helyezkednek el. Ezek az interakciók a közelség indukálta katalízis elve alapján segítik elő a foszforilációs hely aktiválását.

Az ATF2 TAD-doménjét és a MAP-kinázokkal való kölcsönhatását különböző biofizikai és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk, mint például fluoreszcencia polarizáció (FP), izotermális titrációs kalorimetria (ITC), heteronukleáris egykvantum koherencia (HSQC) NMR-spektroszkópia és kináz aktivitási tesztek. A fehérjeszerkezeti információkhoz *in silico* modellezéssel (HADDOCK 2.2 szoftver) és krisztallográfiával jutottunk. A fehérje-fehérje kölcsönhatás sejten belüli követésére YFP- és luciferáz-alapú fragmens komplementációs mérési módszereket használtunk. A különböző MAPK-kötőrégiók hatását az ATF2 transzaktivációs képességére GAL4-alapú riporter assay-ben vizsgáltuk. Az ATF2 útvonal szabályalapú modellezését BioNetGen környezetben végeztük közös differenciálegyenletek (ODE) segítségével.

Eredményeim alapján elmondhatjuk, hogy az ATF2 a JNK-val és a p38-cal különbözőképpen és nem-kanonikus módon hat kölcsön. Bizonyítottuk, hogy a

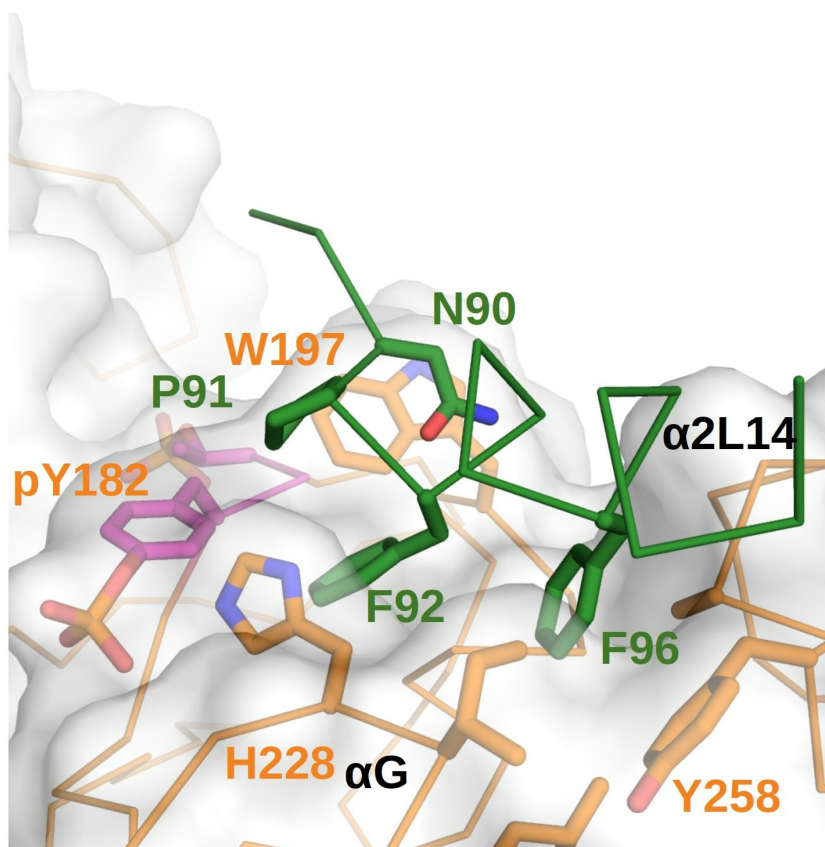
minimális JNK kötőrégióknak tartalmaznia kell a D-motívummal részlegesen átlapoló kis cink-ujj domént is és meghatároztuk a komplex kristályszerkezetét (2. ábra, PDB ID: 6ZR5). Biokémiai és szerkezeti adataink alapján arra következtettünk, hogy a cink-ujj szerepe főként a kötődés entrópikus költségének a csökkentése, ráadásul a cink-ujj jelenléte növeli a motívum JNK-specifitását, mivel azt találtuk, hogy a cink-ujj csökkenti a p38 kötést.



**2. ábra.** Az ATF2 minimális kötőrégiójának JNK1-el alkotott kristályszerkezete. Az ATF2 D-motívumának bázikus lizin aminosava nem-kanonikus módon, a szerkezettel rendelkező cink-ujj részeként kötődik a DRS-hez.

Kimutattunk az ATF2 TAD-en egy másik motívumot, az FRS-kötő F-motívumot, amely az aktivált p38-al való kölcsönhatáshoz nagyban hozzájárul, és a D-motívummal együtt bipartikus módon köti a p38-at. Az ATF2 F-motívum (FENEF) peptid használatával sikerült meghatároznunk az első röntgenszerkezetet a MAPK FRS-árok + F-motívum kötődésről, amely azt is megmagyarázza, hogy miért függ ez a típusú kölcsönhatás a kináz foszforilációs állapotától (3. ábra, PDB ID: 6ZQS). Az ATF2 F-motívum (FENEF) szekvenciája nem egyezik a kanonikus FxFP motívum konszenzussal, ennek ellenére a két fenilalanin az FxFP motívum esetén a jósaltakhoz hasonlóan foglalja el az FRS hidrofób árkat. Ez azért lehetséges, mert a FENEF peptid kötött állapotban hélixet képez, ráadásul

a kristályszerkezet azt sugallja, hogy egy p38-ra specifikus aminosav stabilizálja a hélixet az N-terminális sapka felől.

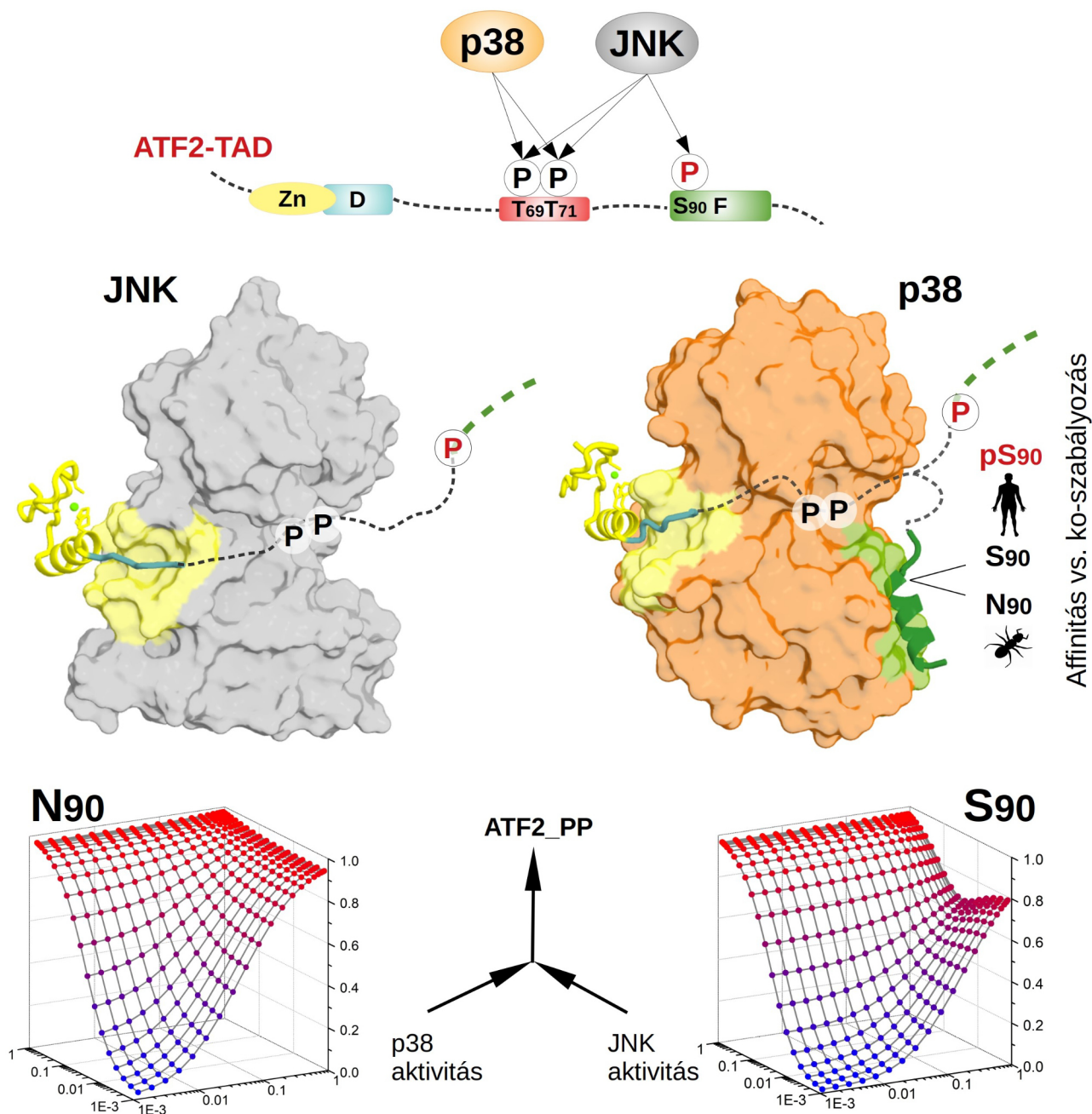


**3. ábra.** Az ATF2 FENEF motívum (zöld) és a foszforilált p38 (sárga) komplexe. A kötött állapotban helikális peptid két fenilalaninja a pp-p38 FRS árkat tölti ki, míg a N90-es hélix-sapka aminosavat a p38-ra specifikus W197 támasztja.

Az evolúciós konzerváltsági analízisünk alapján azt figyeltük meg, hogy a gerincesekben egy szerin található a FENEF peptid hélix-sapka pozíciójában, míg a gerinctelenekben ez mindig aszparagin. Az aszparagin a szerinhez képest erősebb kötődést jelent, míg a szerin foszforilációja a JNK által meggátolja a p38-hoz való kötődést. Az evolúciós adatokból úgy tűnik, hogy az ATF2-TAD egyszerű p38-függő szabályozása után, a JNK-val való együttes szabályozás jelent meg a gerinctelenekben, majd a gerincesekben még komplexebb folyamattá fejlődött tovább a hélix-sapka foszfo-szabályozása miatt.

Ezután feltártuk, hogy miként reagál az ATF2-TAD foszfokapcsoló a JNK és p38 jelpályák különböző aktivitásaira gerinces és gerinctelen állatokra jellemző architektúrák esetében. GAL4-alapú transzaktivációs mérés segítségével kimutattuk, hogy a JNK és a p38 aktivitása is képes befolyásolni az ATF2 transzaktivációs képességét a különálló kötőhelyek miatt. Létrehoztunk egy

mechanisztikus, szabályalapú *in silico* modellt a JNK-p38-ATF2 útvonalról és megjósoltuk az ATF2 TAD foszforilációs szintjét különböző aktivált JNK és p38 fluxusok mellett. Számításainkból úgy tűnik, hogy az ATF2 TAD nem csupán integrálja a JNK és p38 felől érkező jeleket, hanem a két MAPK-jelpálya relatív erősségét is képes érzékelni a gerincesekben (4. ábra).



**4. ábra. Az ATF2 transzaktivációs doménjének foszfo-szabályozása.** Az ATF2 cink-ujj+D-motívum modulja a JNK DRS-t köti. Az aktív p38 esetén bipartikus kölcsönhatás jön létre egy F-motívum segítségével, feltéve ha a 90. aminosav nem foszforilált. A kötődési esemény során a JNK és p38 aktiválja a transzaktivációhoz szükséges T69/T71 foszfokapcsolót. A foszfokapcsoló eltérő mértékben reagál gerinces (S90) és gerinctelen (N90) állatokban különböző JNK és p38 bemenetek hatására.

Utóbbinak az alapja egy aminosav csere a hélix-sapka pozícióban. Sajnos, ennek a komplex szabályozásnak még nem ismerjük a biológiai jelentőségét, de rendszerszintű (pl. transzkriptomikai) tanulmányokkal valószínűleg magyarázatot kaphatnánk arra, hogy az ATF2 TAD miképpen határozza meg a transzkripciót különböző sejtes környezetekben.

### A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Kirsch, K., Zeke, A., Tőke, O., Sok, P., Sethi, A., Sebő, A., Kumar, G. S., Egri, P., Póti, Á. L., Gooley, P., Peti, W., Bento, I., Alexa, A., Reményi, A. (2020) Co-regulation of the transcription controlling ATF2 phosphoswitch by JNK and p38. *Nature Communications*, **11(1)**: 5769.

Zeke, A., Bastys, T., Alexa, A., Garai, Á., Mészáros, B., Kirsch, K., Dosztányi, Z., Kalinina, O. V, Reményi, A. (2015) Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *Molecular Systems Biology*, **11(11)**: 837.

### Irodalomjegyzék

- [1] Garai, Á., Zeke, A., Gógl, G., Törő, I., Fördős, F., Blankenburg, H., Bárkai, T., Varga, J., Alexa, A., Emig, D., Albrecht, M., Reményi, A., (2012) Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Science Signaling*, **5(245)**: ra74.
- [2] Zeke, A., Bastys, T., Alexa, A., Garai, Á., Mészáros, B., Kirsch, K., Dosztányi, Z., Kalinina, O. V, Reményi, A. (2015) Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *Molecular Systems Biology*, **11(x111)**: 837.
- [3] Glatz, G., Gogl, G., Alexa, A., Remenyi, A, (2013) Structural Mechanism for the Specific Assembly and Activation of the Extracellular Signal Regulated Kinase 5 (ERK5) Module. *The Journal of biological chemistry*, **288(12)**: 8596–8609.
- [4] van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A, Herrlich, P., Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *The EMBO journal*, **14(8)**: 1798–1811.



## TUMORSZUPPRESSZOR HOMOLÓGOK FEJLŐDÉSGENETIKAI ELEMZÉSE *CAENORHABDITIS ELEGANS* MODELLORGANIZMUSBAN

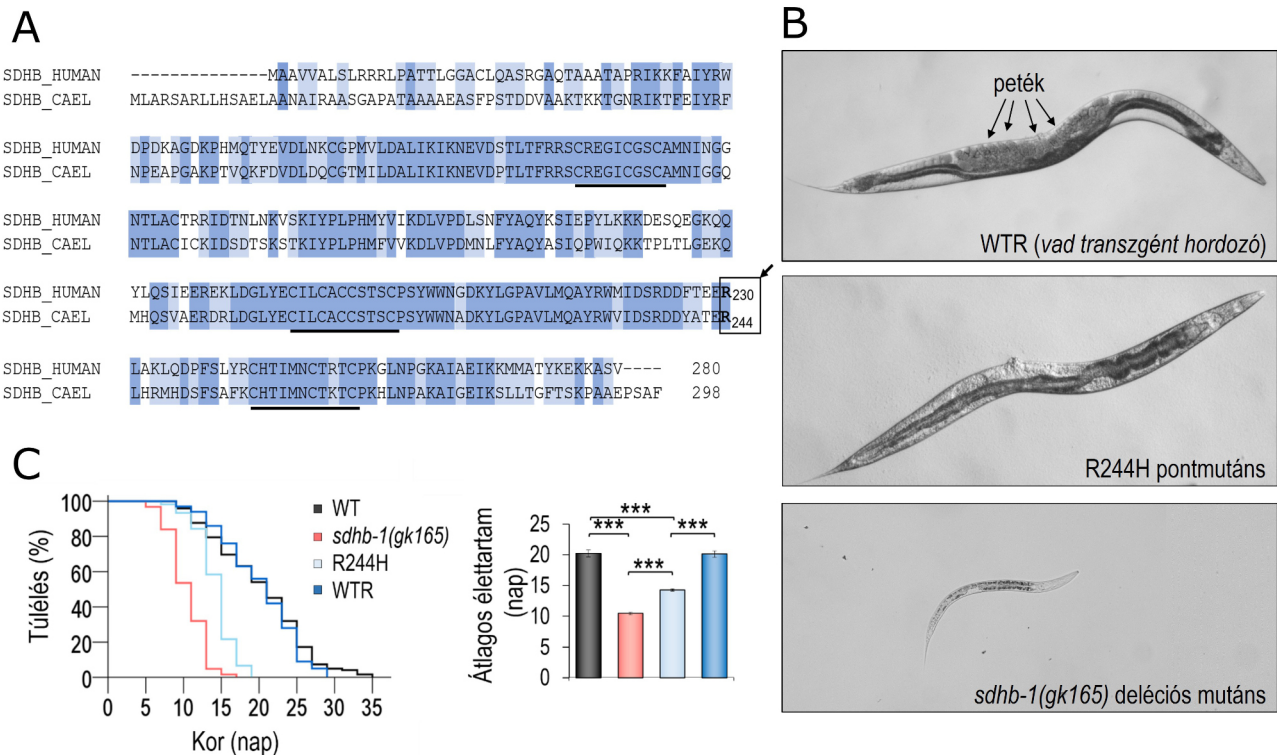
**Saskői Éva**  
**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet,**  
**Embertani Tanszék**  
**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,**  
**Genetika Program**  
**e-mail: [saskoievi@gmail.com](mailto:saskoievi@gmail.com)**

**Témavezető: Vellainé Takács Krisztina**

A daganatos megbetegedések világszerte súlyos közegészségügyi problémát jelentenek, ez a második vezető halál ok a szív- és érrendszeri megbetegedések után. Míg 1990-ben a világon 5,7 millió ember halt meg rákban, addig ez a szám 2020-ban közel 10 millióra emelkedett [1]. A molekuláris rákkutatás alapja az olyan génmutációk azonosítása, amelyek proto-onkogéneket vagy tumorszuppresszorokat érintenek, és nagymértékben hozzájárulnak a tumorsejtek növekedéséhez és túléléséhez. Kutatásom során vizsgált gének homológjai a daganatos megbetegedés két különböző mechanizmusában vesznek részt: az *sdhb-1* homológ *SDHB* elsősorban a tumor metabolizmusban, míg az *ndk-1* homológ *NM23-H1/H2* az áttétképződésben tölt be fontos szerepet.

Az *SDHB* a mitokondriális légzési lánc II. komplexének, vagy másnéven a szukcinát-dehidrogenáznak egyik alegysége. A szukcinát-dehidrogenáz (*SDH*) a citromsav-ciklus részeként a szukcinátot fumaráttá alakítja, míg az elektrontranszportlánc részeként az ubikinon ubikinollá történő redukcióját katalizálja [2]. A négy alegységből álló *SDH* enzimkomplexet kódoló gének (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* és *SDHD*) mutációi két ritka neuroendokrin tumor, a pheochromocytoma és paraganglioma (PPGL) kialakulására hajlamosítanak. A pheochromocytoma a mellékvese velőállomány kromaffin sejtjeinek daganata, míg a paraganglioma az autonóm idegrendszer extraadrenális szimpatikus és paraszimpatikus paraganglionjaiból eredeztethető tumor [3]. A PPGL-ek prognózisa rendkívül rossz (metasztatikus PPGL-ek ötéves túlélési aránya kevesebb mint 50%), és hatékony kemoterápiás módszer jelenleg nem áll rendelkezésünkre [4]. Míg az emberben az *SDHA*, *SDHC* és *SDHD* mutációk főként jóindulatú daganatokhoz vezetnek, addig a B alegységet kódoló gén mutációi gyakran örökletes malignus tumorok kialakulására hajlamosítanak [5]. Az *SDHB* mutációk hatására aktiválódott molekuláris mechanizmusok és onkogén útvonalak feltérképezése elősegítheti az új, célzott terápiák

kidolgozását, amelyek segítséget nyújthatnak a rosszindulatú PPGL-ek kialakulásának megelőzésében, illetve kezelésében. A PPGL daganatok hátterében húzódo mechanizmusok jobb megértése érdekében létrehoztunk egy *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) modellt, amelynek erősen konzervált ortológjában, az SDHB-1-ben a klinikailag releváns Arg230His missense mutációnak megfelelő Arg244His (R244H) mutációt (kódoló régió G731A pontmutációja) állítottuk elő.

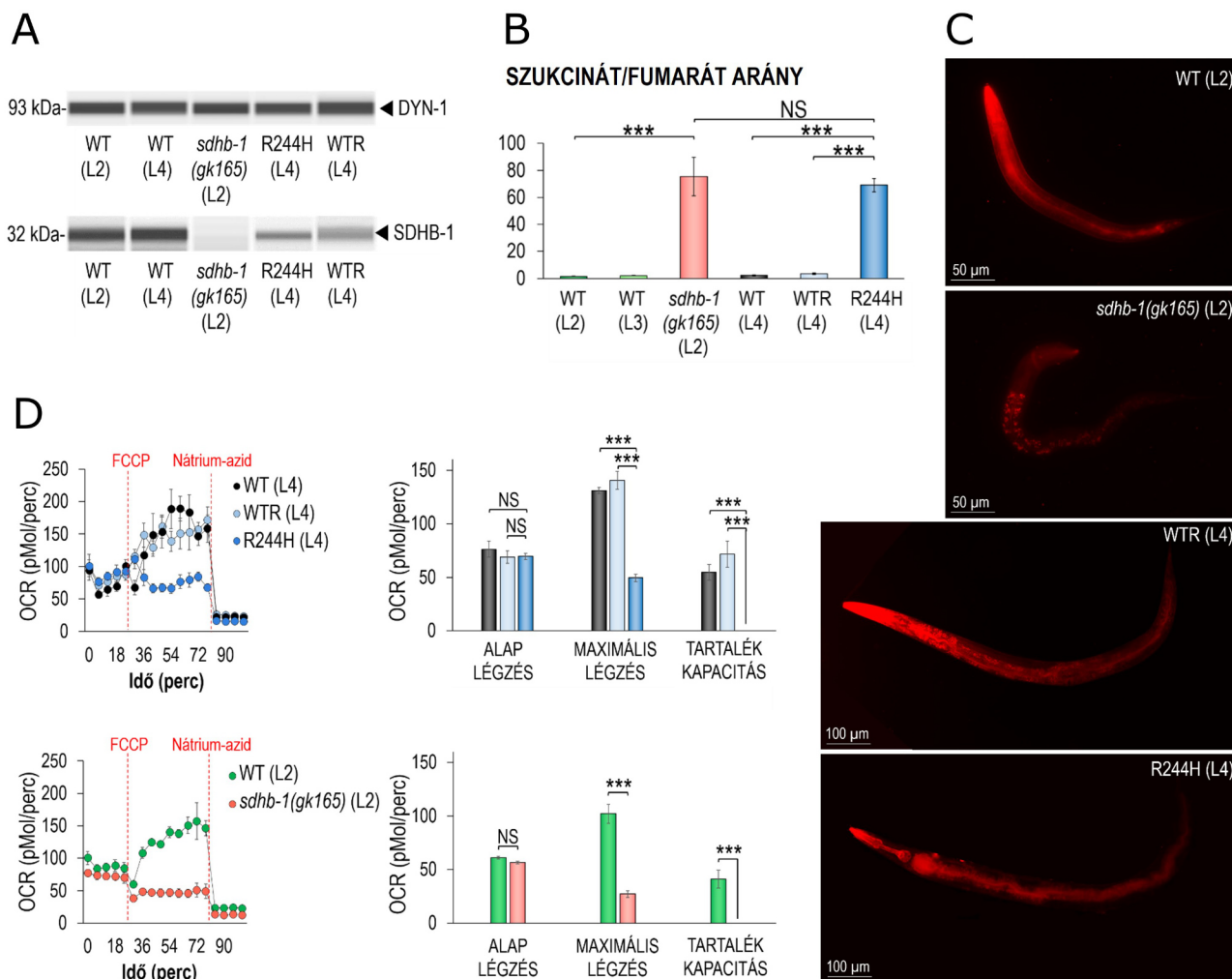


**1. ábra. Az SDHB-1 Arg244His mutáció sterilitáshoz és rövidebb élettartamhoz vezet.**  
**A)** Az SDHB magas fokú konzerváltságot mutat fonalféregben. A humán SDHB Arg230His missense mutációjának a *C. elegans* Arg244His mutáció feleltethető meg. **B)** A vad típusú transzgént hordozó állatok (WTR) képesek menekíteni az *sdhb-1(gk165)* deléció fenotípusát (L2/L3 lárvastádiumban megrekedés), szemben a pontmutációt hordozó transzgenikus állatokkal (R244H mutánsok), amelyek eljutnak a fiatal felnőtt stádiumig, de sterilek maradnak. **C)** Az *sdhb-1(gk165)* deléciós és az R244H mutánsok rövidebb ideig élnek, mint a kontroll állatok.

Kutatásom célja, hogy megállapítsam a *C. elegans* alkalmas-e a fent említett betegségek modellezésére. Ennek érdekében két transzgenikus vonalat állítottam elő, amelyek vad típusú *sdhb-1* transzgént, illetve G731A pontmutációt tartalmazó transzgént hordoznak *sdhb-1(gk165)* deléciós háttérbe keresztezve. Az *sdhb-1 (gk165)* deléciós állatok fejlődése L2/L3 lárvastádiumban megreked. A vad típusú transzgént hordozó állatok (WTR) sikeresen menekítették a deléció fenotípusát és képesek fertilis felnőtt egyedekké fejlődni, szemben a G731A pontmutációt hordozó transzgenikus állatokkal (R244H

mutánsok), amelyek ugyan eljutnak a fiatal felnőtt stádiumig, de sterilek maradnak (1. ábra).

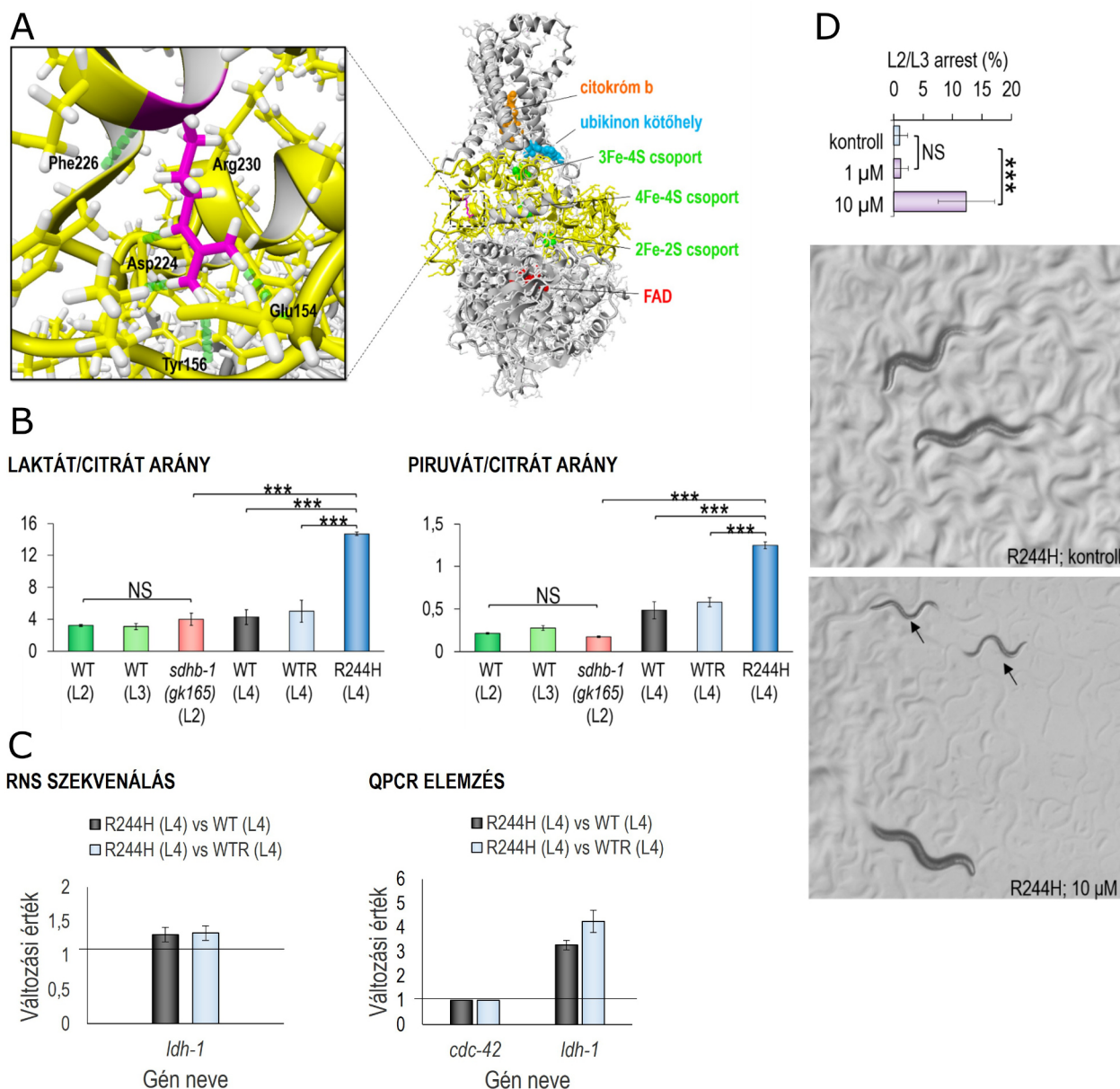
Az *sdhb-1(gk165)* deléciós és az R244H mutánsok rövidebb ideig élnek (1. ábra), kevesebb funkcióképes mitokondriummal rendelkeznek, mint a kontroll állatok, valamint hasonlóan magas szukcinát/fumarát arányt és hasonlóan alacsony oxigénfogyasztást mutatnak (2. ábra).



**2. ábra.** Az *SDHB-1* Arg244His mutáció megemelkedett szukcinát szintet és lecsökkent mitokondriális funkcióképességet eredményez. **A)** Wes (Capillary Western immunoassay) segítségével kimutattuk, hogy az R244H mutáns állatok is expresszálják *SDHB-1* fehérjét, de alacsonyabb szinten, mint a kontroll törzsekben. **B)** Az *sdhb-1(gk165)* deléciós állatok és az R244H mutáns állatok hasonlóan magas szukcinát/fumarát arányt (szukcinát felhalmozódást) mutatnak. **C)** Mitotracker festés segítségével azt találtam, hogy az *sdhb-1* mutáns fonalférgek kevesebb funkcióképes mitokondriummal rendelkeznek, mint a kontroll állatok. **D)** Az állatok oxigénfogyasztását (OCR) Seahorse XF96 rendszer segítségével mértem, melynek eredményeként az *sdhb-1* mutáns fonalférgek csökkent mitokondriális oxigénfogyasztást mutatnak.

A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy az SDH enzim egyik mutáció esetében sem volt képes ellátni funkcióját. Ezek az adatok összhangban

állnak a bioinformatikai elemzéssel, miszerint az Arg230 (*C. elegans*-ban az Arg244) guanidino-csoportja egy konzervált Asp224-Arg230 sóhidat képez, amely nélkülözhetetlen lehet az SDHB fehérje stabilitása szempontjából (3. ábra).



**3. ábra. Az SDHB-1 Arg244His mutáció feltehetően inaktív enzimmolekulát, illetve tumorsejtekre jellemző metabolizmust eredményez. A)** Arg244-nak fontos szerepe lehet az SDHB fehérje stabilitása szempontjából, elemzésünk alapján szubsztitúciója akár inaktív enzimmolekulát is eredményezhet. **B)** Az R244H mutáns állatokban megemelkedik a laktát és a piruvát mennyisége, amely magas glikolitikus aktivitásra utal. **C)** A transzkripciós elemzések megerősítették az R244H mutánsokban a laktát-dehidrogenáz magas aktivitását. **D)** Laktát-dehidrogenáz gátló alkalmazása szelektíven késleltette a R244H mutáns fonalférgek fejlődését, miközben a kontroll, vad típusú fonalférgek nem voltak hatással.

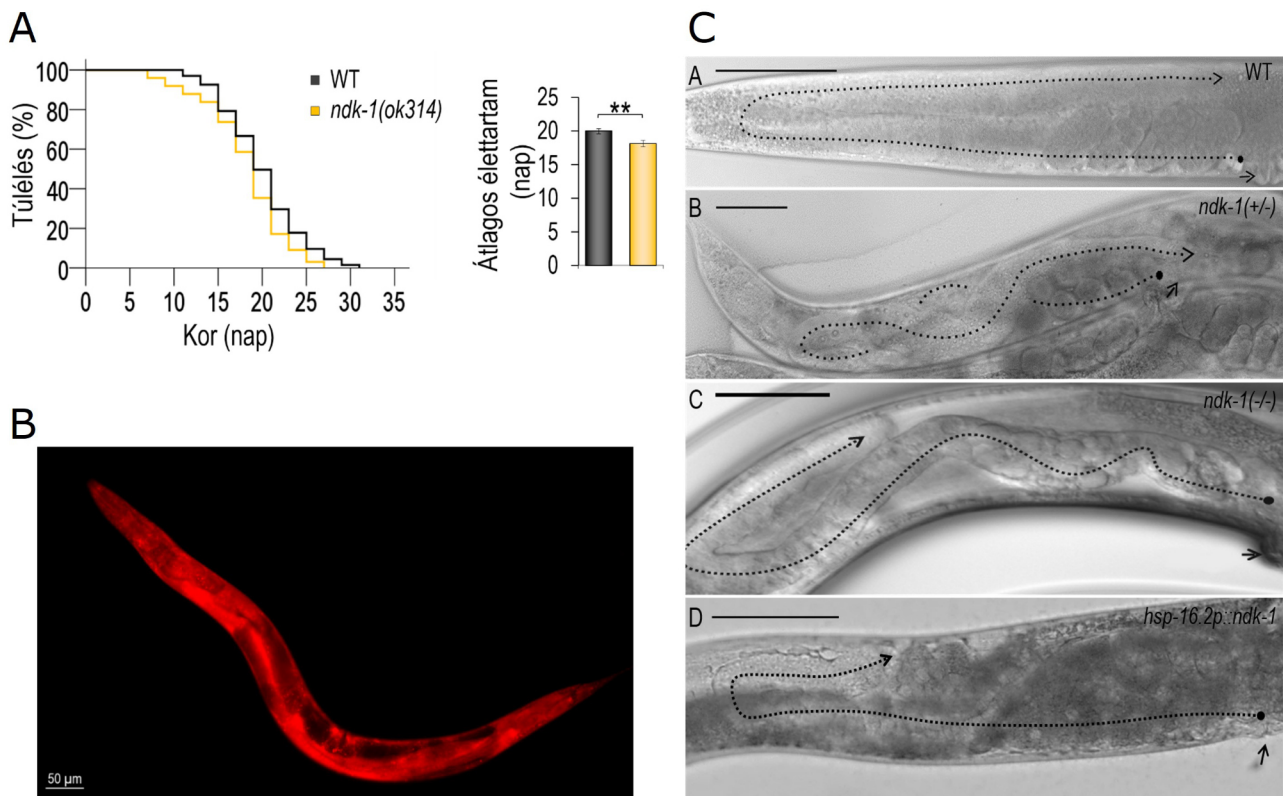
Érdekes módon az Arg244His pontmutációk metabolikus profilja eltérő módon

változott meg a deléciós mutánsokhoz képest. A pontmutáns állatok megemelkedett laktát- és piruvát szintet mutattak, amely magas glikolitikus aktivitásra utal. A transzkripciós elemzések megerősítették a laktát-dehidrogenáz magas aktivitását, amely felveti annak a valószínűségét, hogy a pontmutáns állatok a tumorsejtekre jellemző metabolikus átprogramozáson esnek át. Kutatásom során GSK2837808A laktát-dehidrogenáz gátlót alkalmaztam, amely szelektíven késleltette a pontmutáns fonalféreg fejlődését, miközben a kontroll, vad típusú fonalféregre nem volt hatással (3. ábra). Ez azt jelenti, hogy modellünk gyógyszeresen kezelhetőnek bizonyult, ezért úgy gondolom, hogy az általunk létrehozott *C. elegans* féregmodell felhasználható a PPGL daganatokkal szembeni különböző preklinikai gyógyszerjelöltek hatásának tesztelésére, valamint új eszközként szolgálhat az SDH-hoz kapcsolódó betegségek hátterében álló mechanizmus feltérképezésében és új kezelési módszerek kifejlesztésében.

Kutatói munkám másik részében egy metasztázis szuppresszor, az *NM23* homológ *ndk-1* sejtmigrációban betöltött szerepét vizsgáltam a *C. elegans* fonalféreg gonád morfogenezisében. Az *NM23* géncsalád tagjai nukleozid-difoszfát-kinázokat (NDPK; *nucleoside-diphosphate kinase*) kódolnak, amelyek katalizálják a nukleozid-difoszfátok nukleozid-trifoszfátokká történő átalakítását.

Az *NDK-1* a humán I. csoportba tartozó NDPK-k egyetlen *C. elegans* homológja. Mivel egyes, I. csoportba tartozó NDPK-k jól ismertek, mint a sejt vándorlás negatív regulátorai [6], kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a funkció konzerválódott-e a fonalféregben. Ennek vizsgálatához a *C. elegans* hermafrodita gonád morfogeneziséét használtuk modellként. A gonád kialakulásáért a disztális csúcssejtek (DTC; *distal tip cell*) felelősek. A DTC-k a testtengelyek mentén jellegzetes vándorlási útvonalat járnak be, amely során létrehozzák a felnőtt hermafroditára jellemző, két szimmetrikus U-alakú gonádkart [7].

Eredményeim szerint az *NDK-1* fehérje hiánya a fonalféreg élettartamának rövidüléséhez vezetett, de nem volt hatással fejlődésükre. Az *NDK-1* a DTC migrációt dóziszfüggő módon befolyásolta: a fehérje teljes hiánya csökkent migrációt, a fél dózisa 24%-os penetranciával ektopikus migrációt, a túltermeltetése pedig ismét inkomplett penetranciával redukált gonádkarokat, azaz csökkent migrációt eredményezett (4. ábra).



**4. ábra. Az NDK-1 a DTC migrációt dóziszfüggő módon befolyásolja. A)** Az NDK-1 hiánya a fonalférgek élettartamának rövidüléséhez vezet. **B)** Az NDK-1 túltermeltetéséhez használt transzgenikus állatokban az *NDK-1::mCherry* fehérje mennyisége 30 perc, 37°C-os hősoport követően jelentősen megemelkedik. **C)** Az NDK-1 fehérje teljes hiánya csökkent DTC migrációt, a fél dózisa ektopikus migrációt, a túltermeltetése pedig redukált gonádkarokat, azaz csökkent migrációt eredményez.

### A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Saskoi, E., Hujber, Z., Nyiro, G., Liko, I., Matyasi, B., Petovari, G., Meszaros, K., Kovacs, A.L., Patthy, L., Supekar, S., Fan, H., Svab, G., Tretter, L., Sarkar, A., Nazir, A., Sebestyen, A., Patocs, A., Mehta, A., Takacs-Vellai, K. (2020) The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model. *Dis Model Mech*, **13(10)**: dmm044925.

Farkas, Z., Fancsalszky, L., Saskoi, E., Graf, A., Tarnok, K., Mehta, A., Takacs-Vellai, K. (2018) The dosage-dependent effect exerted by the NM23-H1/H2 homolog NDK-1 on distal tip cell migration in *C. elegans*. *Lab Invest*, **98(2)**: 182-189.

### Irodalomjegyzék

- [1] Ritchie, H. (2019) Cancer death rates are falling; five-year survival rates are rising. <https://ourworldindata.org/>
- [2] Rutter, J., Winge, D.R., Schiffman, J.D. (2010) Succinate dehydrogenase -

- Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, **10(4)**: 393-401.
- [3] Jochmanova, I., Pacak, K. (2016) Pheochromocytoma: The First Metabolic Endocrine Cancer. *Clin Cancer Res*, **22(20)**: 5001-5011.
- [4] Turchini, J., Cheung, V.K.Y., Tischler, A.S., De Krijger, R.R., Gill, A.J. (2018) Pathology and genetics of pheochromocytoma and paraganglioma. *Histopathology*, **72(1)**: 97-105.
- [5] Timmers, H.J., Kozupa, A., Eisenhofer, G., Raygada, M., Adams, K.T., Solis, D., Lenders, J.W., Pacak, K. (2007) Clinical presentations, biochemical phenotypes, and genotype-phenotype correlations in patients with succinate dehydrogenase subunit B-associated pheochromocytomas and paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*, **92 (3)**: 779-86.
- [6] Miyamoto, M., Iwashita, S., Yamaguchi, S., Ono, Y. (2009) Role of nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals. *Mol Cell Biochem*, **329(1-2)**: 175-9.
- [7] Wong, M.C., Schwarzbauer, J.E. (2012) Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, **1(4)**: 519-31.



Dear Colleagues,

It is with real pleasure that we proudly announce that Lisbon, Portugal, will be the host city of the 25th IUBMB Congress, the 46th FEBS Congress and the 15th PABMB Congress, in one single global event named *The Biochemistry Global Summit*, happening from the 9th to the 14th July 2022.

Organized by the Portuguese Biochemical Society (SPB), in collaboration with IUBMB, FEBS and PABMB, *The Biochemistry Global Summit* will be a great opportunity to be updated with the latest discoveries in the field of biomolecular sciences and interact with scientists from all over the world.

Lisbon is one of the most dazzling cities in Europe, flanked by the Tagus River, with great weather and about 290 sunny days each year. It's an historical city full of stories to tell, yet cosmopolitan where nowadays you can find all kinds of cultural entertainment and activities to suit every taste.

*The Biochemistry Global Summit* will take place at Lisboa Congress Centre, located in the historical area of Belém, by the Tagus River. The program covers a broad spectrum of timely topics in the fields of molecular life sciences, ranging from fundamental subjects and approaches to applied research with impact on human well-being and technological development, bringing together top scientists from all over the world in a true „global summit”, a label reflecting its diversity, quality and modernity. A range of science-related educational and social topics as well as an exhibition from commerce and industry are also included in the program. The summit will be preceded by the Young Scientists' Forum taking place in Vimeiro, near Lisbon.

We are working hard every day to make the event in Lisbon a milestone of a new reality in which we can get back together personally and share all the experiences that enrich us as professionals and human beings.

On behalf of the Organizing Committee, we would like to warmly invite scientists from all parts of the world to join us at *The Biochemistry Global Sum-*



*mit* – the 25th IUBMB, 46th FEBS and 15th PABMB Congresses, and we look forward to welcoming you in Lisbon in July 2022!

Yours faithfully,

Graça Soveral  
Miguel Castanho  
Local Organizing Committee

*Forrás:* <https://2022congress.febs-iubmb-pabmb.org/>

## MOLEKULÁRIS ÉLETTUDOMÁNYI KONFERENCIA 2021

Immáron 5. alkalommal, 2021. november 5-7. között Egerben, a Hotel Eger&Park adott otthont a Hungarian Molecular Life Sciences konferenciának. A hagyományokhoz híven a konferencia tudományos szervezését a Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) és a Magyar Genetikusok Egyesülete (MAGE), míg a technikai koordinálást és lebonyolítást a Diamond Congress Kft. valósította meg. A COVID-19 pandémia támasztotta nehézségek ellenére az élettudományokkal foglalkozó kutató közösségek nagy számban, mindösszesen 365 regisztrált résztvevővel képviseltették magukat ezen a nemzetközi előadókkal is színesített konferencián.

A kongresszuson 4 plenáris előadás, valamint 12 tudományos szekcióban összesen 64 előadás hangzott el, amelyek közül a résztvevők a szakterületüknek és érdeklődésüknek megfelelően választhattak. A plenáris előadások során Kacs Kovics Imre (ELTE, Immunológia Tanszék) a mutáns humán ACE2-Fc, tüskefehérje kötő molekula COVID-19 vírus elleni terápiás célú alkalmazásával kapcsolatos kísérleteiket mutatta be. Lontay Beáta (DE, ÁOK, Orvosvegytani Intézet) előadásában a smoothelin-like protein 1 molekuláris, funkcionális jellemzését és a fehérje terápiás alkalmazásának lehetőségeit ismertette az inzulin rezisztencia, illetve szarkopénia esetében. Nagy László (ELKH, SZBK, Biokémiai Intézet) az egysejtű-többsejtű eukarióták szerveződésében előforduló konvergens evolúció példáit és jelentőségét mutatta be gomba genomok összehasonlító vizsgálatával. Réthelyi János (Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika) a skizofrénia hátterében álló genetikai faktorok vizsgálatát ismertette a CRISPR technológiára alapozott indukált pluripotens őssejtekben történő *de novo* mutációk indukálásán és azok jellemzésén keresztül. Póti Ádám (ELKH, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet), a Bioscience díj nyertese, előadásában a „Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents” (Genome Biology 2019 Nov 14; 20(1):240.) tudományos közlemény eredményeit ismertette.

A 12 tudományos szekció párhuzamosan folyó előadásai lefedték az élettudományok legfontosabb területeit. A változatos betegségmodellek bemutatásán túl, a klasszikus alapkutatói témák ismertetése során is érdekes előadások hangzottak el az őssejtek és a differenciált sejtek működését befolyásoló gének azonosításáról, jellemzéséről, a génexpresszió genetikai és

epigenetikai szabályozásáról. A nagy léptékű DNS és RNS szekvenálási eljárások elterjedésének és a kinyert szekvenciák egyre hatékonyabb elemzésének és összehasonlításának köszönhetően számos előadásban láthattuk, hogy ezeket a technológiákat felhasználva milyen értékes eredmények születtek az eredetkutatásban, a szabályozó RNS-ek és egyedi fehérjék funkciójának megértésében, vagy akár a gyógyszerkutatás különböző területein. Számos érdekes előadást hallhattunk, ahol komplex kísérleti elrendezéseket és változatos modell-szervezeteket alkalmaztak az élesztőtől az ecetmusicán át a zebrahalig sejtbiológia, sejtélettani és fejlődésbiológia kérdések megválaszolására. A mikroszkópos technikák, valamint az új generációs szekvenálás legújabb fejlesztéseit és azok alkalmazási területeit a szponzoráló cégek előadásaiból ismerhettük meg.

A bemutatott 191 poszter prezentáció jól tükrözte az elmúlt két év hazai tudományos aktivitását és lehetőséget adott a részletes diszkussziókra, együttműködések kialakítására, valamint kötetlen beszélgetésekre a konferencia résztvevői között.

A MBKE Epigenetikai Szakosztálya által felajánlott díjat Henn László (ELKH, SZBK, Genetikai Intézet) nyerte el az alternatív linker hisztonok szerepét bemutató poszterével.

A tudományos program mellett a konferenciát támogató cégek standjainál a legújabb technológiákkal, laboreszközökkel és műszerekkel ismerkedhettek meg a résztvevők.

A szakmai program mellett lehetőség volt a kötetlen baráti beszélgetésekre is a közös étkezések és az előadások közötti szünetek során.

Összességében egy szakmailag nagyon színvonalas, együttműködések inspiráló és jó hangulatú konferencia részesei lehettünk.

**Sinka Rita**  
**egyetemi docens**  
**SZTE, TTIK, Genetikai Tanszék**

A konferencián készült fotók megtekinthetők: <https://2021.hunlifesci.hu/gallery/>

## BESZÁMOLÓ AZ 50. MEMBRÁN-TRANZSPORT KONFERENCIÁRÓL

Rendhagyó időpontban, a szokásos májustól eltérően idén november 16-19. között került megrendezésre a sümegi Membrán-transzport konferencia (<https://www.remedicon.hu/311/50-membran-transzport-konferencia>). A hagyományokkal való szakítás oka a COVID pandémia volt, ami már kétszer, 2020 és 2021 májusában az esemény elhalasztására kényszerítette a szervezőket. Azonban most novemberben, az oltásoknak köszönhetően, a negyedik hullám árnyékában, a pandémia előtti időket idéző számú résztvevővel egy sikeres konferenciát lehetett tartani a sümegi Hotel Kapitányban. Az idei kongresszust nemcsak a járvány tette különlegessé, hanem az is, hogy ez volt az 50. Membrán-transzport konferencia. Ez alkalmat adott az 1972-ben kezdődött konferenciasorozat történetének áttekintésére a kezdetektől egészen napjainkig, amelyért Németh Péternek és Molnár Miklósnak tartozunk hálával.

Sajnos fél évszázad elég hosszú idő ahhoz, hogy számos, a kongresszusok szervezésében fontos szerepet játszó ember már ne legyen velünk, és az elmúlt időszakban két, Sümeghez köthető emblematikus emberrel lettünk szegényebbek. Gallyas Ferenc emlékezett meg Sümegi Balázsról, és a tervek szerint Margittai Éva tartott volna előadást Bánhegyi Gáborról, azonban ez utóbbi megemlékezést a járvány megakadályozta.

A nyitónap tudományos részét a hagyományoknak megfelelően a Kovács Tibor díjak átadása és a díjazottak előadásai zárták. Idén a Semmelweis Egyetem két kutatója, Szeifert Viktória és Lengyel Miklós kapta a rangos elismerést.

Az idei konferencia öt szekciójának témái a membránbiofizika legújabb eredményei és kutatási módszerei köré szerveződtek. A szekciók programjának összeállításáért az alábbi öt kutatónak tartozunk köszönettel:

- Varga Zoltán (DE) – Ioncsatornák
- Dénes Ádám (KOKI) – Membránjelenségek az idegrendszerben
- Matkó János (ELTE) – Membrán nanocsövek és extracelluláris vezikulumok
- Mándity István (SE) – Membrántranszporterek, sejtpenetráló peptidek
- Galajda Péter (SZBK) – Egyedi sejt manipuláció

Az idegrendszer membránjelenségeiről szóló szekció szervezésére eredetileg Ábrahám Istvánt kértem fel, akit azonban tragikusan korai halála megaka-

dályozott abban, hogy a már nagyrészt összeállított szekciót le tudja vezényelni. Így Dénes Ádám vállalta el a szekció összeállításának végső feladatát, ami István munkásságának és félbehagyott életművének felidézésére is alkalmat adott.

Az idei konferencia abból a szempontból is különleges volt, hogy az öt plenáris szekció közül háromnak a nyelve angol volt. Ezt az tette szükségessé, hogy az adott tudományterület elismert külföldi szakértői tartottak előadást, ami tovább emelte a konferencia szakmai színvonalát. Több előadó videófájlban rögzített előadásával és videókonferencián lebonyolított diszkusszió keretén belül virtuálisan volt csak jelen a kongresszuson. A szakmai program összeállítását elvégző szekcióelnököknek a magyar tudományos élet résztvevői közül is kiemelkedő képviselőket sikerült meggyőzni arról, hogy részt vegyenek a Membrán-transzport konferencián, ami a hagyományokhoz híven a különböző tudományterületi képviselőik kavalkádjának köszönhetően tovább vitte az interdiszciplinaritás sümegi hagyományát.

Minden konferencia különösen fontos eseménye a poszterek bemutatása, ami idén is élénk érdeklődést váltott ki. A hagyományoknak megfelelően egy négytagú poszterzsűri értékelte a posztereken bemutatott tudományos eredményeket és a prezentáló szerző által tartott rövid összefoglalást. A poszterzsűrizést idén Gesztelyi Rudolf (DE), Barabás Klaudia (PTE), Beke-Somfai Tamás (TTK) és Gombos Imre (SZBK) végezte magas szakmai színvonalon és lelkesedéssel. A zsűri döntése alapján az alábbi nyolc szerző kapott díjat és egyben lehetőséget arra, hogy eredményeiket röviden, a pénteki zárószekcióban, a Fiatal Kutatók Fórumán előadja:

- Lampé Nóra, DE
- Muhammad Umair Naseem, DE
- Vári Balázs, Országos Onkológiai Intézet
- Varga-Zsíros Vanda, SZBK
- Tóth István Balázs, DE
- Surguta Sára Eszter, Országos Onkológiai Intézet
- Sarnyai Farkas, SE
- Ábrahám Ágnes, SZBK

A hagyományos sümegi hangulatot egy kissé visszafogta a pandémia miatti aggodalom és felelősségérzet. De a hivatalos programon kívüli diszkussziók és

eszmecserék idén is számos későbbi kollaborációt alapoztak meg, és a szabadidős, levezető programok biztosították a kollégák közötti barátságok ápolását. A konferencia logisztikájának biztosításáért idén is a Remedicon Kft.-nek tartozunk hálával. Reményeink szerint az 51. Membrán-transzport konferenciára 2022 májusában kerül sor, és a stafétabotot a zárószekció alkalmával már át is vette Tóvári József, akinek sok sikert kívánok a következő kongresszus megszervezéséhez.

**Nagy Péter**  
**Debreceni Egyetem,**  
**Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet**

**BESZÁMOLÓ A PEPTIDKÉMIAI MUNKABIZOTTSÁG  
2021. ÉVI TUDOMÁNYOS ÜLÉSÉRŐL**

Az MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Tudományos Bizottság keretében működő Peptidkémiai Munkabizottság (PKMB) szokásos májusi, 2019 évi tudományos üléséről irt beszámolóinkat így zártuk: „Találkozzunk jövőre, ugyanitt!”. Legmerészebb elképzeléseinkben - de talán mondhatni, hogy a világon senkiéjében sem – sejtettük, hogy az életünk hamarosan mennyire megváltozik, a 2019 decemberében Kínából indult Covid-19 pandémia mennyire felforgatja a munkánkat, a mindennapjainkat, a szokásainkat, a találkozásainkat. Ráadásul, nem gondoltuk volna, hogy ilyen sokáig kell birkóznunk a világjárvánnyal... Szerencse a szerencsétlenségben, hogy a vírus hullámokban támadott. Így 2020 májusa helyett - a negyedik nekifutásra - 2021. október 11-13. között jelenléti konferenciát tarthattunk, a szokásokhoz híven a Richter Gedeon Nyrt. üdülőjében, Balatonszemesen. A találkozón érezni lehetett az örömet, a felszabadultságot, hogy a védettségi igazolvány birtokában újra együtt lehetünk, szakmai és baráti beszélgetéseket, programokat tarthattunk.

A konferencián összesen 83 fő vett részt, köztük nagyszámú fiatal. A gazdag tudományos program 9 szekciójában 52 előadás hangzott el, amelyek bemutatták a hazai peptid- és fehérjekutatás legfrissebb eredményeit. A néhány éve elindított angol nyelvű szekció egyre népszerűbb, idén 9 fő adott itt elő, részben Magyarországon dolgozó külföldi kutatók, részben hazai előadók.

Az első napi tudományos programot a Medzihradszky Kálmán emlékülés zárta, amelyen a 2019 májusában elhunyt akadémikus, a peptidkémia nemzetközi híré tudósa, az ELTE egyetemi tanára, a PKMB ikonikus alakja, egykori elnöke munkássága és élete előtt tisztelegtünk. Tóth Gábor (SZTE, Orvosi Vegytani Intézet) mint a PKMB jelenlegi elnöke, Orosz György egykori tanítvány és Benyhe Sándor (SZBK, Biokémiai Intézet), a több mint három évtizedes együttműködő partner, a néhai Wollemann Mária vezette kutatócsoport tagja tartott élménygazdag előadást. Ebben a szekcióban került bejelentésre, hogy Dr. Medzihradszky-Schweiger Hedvig férje emlékére díjat ajánlott fel, amely az évente megrendezendő MTA Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülésén kerül átadásra. Az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért Kuratóriuma nevében Hudecz Ferenc elnök tisztelettel és köszönettel elfogadta a felajánlást. A díj megnevezése Medzihradszky Kálmán előadói díj. A Professor Úr nagy súlyt helyezett a jó előadásokra, munkatársait, hallgatóit is erre

ösztönözte. A díj 2021–2030 közti 10 éves időszakban kerül odaítélésre, évente három 40 év alatti előadó pénzbeli jutalmazásával.

Első este a vacsora után került sor a PKMB nyilvános ülésére, ahol frissen sült pogácsa és remek borok kóstolása mellett Tóth Gábor elnök bejelentette, hogy az elnök és titkár megbízatása lejárt. A jelölés és szavazás az új tisztségviselőkre online fog majd történni. Ezután kötetlen baráti beszélgetés folyt, többek esetében hajnalig.

A további szekciók a következő témaköröket ölelték fel: peptid szintézis, a peptidok analitikája és szerkezetvizsgálata, peptid konjugátumok, biológiai hatások, a fehérjék szerkezete és funkciója, elméleti kémia.

A konferencia végén került sor a Medzihradszky Kálmán előadói díjak átadására, amelyet a 4 tagú szakmai zsűri Enyedi Kata Nórának (ELTE, TTK, Szerves Kémiai Tanszék, ELKH-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport), Bencs Fruzsínának (ELTE, Hevesy György Kémia Doktori Iskola, ELTE, TTK, Kémiai Intézet) és Kovács Dánielnek (ELTE, Hevesy György Kémia Doktori Iskola, ELTE, TTK, Kémiai Intézet) ítélte.

A rendezvényen 3 cég (ABL&E-JASCO Magyarország Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Gen-Lab Kft., UNICAM Magyarország Kft.) mutatta be a termékeit.

Köszönjük a kiállító cégek és az Alapítvány a Magyar Peptid és Fehérjekutatásért által nyújtott anyagi támogatást!

Bízunk benne, hogy a 2022 évi MB ülés a szokott időben, a szokott helyen kerülhet megrendezésre!

**Tóth Gábor**  
**elnök**

**Szűcs Mária**  
**titkár**





## ORMOS PÁL 70 ÉVES

Az ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont (SZBK) új konferenciaközpontjában szeptember 10-én egy kötetlen hangulatú, az előadók személyes emlékeivel fűszerezett tudományos ülésen és az azt követő baráti beszélgetéseken köszöntöttük a 70 éves Ormos Pált, vagyis – ahogy az SZBK-ban sokan hívjuk – Palit. Az ünnepi ülést Zimányi László, az SZBK Biofizikai Intézetének igazgatója kedves szavakkal nyitotta meg, majd Nagy Ferenc, az SZBK főigazgatója és Mátyus László, a Magyar Biofizikai Társaság elnöke köszöntötte az ünnepeltet. Ezt követően Szabó Gábor, az MTA Fizikai Tudományok Osztályának tagja, a Szegedi Tudományegyetem volt rektora méltatta őt. (Megjegyzendő, hogy Zimányi László 2015-ben az intézet igazgatói, Nagy Ferenc 2018-ban az intézmény főigazgatói feladatát vette át éppen Ormos Páltól. Szabó Gábor pedig az ünnepelt egykori diáktársa is.) Az ünnepi ülést három tanítványa, Galajda Péter, Kelemen Lóránd és Vizsnyiczai Gaszton előadása zárta, a fiatalok a mesterükkel közös munkájukról és élményeikről beszéltek.

Ormos Pál 1951-ben született Szegeden. A szegedi József Attila Tudományegyetemen (JATE) szerezte meg fizikusi oklevelét 1975-ben. Ezután későbbi állandó munkahelyének, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének kutatója lett, ahol 1978-tól tudományos munkatársi, 1985-től tudományos főmunkatársi beosztásban dolgozott. 1983-ban megszerezte a fizikai tudomány kandidátusa címet. 1985-től 1991-ig megszakításokkal az Illinois Egyetemen oktatott vendégprofesszorként. Hazatérésekor, 1991-ben megszerezte az MTA doktora címet, és tudományos tanácsadói beosztásban folytatta a kutatómunkát a Biofizikai Intézetben. 1994-től 2015-ig az intézet igazgatói tisztét töltötte be. Tudományos eredményei elismeréseként 1998-ban a Magyar Tudományos Akadémia levelező, 2004-ben pedig rendes tagjává választották. 1998-ban a JATE habilitált doktora, majd címzetes egyetemi tanára lett, emellett az ELTE Biológiai Fizikai Tanszék részfoglalkoztatású egyetemi tanára is volt. 2010-ben az MTA SZBK főigazgatójává nevezték ki.

Kutatásainak lényege a fény biomolekulákkal és élettelen anyagokkal való kölcsönhatásának megértése és alkalmazása. Az ezredfordulóig a biofizikán belüli fő kutatási területe a biológiai makromolekulák működésének vizsgálata volt, elsősorban optikai, spektroszkópiai és elektromos mérési módszerekkel. Érdeklődése középpontjában a biológiai energiaátalakítás molekuláris mechanizmusai, a fehérjék dinamikája, szerkezetük és működésük kapcsolata volt, és

a bakteriorodopszin [1] és a mioglobin [2] működési dinamikájával foglalkozott legmélyrehatóbban. A bakteriorodopszin (fényel hajtott protonszállító bakteriális membránfehérje) témán együtt dolgozott Keszthelyi Lajos akadémikussal, a téma meghonosítójával, aki a Biofizikai Intézet igazgatójaként és az SZBK főigazgatójaként is Ormos Pál elődje volt. Kiemelkedő eredménye volt ebben az időszakban a fehérje elektromos válaszjelének megmérése és értelmezése, amivel hozzájárult a protonpumpa molekuláris mechanizmusának megértéséhez [1]. Egy példásan sikeres témaváltást követően tudományos tevékenységének új csapásiránya a nano-biotechnológia lett, ezen belül is az optikai mikromanipuláció. A 2000-es évek elejétől kutatócsoportjával annak lehetőségeit tanulmányozza, hogy miként alakítható át egy fény-nyaláb impulzusa szabályozott mechanikai mozgássá. Galajda Péterrel közösen ekkor dolgozták ki a lézeres megvilágításon alapuló, kétfotonos polimerizáció segítségével előállított és „fényel hajtott” mechanikus mikroszerkezetek működési elvét és technikai részleteit, amelynek komoly nemzetközi visszhangja volt. A jelenséget elsőként bemutató cikkük a tématerület egyik alapközleménye [3]. A bakteriorodopszin, illetve a fény segítségével előállított és hajtott mechanikus mikro-szerkezetek témákról ma már nem lehet Ormos Pál kutatási eredményei nélkül beszélni, hiszen ezeken a tudományterületeken iskolateremtővé vált. Eddig több mint száz tudományos közleménye jelent meg.

Több éven keresztül volt az MTA Biofizikai Bizottságának társelnöke, illetve tagja az Atom- és Molekulafizikai, valamint a Lézerfizikai Bizottságnak. 1996-tól 2005-ig a Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Fizikai Szövetség (IUPAP) Biofizikai Bizottságának tagja, 2002 és 2005 között elnöke volt, illetve ez utóbbi periódusban a Szövetség elnökhelyettesi teendőit is ellátta. 2000-től 2007-ig a Magyar Biofizikai Társaság elnöke, azóta tiszteletbeli elnöke. A felsoroltak mellett tagja az MTA Szegedi Területi Bizottságának, elnöke az Eötvös Loránd Fizikai Társulatnak, valamint választott tagja (fellow) az Amerikai Fizikai Társaságnak. A biofizika terén elért tudományos eredményeiért 1991-ben a Straub-emlékérem díjazottja volt. 1998-ban Széchenyi professzori ösztöndíjban részesült, 2002-ben pedig az általuk kidolgozott optikai mikroszerkezetekért Galajda Péterrel közösen megosztott Széchenyi-díjat vehettek át. 2011-ben a Pro Urbe Szeged díjjal, 2015-ben a Szőkefalvi-Nagy Béla-díjjal, 2016-ban Jedlik Ányos-díjjal, 2018-ban a Magyar Érdemrend Középkeresztjével tüntették ki.

Lényeglátása, legendásan jó humora és közvetlen modora miatt Palival mindig élvezet beszélgetni valamilyen tudományos témáról vagy akár a mindennapi élet

dolgairól. A születésnap ünnepségén a fiatalabb kutatóknak átadott intelme így hangzott: „Élni kell az életet, mert nagyon gyorsan elmegy!” Ő maga példamutatóan művel a kutatómunkából való kikapcsolódást lehetővé tevő olyan szabadidős tevékenységeket, mint utazások, fotózás, síelés vagy faliórák felújítása és készítése, és egyébként mindenféle gépezet érdekli. Mentalitását jól illusztrálja az is, hogy a Biofizikai Intézet kollektívájától születésnap ajándékba kapott adrenalin csomagból az ejtőernyős ugrást választotta és azt október 23-án teljesítette is.

Ormos Pál emeritus professzorként ma is aktívan részt vesz a Biofizikai Intézet tudományos életében. További munkájához jó egészséget és vidám életfelfogása megőrzését kívánjuk!

**Páli Tibor**  
**tudományos tanácsadó**  
**ELKH, SZBK, Biofizikai Intézet**  
[pali.tibor@brc.hu](mailto:pali.tibor@brc.hu)

### **Irodalomjegyzék**

- [1] Keszthelyi, L. and Ormos, P. (1980) Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, **109(2)**: 189-193.
- [2] Ormos, P., Braunstein, D., Frauenfelder, H., Hong, M.K., Lin, S.-L., Sauke, T.B. and Young, R.D. (1988) Orientation of carbon monoxide and structure-function relationship in carbonmonoxymyoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85(22)**: 8492-8496.
- [3] Galajda, P. and Ormos, P. (2001) Complex micromachines produced and driven by light. *Applied Physics Letters* **78(2)**: 249-251.



**FELHÍVÁS**

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

***a 2021-ban a FEBS Letters, FEBS Journal, FEBS Open Bio, Molecular Oncology, TIBS, IUBMB Life, FASEB Journal újságokban megjelent, valamint***

***IF > 8 (a 2020/2021-as SCI szerinti) cikkek listáját.***

**Beküldési határidő:**

**2022. február 15.**

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

## ALAPÍTVÁNY A TUDOMÁNYOS SZEMÉSZETÉRT FELHIVÁSA

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

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

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

A beérkező pályázatokat a Kuratórium elbírálja és 2022-ben 2 díjat oszt ki: **szemészeti (retinakutatás)** és **biokémiai témában**. A díjakat és az okleveleket a Magyar Szemorvostársaság Kongresszusán adjuk át.

**A pályázatok beadási határideje: 2022. április 30.**  
**Prof. Dr. Janáky Márta, SZTE ÁOK Szemészeti Klinika,**  
**6720 Szeged, Korányi fasor 10-11 címre.**

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

**ELHUNYT DR. CSEH SÁNDOR (1967–2021)**

2021. október 24-én váratlanul elhunyt dr. Cseh Sándor, a TargetEx Kft. ügyvezető igazgatója és résztulajdonosa.

Cseh Sándor 1967. március 15-én Zalaegerszegen született, és ott érettségizett a Zrínyi Miklós Gimnáziumban 1985-ben. Ezt követően felvételt nyert az ELTE TTK vegyész karára. Diplomamunkáját és PhD fokozatát dr. Závodszy Péter, akadémikus, egyetemi tanár irányításával szerezte az MTA Enzimológiai Intézetében, 1997-ben. Szakmai érdeklődése ekkor fordult a molekuláris biológia és immunológia területe felé. Párhuzamosan a Közgazdaságtudomány Egyetemen közgazdasági szakoklevelet szerzett.

A következő években külföldi tanulmányutakon bővítette szakmai tudását. 1999-2001 között FEBS posztdoktori ösztöndíjas volt Grenoble-ban; majd 2001-2003 között a Tennessee Egyetemen, (Memphis, USA) dr. Tigyi Gábor kutató csoportjában dolgozott.

Hazatérése után 2003-ban, a frissen alakult biotechnológiai spin-off vállalkozás, a RecomGenex kutatási igazgatója lett, majd egy kétéves kitérőt követően (Produkem Kft., Vác, cégvezető), 2005-től tragikus elhunytáig a RecomGenex/TargetEx ügyvezető igazgatójaként tevékenykedett. Részt vett a vállalkozás függetlenné válásában 2007-ben (a cég ekkor kapta a mai TargetEx nevet), és immár résztulajdonosként a cég önálló működésének megszervezésében és felvirágoztatásában.

Hatalmas munkabíráásával, elkötelezettségével életben tudta tartani a vállalkozást a 2008-as gazdasági válság idején is számos európai és hazai pályázat elnyerésével. Új szakmai kapcsolatok kiépítésével gyógyszerkutatást támogató szolgáltatásokat (fehérje expresszió, esszéfejlesztés, biológiai szűrés) nyújtott a Richter Gedeon Zrt., PharmaHungary stb. felé, majd a cég portfólió bővítésével elsősorban molekuláris biológiai fejlesztéseket végzett a biotechnológiai cégek (CEVA, FluArt és Elbion stb.) számára.

Vezetése alatt sikerült az angliai PCR Biosystems céggel partnerségi kapcsolatot létesíteni, ami új piaci lehetőségeket és nemzetközi elismertséget hozott a cég számára. Ezen kapcsolat keretében és számos sikeres új fejlesztés eredményeként került kialakításra a diagnosztikai enzim portfólió, ami a Covid-19



járvány háttérében komoly piaci sikerhez vezetett és megteremtette a cég hosszú távú fejlődését ebben a szektorban. Ennek eredményeként is a vállalkozás létszáma közel 20 főre bővült, és magasan kvalifikált munkaerő állományt sikerült összeverbuválni.

Váratlan halála egy sikeres szakmai és vezetői életívet tört meg. Fiatalon hagyott itt minket, de teljes életet élt és egy virágzó vállalkozást hagyott maga után. Munkatársai irányában maximális lojalitás, empátia és korrektség jellemezte, mindenkivel szinte baráti kapcsolatot ápolt. Távozása hatalmas veszteség a TargetEx és a biokémiai, molekuláris biológiai szakmai közösség számára is.

Emlékét szeretettel és tisztelettel megőrizzük, nyugodjék békében!

***Dr. Dormán György***  
***TargetEx Kft.***  
***gyógyszerkémiai vezető***