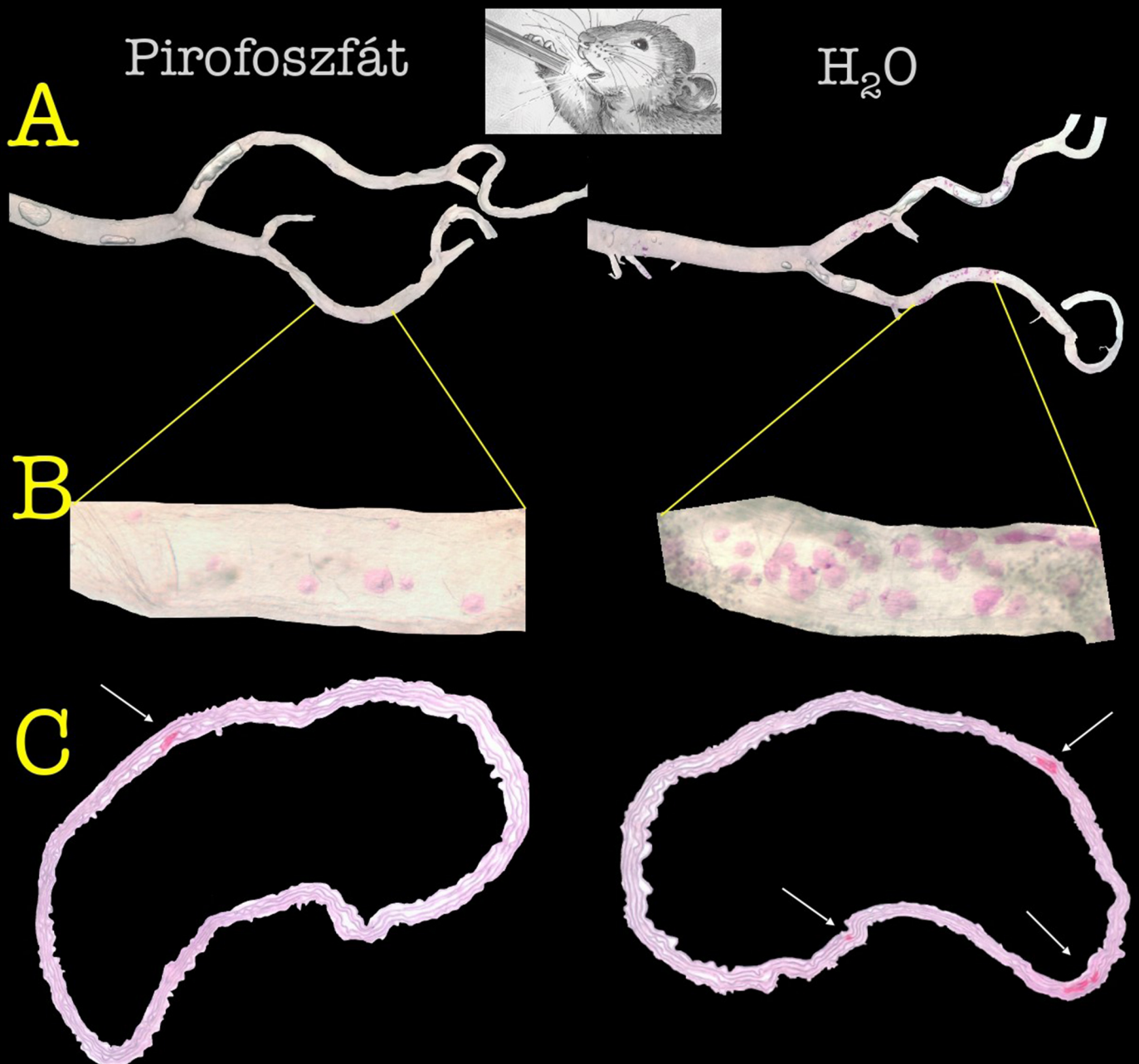


BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLVI. évfolyam 1. szám

2022. március



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:

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

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter
info@remekdesign.hu

XLVI. ÉVFOLYAM 1. SZÁM

2022. március

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: A szájon át bejuttatott pirofoszfát gátolja az artériák meszesedését az Enpp1 knock out egérben, ami a Generalized Arterial Calcification in Infancy (GACI) nevű ritka, öröklődő meszesedési betegség modellje. A meszesedés korai, igen gyors és intenzív. Az ábra bal oldalán az ivóvízben 1 mM pirofoszfátot tartalmazó, a jobb oldalon vizet ivó egér artériája látható. A meszesedési területeket Alizarin Red festékkel jelenítettük meg. A) Az alsó végtag arteriális rendszere. B) Felülnézeti kinagyított kép egy közepes méretű artériáról. C) Keresztmetszeti kép, amely világosan bizonyítja, hogy a meszesedés az ér középső, media rétegének sima izom rostjaiban alakul ki (lásd Váradik cikk, 5. oldal).

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak 4.
Váradik András: Egy transzporter, egy nukleáz és egy metabolit:
a trió, amelyik a meszesedés kottájából játszik 5.

TUDOMÁNYOS CIKK

Bánóczi Zoltán: Hatóanyagok sejtbejuttatása peptidekkel –
hatékony sejtpenetráló peptidok fejlesztése 15.

ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL

Felhívás 30.
Lista 31.
Közlemények 32.

PHD DISSZERTÁCIÓK BEMUTATÁSA

Póti Ádám: A DNS-hibaelkerülés genomi lenyomatainak vizsgálata 35.
Szimler Tamás: A RASSF1A tumorszuppresszor fehérje Aurora-A kináz
általi foszforilációja: enzimkinetika és modellezés 42.

A 2021. ÉVBEN MEGJELENT KIEMELKEDŐ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA 49.

KONFERENCIA HIREK

AZ MBKE 2022. évi Vándorgyűlése, Pécs 57.

FELHÍVÁSOK

Tankó Béla díj 58.
Bio-Science Kft. publikációs díja 59.



Békés, meghitt húsvéti ünnepeket kívánunk minden kedves olvasónknak!

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. DECEMBER 15. ÉS 2022. MÁRCIUS 15.
KÖZÖTT**

Az **Academia Europaea** rendes tagjává választotta **Vértessy Beátát**, a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet kutatóprofesszorát.

Keserű György Miklós akadémikus (Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet) Magyarország számára kivételesen értékes tudományos pályafutása, a gyógyszerkémia és a kémiai biológia területén elért, nemzetközileg is kiemelkedő eredményei, iskolateremtő tudományos tevékenysége elismeréseként **Széchenyi-díjat** kapott.

Kulcsár Péter István, a Természettudományi Kutatóközpont tudományos munkatársa „Off-targetmentes génmódosítás megnövelt pontosságú SpCas9 variánsokkal” című pályamunkájáért **Akadémiai Ifjúsági Díjban** részesült.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

EGY TRANZSPORTER, EGY NUKLEÁZ ÉS EGY METABOLIT: A TRIÓ, AMELYIK A MESZESEDÉS KOTTÁJÁBÓL JÁTSZIK

Váradi András
ELKH Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Köszönöm szépen a Biokémia felkérését, hogy mint friss Eötvös-koszorú kitüntetett írjak az újságba. Előbb a díjról: ezt a Magyar Tudományos Akadémia adja, és mint minden díjnak, ennek is az adja meg az értékét, akik korábban ebben részesültek. Amikor értesültem arról, hogy 2021-ben az MTA Biológiai Osztálya engem jelölt, megnéztem a korábbi díjazottak listáját. Nagyon előkelő társaságba kerültem, csak abban reménykedhetem, hogy a jövő díjazottjai, amikor megnézik a listát, talán nem fogják finnyásan elhúzni a szájukat az én nevem láttán.

A felkérés arra szól, hogy az „életutamról” írjak, egyébként a díj indoklásában is ez szerepelt: „*kiemelkedő tudományos életműve elismeréseként*”¹, ami természetesen nagyon jól esik. Mégis úgy döntöttem, hogy arról írok, ami jelenleg a legjobban foglalkoztat. Aki ismer, tudja, nagyon szeretek történeteket mesélni. „Az ember történetmesélő állat” - sajnos nem emlékszem, melyik bölcs mondta ezt, de igaza volt. Vágjunk bele!

A mi kutatócsoportunkat a kötőszöveti meszesedés (connective tissue calcification, ectopic calcification) kutatása tartja lázban (írtunk erről korábban a Biokémiában 2018. június, http://www.mbkegy.hu/apps/mbkegy/resources/biokem/2018/2018_06.pdf). Ez a jelenség patológiás, azaz betegséget okozó, illetve bizonyos betegségek velejárója. Leginkább az artériák meszesedéséről szoktunk hallani, de számtalan szövet, szerv lehet „áldozata” ennek a nemkívánatos folyamatnak, a bőr, a szem, a vese, az ízületek - hogy csak néhány példát említsek a leggyakoribb artériás meszesedés mellett. Ez utóbbinak két típusát ismerjük, az atherosclerosis, amikor plakkok képződnek az artériák belső falán, majd ezek meszesednek szűkítve az ér belső átmérőjét. A másik típus az artériák középső (media) rétegét alkotó simaizom sejtek meszesedése (arteriosclerosis). Az izomháló biztosítja az érfal flexibilitását, amely ebben a kóros állapotban egyre ridegebbé válik.

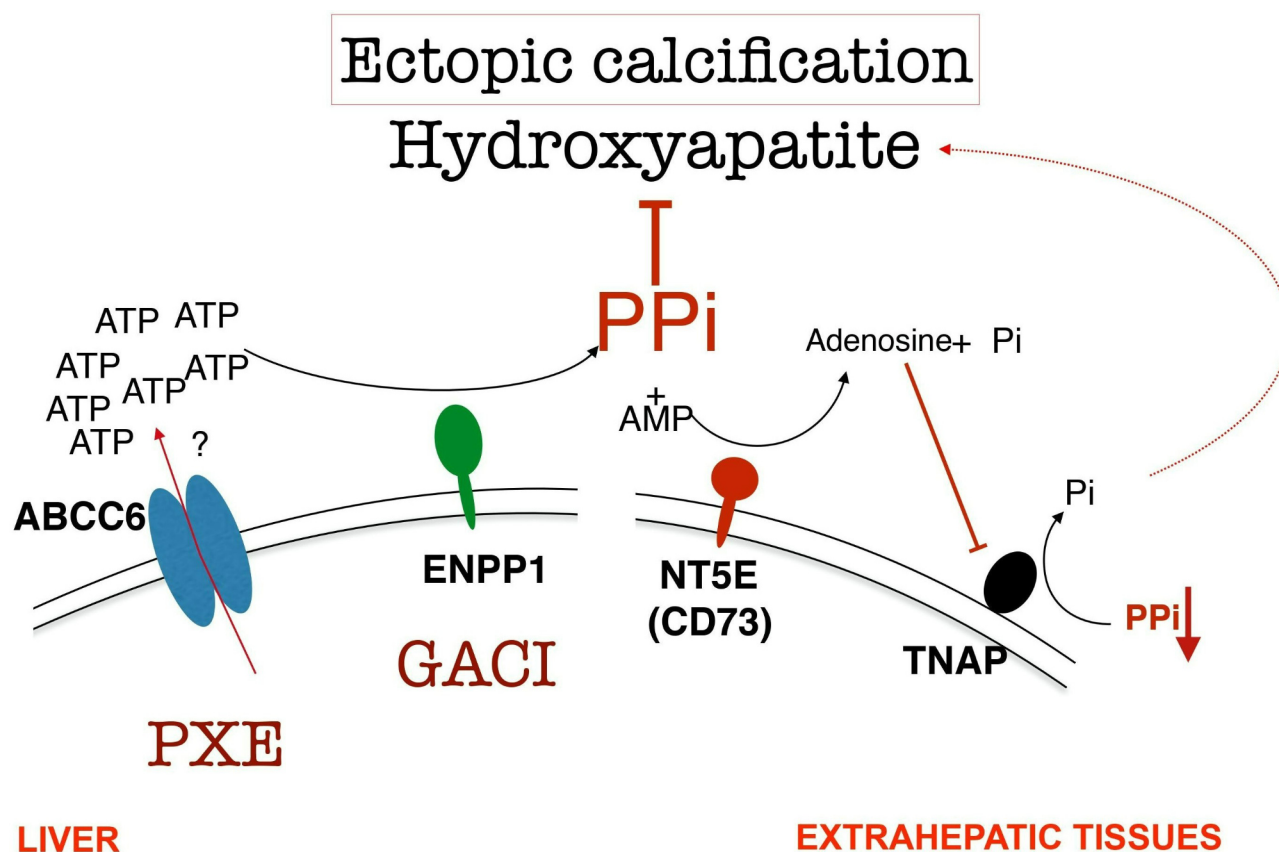
¹ A hírről beszámoltunk a Biokémia XLV(4): 4. oldalán, 2021. decemberben. (A szerkesztőbizottság megjegyzése.)

Ez utóbbi tartozik az általunk vizsgált, és számos esetben a szervezet más helyén is kialakuló meszesedési spektrumhoz. A (pato)fiziológiai kutatások egyik eredményes útja monogénes öröklődő betegségek vizsgálata, ezeket a betegségeket a kérdéses kóros folyamat modelljeinek tekintjük. A mi múltunkban nagy szerepet kapott az ABC- (*ATP Binding Cassette*) fehérjék kutatása. A kalcifikáció felé mutató fordulópont az volt, hogy kiderült, az ABCC6 fehérje génjében előforduló mutációk egy meszesedési betegséget, a pseudoxanthoma elasticum (PXE) nevűt okozzák. Mi még a kezdetekben bebizonyítottuk, hogy az ABCC6 organikus anion transzporter, és hogy az a néhány betegséget okozó mutáció, amit megvizsgáltunk a transzport-funkció elvesztését okozza [1]. Mivel ez a fehérje elsősorban a májban expresszálódik, a meszesedési tünetek pedig több szövetet, szervet (bőr, szem, artériák, vese) érintenek, tehát tipikus *ektopikus* kalcifikációval járó kórképről beszélünk. Ennek megfelelően a PXE a metabolikus betegségek családjába tartozik. Később helyesnek bizonyult az a feltételezés, hogy a fehérje valamit a májsejtekből a véráramba transzportál, ami képes megakadályozni a meszesedést. Ha mutációk miatt a fehérje nem működik, akkor ez az „inhibitor” hiányzik a keringésből, kialakul a meszesedés. A mágikus metabolit után hosszú évekig tartó - sajnos sikertelen - kutatást folytattunk, de nemcsak mi, hanem számos kutatócsoport velünk egyidőben a világ különböző országaiban.

A megfejtéssel egy tehetséges holland kutató, Koen van de Wetering állt elő 2013-14-ben. Felfedezték, hogy az ABCC6 elősegíti az ATP-nek a hepatocitákból való kijutását a véráramba [2, 3]. Az ATP-t a májsejtek felszínén levő ektonukleáz, az ENPP1 AMP-re és pirofoszfátra (PPi) hasítja. A pirofoszfátról pedig ismeretes volt, hogy hatékonyan képes az ektopikus kalcifikációt gátolni [3]. Nemcsak az ABCC6, hanem az ENPP1 mutációi is kalcifikációs öröklődő betegséget okoznak (Generalized Arterial Calcification in Infancy, GACI), mindkét betegségben a PPi keringésben mérhető szintje lényegesen alacsonyabb, mint az egészségesekben (1. ábra).

A puzzle-t tehát sikerült összerakni! Mindenki nagyon boldog volt, mi is fellélegeztünk, értjük a mechanizmust, itt áll előttünk egy nagyszerű tudományos felfedezés, és nem melleleg nem kell folytatnunk a kudarcos kísérleteinket a metabolit azonosítása céljából. Ugyanakkor egyöntetű volt az a vélemény, hogy ez a nagy felfedezés nem „fordítható le” terápiára, ugyanis köztudott volt, tankönyvi adat, hogy a PPi nem szívódik fel. Amennyiben szájon át kerül a szervezetbe, nem jut el a keringésbe, illetve a perifériára, ahol a

meszesedés kialakul [5]. Ráadásul ezt nemcsak állatkísérletek bizonyították, hanem már 1968-ben megtalálták rá a magyarázatot: az emésztőrendszerünkben nagy aktivitású pirofoszfatazok működnek, amelyek hidrolizálják a PPI-t [6]. Bioavailability zéró. Márpedig az eredményes terápia érdekében a pirofoszfát-pótlásra egész életen át szükség van, ezért csak a szájon át való gyógyszer-bevétel jön szóba.

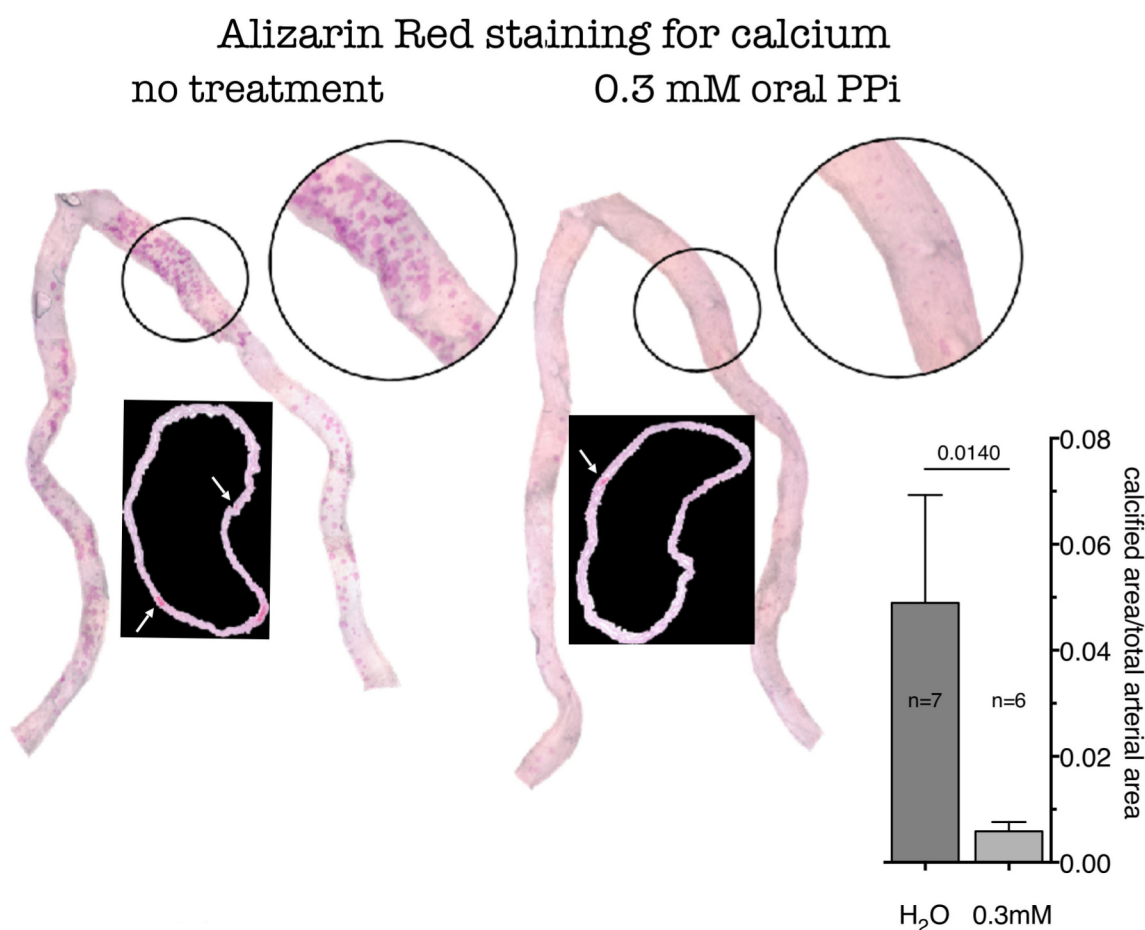


Plasma PPI is low in PXE and in GACI

1. ábra. Az ektopikus kalcifikáció első lépései. A májban, a hepatociták bazolaterális membránjában elhelyezkedő ABCC6 transzporter az ATP kijutását segíti elő a sejtekből. Az ATP-t a máj mikroereiben a membránhoz kötött formában jelenlévő nukleáz, az ENPP1 AMP-vé és pirofoszfáttá (PPI hasítja), ami a keringésbe jut. A PPI a meszesedés, a hidroxipatit-képződés effektív inhibitora. További lépések árnyalják ezt a mechanizmust: az NT5E nukleáz (Ecto-5'-nucleotidase) biztosítja az AMP adenzinná és foszfáttá való hasítást, az adenzin gátolja a nem-szövetspecifikus alkalikus foszfátás (TNAP) expresszióját. NT5E hiányában a TNAP mennyisége megnő, ez hasítja a PPI-t, csökkenti az inhibitor koncentrációját, felgyorsul a meszesedés. A májban működő ABCC6 - ENPP1 útvonal felelős a keringésben lévő pirofoszfát mintegy 60-70%-áért. Forrás: [3].

Most egyes szám első személyre váltok, itt vágunk bele az én személyes történet-mesélésembe. Valahogy nekem ez a „bioavailability zéró” dogma nem tűnt teljesen megalapozottnak. Rövid töprengés után úgy döntöttem, hogy adjunk egy esélyt a szájon át bejuttatott pirofoszfátnak. Mind a két betegség

állatmodellje, az ABCC6 és az Enpp1 knock out (KO) egértörzs rendelkezésünkre állt a laborban, és tudtuk, hogyan kell a kalcifikáció előrehaladtát mérni. Nátrium-pirofoszfátot kevertünk az állatok ivóvizébe - a kontroll-csoport továbbra is tiszta vizet kapott - és megfelelő idő után összehasonlítottuk a mész-lerakódás mennyiségét a bőrben, az artériákban, a vesében. Az világos, hogy a korábban vázolt sikertelen kísérleteinkért, a metabolit *fel nem fedezésért* valószínűleg nem kaptam volna díjat.



2. ábra. A szájon át bejuttatott pirofoszfát gátolja a kalcifikációt a meszesedési betegségek állatmodelljeiben. Az ábra az *Enpp1* KO egérrel végzett egyik kísérletet mutatja be: az egerek egyik csoportja 0,3 mM koncentrációjú pirofoszfát oldatot ivott, a másik csoport (no treatment) pedig vizet 55 napon át. Az ábrán a láb artériája (iliaca) látható, az alizarin red a lerakódott kalciumot festi. Fekete alapon az aorta keresztmetszeti képe bizonyítja, hogy a meszesedés az artéria középső (media) rétegében alakult ki. Kísérleteink mindkét állatmodellre (*ABCC6* KO és *Enpp1* KO) kiterjedtek. Az artériákon kívül a bőr, a vese és - egy indukált módszer segítségével - a szívizom meszesedését is vizsgáltuk. A szájon át bejuttatott pirofoszfát minden esetben eredményesen gátolta a meszesedést. Forrás: [7].

És nyilván azért akarom ennek a hitetlentamáskodásnak a történetét elmesélni, mert a kételkedés „bejött”. Valóban sikerült kimutatnunk, hogy az ivóvízbe kevert PPI meggátolta a meszesedést (2. ábra). Ami persze azt is jelzi, hogy a PPI - legalábbis egérben - felszívódik (mert másképp hogyan?). Később sok kísérletben ezt is és azt is bemutattuk, hogy emberben is felszívódik.

Az első sikeres kísérlet után egy merész lépésre szántam magam, vettem egy repülőjegyet Amsterdamba, hogy megmutassam az eredményeinket a holland kollégáinknak, annak, aki a pirofoszfát szerepére rájött, és annak az idős, nagynevű kutatónak, a Holland Rákkutató Intézet igazgatójának, Piet Borstnak, aki végig nagy érdeklődéssel kísérte a meszesedéssel kapcsolatos munkákat (és akivel már korábban az ABC fehérje-kutatásinkban együtt dolgoztunk). Bekopogtam Piet szobájába, és megkérdeztem tőle, mit szólna, ha valaki ide besétálna, ahogy most én, és azt mondaná, szeretné kipróbálni a szájon át bejuttatott pirofoszfát hatását. Piet óriási színjátékba kezdett, felállt az asztalától, két oldalt a fejét fogta és ingatta. (Egyszer elmesélte nekem, hogy az apja nagynevű orvosprofesszor volt, az édesanyja pedig színésznő. Hol az egyik, hol a másik szülő tör ki belőle. Most szemlátomást a kedves mama). „András, András” - mondta tovább játszva a teatraitást -, „ilyen szamárságot csak egy biofizikus mondhat”. Fogalmam sincs, mi a baja a biofizikusokkal, talán annyi, hogy ők nem mindig mélyednek el az élettanban. Mondtam neki, hogy nem vagyok biofizikus, de ő tovább sopánkodott: „még ilyen marhaságot, hát én amikor orvostanhallgatóknak klinikai biokémiát tanítottam, benne volt a tananyagban, hogy a pirofoszfát nem szívódik fel. És pontosan tudjuk, hogy miért nem. Közben fel-alá járkált, még mindig a fejét fogta, szemlátomást élvezte a saját előadását. Egyszer csak, mint akibe villám csapott, megállt: „András, te megmérte!” Ezt nem kérdezte, hanem kijelentette. Rájött, hogy emiatt jöttem. „Mutasd az eredményeket”. Hosszasan végig kérdezte a kísérletek valamennyi paraméterét, mit hogyan mértünk, hogyan készültek a mikroszkópos felvételek - közben végig azt kérdezte dűnnyögve saját magától „hogyan a fenébe lehet ez?”. Közben egy ritka dicséret hagyta el a száját: „nektek elhiszem, mert ti rendesen végzitek a kísérleteiteket”. (Ez egyébként nemcsak nekem, hanem Sarkadi Balázséknak is szólt.) Jó pár elméletet próbált felállítani, pl. biztosan a szájüregből szívódik fel (ezt később magamon kipróbáltam, de nem). Tulajdonképpen megnyugodtam: ha ez a tapasztalt, kiváló tudós (H-index = 120) nem találta meg a kísérleteinkben a hibát, akkor mehetünk tovább. Kedvező fordulat volt, hogy Koen van de Weetering, aki jelen volt ennél a beszélgetésnél, néhány jó ötletet adott, majd néhány hónap múlva Budapestre

jött, és számos kísérletet együtt végeztünk el. Piettel legközelebb pár hónap múlva egy kis FEBS-konferencián találkoztam 2016 tavaszán. „András, azt ugye tudod, hogy mielőtt bekülditek a cikket vagy elő akarod adni valahol, ezt szabadalmaztatni kell!” Én húzódoztam, nem, nem gondolom. Majd elolvassák a cikket, és akit érdekel, az elkezd a gyógyszerfejlesztést. Faraday sem szabadalmaztatott semmit - mondtam kissé nagyképűen. Sokáig én is így gondoltam - mondta Piet. De a világ nem így működik. Ha nincs megvédve egy felfedezés, akkor senki sem fog pénzt szánni arra, hogy tovább fejlessze. Mert nem lehet biztos abban, hogy valaki nem fogja megelőzni, és akkor az ő összes erőfeszítése, investált pénze semmivé válik. Egy találmányt meg kell védeni, különben nem lesz hasznosítás. Ha akarod, megérdeklődöm nálunk, hogy „szabadalom-képes-e”, amire rájöttetek. Ez óriási megkönnyebbülést okozott nekem, mert már a hideg verejték csorgott a hátamon, amikor arra gondoltam, hogy hogyan tudnék bármit is szabadalmaztatni nálunk. Most nem részletezném az MTA TTK 2016 körüli gyászos helyzetét. Piet a következőt tette: elkérte a még eléggé kezdeti állapotban lévő kéziratot (az ábrák már jó állapotban voltak), és elküldte egy egymondatos kérdéssel („*van-e ebben fantázia*”) a korábban maga által igazgatott Holland Rákkutató Intézet (NKI) Technology Transfer irodájának. Pár hét múlva levelet kaptam az egyik munkatársuktól: alaposan megbeszéltük az irodában, és úgy láttuk, ezt érdemes elvállalni. Ezek után az irodánk vezetője az NKI igazgatója elé terjesztette írásban az elemzésünket, aki elfogadta a javaslatunkat, hogy adjunk ajánlatot a magyar kutatóknak, illetve az MTA TTK-nak. Az ajánlat pedig igencsak nagyvonalú volt: az NKI szabadalmaztatja a találmányunkat, annak minden költségét fedezi. A szabadalom 85%-ban a TTK, 15%-ban az NKI tulajdona, a feltalálók magyar és holland kutatók a fenti arányban. Tovább menve, a szabadalom megszületése után legjobb tudása szerint jár el, hogy partnereket találjon annak hasznosítása érdekében (ebben az NKI óriási kapcsolat-rendszerrel és tapasztalattal rendelkezik, mondom én). Ehhez a tevékenységhez minden jog az NKI kezébe kerül, tehát ebben az MTA TTK-nak nincs feladata. A hasznosítás bevételein - az NKI költségeinek levonása után - a felek a 85:15 arányban osztoznak. Tátott szájjal olvastam az ajánlatot. Nagyvonalú - írtam fent. De nem ez a helyes kifejezés, ennél többről, másról van szó: ez az ajánlat minden ízében, minden részletében észszerű és korrekt. Mindkét fél számára előnyös.

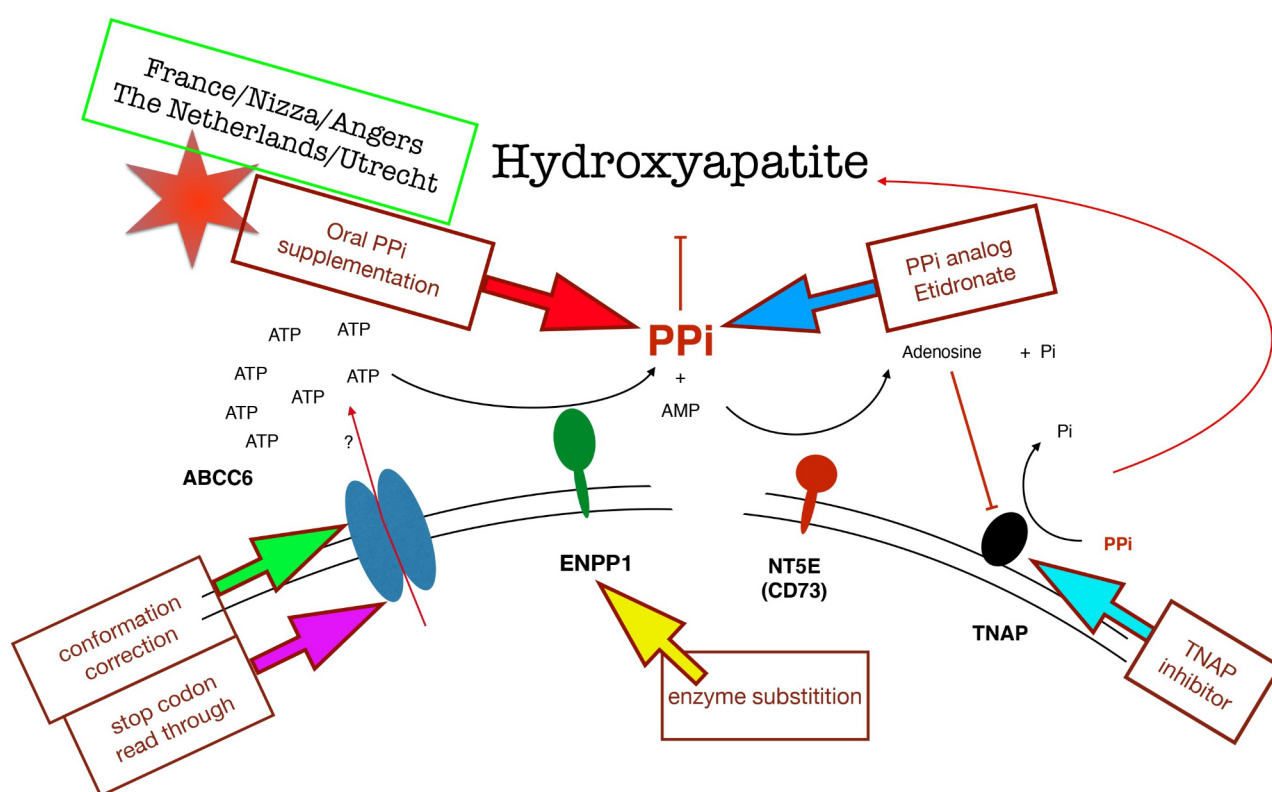
2016 szeptemberében nyújtották/nyújtottuk be a szabadalmat - így szabadon elmondhattam a prirofoszfát remélhető áldásos hatásairól szóló előadásomat az öröklődő meszesedési betegségek konferenciáján Philadelphiában. Számomra is

meglepő volt az a kitörő lelkesedés, amivel a területen dolgozó - már korábban is ismert vagy itt megismert - kollégáink fogadták a felfedezésünket. Minden olyan egyszerűnek, problémamentesnek tűnt. Innen Washingtonba mentem egy másik konferenciára, ahol ismét találkoztam Piettel. Elmondtam neki a pozitív híreket, és azt, hogy az NKI-s szabadalmi szakértők nyilván hamarosan megtalálják azt a gyógyszerfejlesztő céget, aki erre „ráharap”, nekünk ezzel már semmi dolgunk. András, a világ nem így működik, mondta nem először. Bizony hogy nektek kell egy csomó mindent megcsinálnotok, akárki is száll be ebbe a fejlesztésbe. Ezt senki helyettetek nem végzi el. Mert ti értetek a legjobban hozzá: ti ismeritek ezeket az állatmodelleket, tudjátok, hogyan kell a meszesedést követni, hogyan kell a keringésben a felszívódott pirofoszfátot mérni (nem egyszerű), egyszóval a munka nemhogy véget ért volna, hanem folytatódik. Igaza volt: ezt nevezzük translációs kutatásnak, sokat hivatkozunk rá, amikor grantokat írunk - főleg ígéretes formájában - de nem biztos, hogy mindenki tudja, hogyan „csinálódik”. Idemácsolom a Wikipedia definícióját: *„Translational research (also translation research, translational science, or translation) is research aimed at translating (converting) results in basic research into results that directly benefit humans.”*

A következő fordulat, hogy egy-két igencsak magas presztízsű újságot megjárva a kézirat a szintén jól pozícionált EMBO Molecular Medicine-nél kötött ki. Munkánk a lap egyik szerkesztőjéhez került, aki okos, sokszor provokatív kérdéseivel sokat segített abban, hogy a cikk - jó néhány további kísérletnek köszönhetően - egyre jobb lett, és megjelent [7].

Pár hónap múlva furcsa e-mail esett be a postaládámba. „Eolvastam a cikket, elkezdtem szedni a szert, de nagyon keserű, ezt mégis hogyan gondolják?” (nem szó szerinti idézet). Mérges lettem, mi a cikkben felszívódási demonstratív kísérletek eredményeit mutattuk be, nem „kezelésre” vonatkozó javaslatokat. Nem túlságosan udvarias levélben fejtettem ki, hogy ne csináljon ilyen butaságot, igaz, hogy a pirofoszfát élelmiszeradalék, nem mérgező, de senki se szedje „gyógyszerként”. Miután elküldtem a válasz e-mailt, néztem csak meg alaposan ki volt a levélíró. A név, J. L. alatt annyi állt „Panorama Research”. Google, kiderült, hogy a P. R. kaliforniai gyógyszerfejlesztő vállalat, amelyik akkor éppen tizenhat fejlesztési projektet vitt. Elnöke pedig nem más, mint J. L. Elküldtem a levelezés másolatát az NKI Technology Transfer munkatársának, Timnek, aki rögtön írt a Panoramának. Pár hónap egyezkedés, majd J. L. eljött Budapestre, a Gellért Szálló halljában beszélünk meg találkozót. Álldogáltam,

nézelődtem, amikor egy széles mosolyú úr jött felém, kezében maga előtt tartva egy 50 grammos $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -ot tartalmazó vegyszeres dobozt. „You must be András” mondattal ismerkedtünk meg. Mára az NKI szakemberei segítségével licenz-szerződés jött létre a pirofoszfát terápiás alkalmazására, a Panorama létrehozott egy „projekt-céget” (Pyrogenix), a cél pedig egy nagyobb, minden szempontból jól megtervezett klinikai kipróbálás (*Oral pyrophosphate therapy in pseudoxanthoma elasticum*). Tehát az egyik örökklődő meszesedési betegséget vesszük célba.



3. ábra. Különbéféle kísérleti stratégiák a meszesedés gátlására a pseudoxanthoma elasticum betegség esetében. Valamennyi stratégia a plazma pirofoszfát szint helyreállítását illetve pótlását célozza. Csillag jelzi a mi felfedezésünket felhasználó klinikai kísérleteket.

Mindez Utrechtben, és reményeink szerint hamarosan elkezdődik - itt van a világ legnagyobb betegcsoportja, alaposan kivizsgálva a nagyon felkészült klinikus csapat által. Csakhát a Covid, mint sok egyebet, ezt is lelassította. Mindenesetre ennek előkészületei folynak, ebben a mi laborunk is szorgoskodik [8].

De vannak más fejlemények: Franciaországban, ahol szintén elég nagy betegcsoport áll rendelkezésre, már jóváhagyást nyert egy hasonló, de a fentitől némileg eltérően szervezett klinikai kipróbálás („PROPHECI, PyROphosPHate Supplementation to Fight ECTopic Calcification in PseudoXanthoma Elasticum”

NCT04868578, clinicaltrials.gov). Nekem nagyon tetszik ez a romantikus név, a franciák tudják, hogyan kell vonzóvá tenni egy projektet!

Többféle, a meszesedést megelőző, egymással versengő elképzelés van porondon, hiszen a folyamatba több ponton is be lehet avatkozni. Tehát nagy a kompetíció (3. ábra).

Időközben kiderítettük, hogy a baleseti trauma okozta meszesedést is gátolja a pirofoszfát [9]. Érdeklődésünk más kalcifikációval társuló betegségek felé is kinyílt. A szkleroderma (SSc, szisztémás szklerózis) autoimmun betegség, amely gyakran jár együtt calcinosis cutis-szal, egyfajta ektopikus meszesedéssel, amely rendkívül fájdalmas szövődmény. Egy amerikai csoporttal együtt felfedeztük, hogy a keringésben lévő PPI szintje csökkent SSc-s betegekben, és feltételeztük, hogy a PPI hiánya hozzájárulhat az SSc-ben kialakuló meszesedéshez, a kalcinózishoz [10]. Ezen eredmény alapján, Magyarországon három klinikai központ és a mi kutatócsoportunk részvételével a PPI orális adagolását célzó klinikai vizsgálatot engedélyezett a hatóság („Calcinosis Reduction by Pyrophosphate in SSC”, NCT04966416, clinicaltrials.gov). A sztori folytatódik...

Hogy mi az én történetem tanulsága? Talán annyi, hogy a kellő időben és kellő mennyiségben adagolt kételkedés, az igazán jó csapat és nagy szerencse, ez az, amire szükség van. Mint megtudtam, a szerencse rövid definíciója: pár év elég kemény munka. Vagy ahogy a nagynevű borászok mondják: „*In vino veríték.*” És van egy plagizált jelmondatom. „*Always look on the bright side of SCIENCE!*”

Irodalomjegyzék

- [1] Iliás, A., Urbán, Z., Seidl, T.L., Le Saux, O., Sinkó, E., Boyd, C.D., Sarkadi, B., Váradi, A. (2002) Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem*, **277**: 16860-7.
- [2] Jansen, R.S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Váradi, A., Plomp, A., Bergen, A.A, Oude Elferink, R.P., Borst, P., van de Wetering, K. (2014) ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **34**: 1985-9.
- [3] Borst, P., Váradi, A., van de Wetering, K. (2019) PXE, a mysterious inborn error clarified. *Trends Biochem Sci*, **44**: 125-140.
- [4] Fleisch, H., Bisaz, S., (1962) Mechanism of Calcification: Inhibitory Role of

- Pyrophosphate. *Nature*, **195**: 911-911.
- [5] Francis, M.D., Russell, R.G., Fleisch, H. (1969) Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, **165**: 1264-6.
- [6] Ferguson, A., Watson, W.C., Maxwell, J.D., Fell, G.S. (1968) Alkaline phosphatase levels in normal and diseased small bowel. *Gut*, **9**: 96-98.
- [7] Dedinszki, D., Szeri, F., Kozák, E., Pomozi, V., Tókési, N., Mezei, T.R., Merczel, K., Letavernier, E., Tang, E., Le Saux, O., Arányi, T., van de Wetereing, K., Váradi, A. (2017) Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol Med*, **9**: 1463-1470.
- [8] Kozák, E., Fülöp, K., Tókési, N., Rao, N., Li, Q., Terry, S.F., Uitto, J., Zhang, X., Becker, C., Váradi, A., Pomozi, V. (2021) Oral supplementation of inorganic pyrophosphate in pseudoxanthoma elasticum. *Exp Dermatol* doi: 10.1111/exd.14498. Epub ahead of print.
- [9] Tókési, N., Kozák, E., Fülöp, K., Dedinszki, D., Hegedűs, N., Király, B., Szigeti, K., Ajtay, K., Jakus, Z., Zaworski, J., Letavernier, E., Pomozi, V., Váradi, A. (2020) Pyrophosphate therapy prevents trauma-induced calcification in the mouse model of neurogenic heterotopic ossification. *J Cell Mol Med*, **24**: 11791-11799.
- [10] Hsu, V.M., Kozák, E., Li, Q., Bocskai, M., Schlesinger, N., Rosenthal, A., McClure, S.T., Kovács, L., László, B.B., Szamosi, S., Szücs, G., Carns, M., Aren, K., Goldberg, I., Váradi, A., Varga, J. (2021) Inorganic pyrophosphate is reduced in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. doi: 10.1093/rheumatology/keab508. Epub ahead of print.

HATÓANYAGOK SEJTBEJUTTATÁSA PEPTIDEKKEL – HATÉKONY SEJTPENETRÁLÓ PEPTIDEK FEJLESZTÉSE

Bánóczy Zoltán
ELTE, Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Összefoglalás

A sejtpenetráló peptidek felfedezésük óta magukban hordozzák a potenciált, hogy hatékony gyógyszerhordozó rendszerekké váljanak. A családba tartozó peptidek, valamint ezen peptidek kémiai módosításának száma évről évre gyarapszik, ami jól mutatja a téma iránti nagyfokú érdeklődést. Kutatásaink alapját az a megfigyelés adta, hogy egy sejtpenetráló enzimszubsztrát peptid esetén a 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoi csoport (Dabcyl) jelentős mértékben fokozta a sejtbefutást. Ebben a peptidben az internalizációért egy heptaarginin egység a felelős. Ebből kiindulva vizsgáltuk a Dabcyl csoport oligoargininek és azok módosított származékainak internalizációjára kifejtett hatását. A Dabcyl csoport jelentősen fokozta a sejtbefutást, amely hatás szignifikánsan a hexaarginin (Dabcyl-RRRRRRK(Cf)) esetén jelent meg. Ennél a peptidnél már alacsony koncentrációban (2,5 μM) is jelentős arányú direkt internalizációt figyeltünk meg. Ezen peptid sejtbefutásában – akár csak az oktaarginin esetén – a közvetlen sejtbefutás mellett a makropinocitózis, mint vezikuláris transzport játszik szerepet. Habár a Dabcyl-RRRRK(Cf) nem mutatott kiemelkedő sejtpenetráló képességet, alacsony koncentrációban nagymértékű direkt internalizációra volt képes. Ezért a továbbiakban kémiai módosításokkal próbáltuk fokozni a sejtbefutás mértékét. Ha a szekvenciába középre (Dabcyl-RRWRRK(Cf)), vagy az N-terminálisra egy Trp-t illesztettünk (Dabcyl-WRRRRK(Cf)), akkor nagymértékben nőtt a sejtbefutás, és közben sikerült megőrizni a nagyarányú direkt penetrációt alacsony koncentrációban. Érdekes, hogy az endocitózissal történő sejtbefutásuk során nem a makropinocitózis, hanem a kaveola/lipid-raft-mediált endocitózis játszik szerepet. Eredményeink azt mutatják, hogy ezek a rövid tetraarginin származékok ideálisak lehetnek különböző biológiai aktivitással rendelkező anyagok sejtbefuttatására.

Bevezetés

Hatóanyagok szervezetbe juttatása során elengedhetetlen, hogy a hatóanyag különböző biológiai membránokon jusson keresztül. Ha sikerül olyan hatóanyagot kifejlesztenünk, mely a biológiai aktivitás mellett optimális permeabilitási tulajdonságokkal is rendelkezik, már jó úton járunk. A legtöbb esetben azonban ekkor is felmerül a célzott sejtbefuttatás igénye, mely önmagával a

hatóanyaggal ritkán megvalósítható. Az intracelluláris célmolekula elérésére vagy célzott jellegének fokozására ma már számos hatóanyagszállító molekula vagy rendszer áll a rendelkezésünkre. Ezek lehetnek peptid, polimer, liposzóma vagy nanorészecske alapúak [1–3].

A peptid alapú hordozó rendszerek egyik nagy családját alkotják a sejtpenetráló peptidek (CPP) [4]. Ezek a viszonylag rövid (8-30 aminosav) peptidek képesek a sejtmembránon áthatolni és a hozzájuk kémiai vagy fizikailag kötött hatóanyagot is magukkal vinni. A peptidek változatos szerkezetűek, csak néhány közös tulajdonságot mutatnak. Nagyon sok CPP fiziológiai körülmények között pozitív töltésű, míg más peptidek amfipatikus szerkezettel bírnak, mely szerkezetet általában csak a membránnal történő kölcsönhatás során veszik fel [5]. Az irodalomban számos példa található a legváltozatosabb vegyületek hatékony sejtbejuttatására, legyen az kis molekula, peptid, oligonukleotid vagy fehérje [4]. Ezek sejtbejutása kétféleképpen történhet: a) a peptidek átjuthatnak direkt internalizációval/transzlokációval a membránon, ez az útvonal energia független és a peptid közvetlenül a citoszolba jut; vagy b) valamilyen endocitózissal, mely energia függő útvonal és a peptid egy vezikulába kerül, ahonnan ki kell jutnia [5]. Ha ez nem történik meg, akkor a peptid és a bejuttatandó anyag is becsapdázódik és nem tudja az intracelluláris teret és az itt található célpontját elérni. Ezen peptidek nagyszámú felhasználása mutatja a potenciáljukat, mint hatóanyag szállító rendszerek. Van azonban néhány hátrányos tulajdonságuk, melyek miatt a szerkezetük optimalizálása a mai napig izgalmas kutatási terület. Ilyen probléma a szervezetből való gyors kiürülés, a nem célzott hatóanyag szállítás és sejtbejutás utáni vezikuláris becsapdázódás.

Kutatásaink kiindulópontját az a megfigyelésünk adta, hogy a 4-((4-(dimetil-amino)fenil)azo)benzoil (Dabcyl) csoport képes fokozni peptidek sejtbejutását. Ezt felhasználva olyan rövid oligoarginin alapú sejtpenetráló peptideket terveztünk, melyek alkalmasak lehetnek biológiai aktivitással rendelkező anyagok közvetlen sejtbejuttatására.

Módszerek

Peptidek szintézise

Valamennyi peptidet Fmoc/^tBu stratégiával állítottuk elő manuálisan Rink-amid MBHA gyantán. Az aminosavak kapcsolása diizopropilkarbodiimid (DIC) és 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) kapcsolószerekkel történt. Az Fmoc-csoport hasítását 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én-piperidin elegyével hasítottuk. A szintézis

végén a peptideket megfelelő gyökfogókat tartalmazó TFA eleggyel hasítottuk a gyantáról. A fluoreszcens jelzőmolekulákat (5(6)-karboxifluoreszcein (Cf); 5(6)-karboxi-tetrametilrodamin (Rh)) DMF-ben DIC-HOBt kapcsolószerek segítségével építettük be a jelölt peptidekbe.

A sejtbejutás vizsgálata áramlási citometriás mérésekkel

A sejteket a peptidek megfelelő koncentrációjú oldataival, vagy a megfelelő médiummal kezeltük különböző időtartamig, majd mostuk őket és tripszinnel kezeltük. Az ezt követő mosás után a sejtek fluoreszcenciáját BD LSR II vagy Attune NxT Flow Cytometer áramlási citométerrel mértük. A kapott adatokat FACSDiVa 5.0 programmal értékeltük ki. A különböző inhibitorokkal végzett mérések során a peptidekkel történő kezelés előtt a sejteket a megfelelő inhibitorok oldataival előkezeltük.

A sejtbejutás vizsgálata konfokális fluoreszcens mikroszkóppal

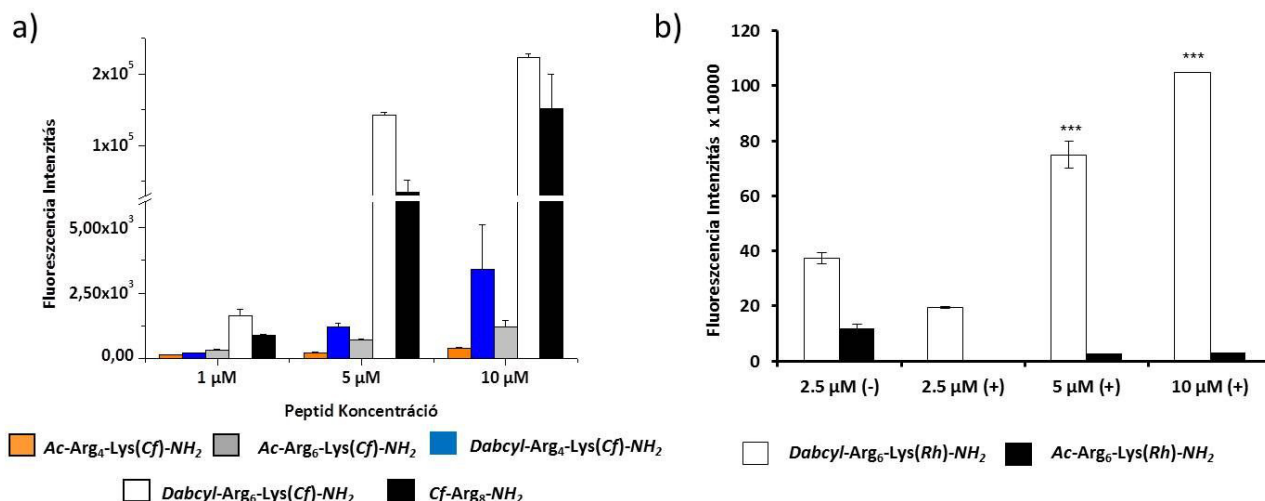
Élő sejt felvételek esetén a sejteket 37 és 4 °C-on inkubáltuk a peptidek megfelelő koncentrációjú oldataival, különböző időtartamig szérumot tartalmazó vagy szérummentes médiumban, majd a sejteket mostuk. A sejtek fluoreszcenciáját Olympus FV1000 konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Fixált sejtek esetén, a peptidekkel történő kezelés és mosások után a sejteket 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk 20 percig. Majd az így előkészített sejtek fluoreszcenciáját Zeiss LSM 710 konfokális fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk.

Eredmények

Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy az oligoargininek egy bizonyos méret felett hatékonyan képesek a sejtekbe jutni [6, 7]. A rövidebb származékok elhanyagolható mértékű internalizációra képesek csak. Egy intracelluláris enzim, a kalpain szubsztrátpeptidjével való munka során figyeltünk fel arra, hogy a szubsztrátban használt, a fluoreszcencia elnyelésére képes, nem fluoreszcens Dabcyl csoport jelentős mértékben fokozta a szubsztrátpeptid sejtbejutását. Ezen megfigyelésünkből kiindulva vizsgáltuk, hogy fellép-e ez a sejtbejutás fokozás rövid (4 vagy 6 tagszámú) oligoarginin esetében is. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét esetben nőtt a sejtbejutott peptid mennyisége, de ez a hatás a hexaarginin (Arg₆) esetén sokkal jelentősebb volt (1.a ábra) [8]. Habár a Dabcyl csoport jelentősen fokozta a tetraarginin sejtbejutását, mely 5 és 10

μM -os koncentrációban a hexaarginin sejtbejutásánál is hatékonyabb volt, lényegesen nagyobb hatást fejtett ki a hexaarginin sejtbejutására. Olyannyira, hogy ez a származék a jól ismert sejtpenetráló peptidnél, az oktaargininnél is jobb internalizációt mutatott.



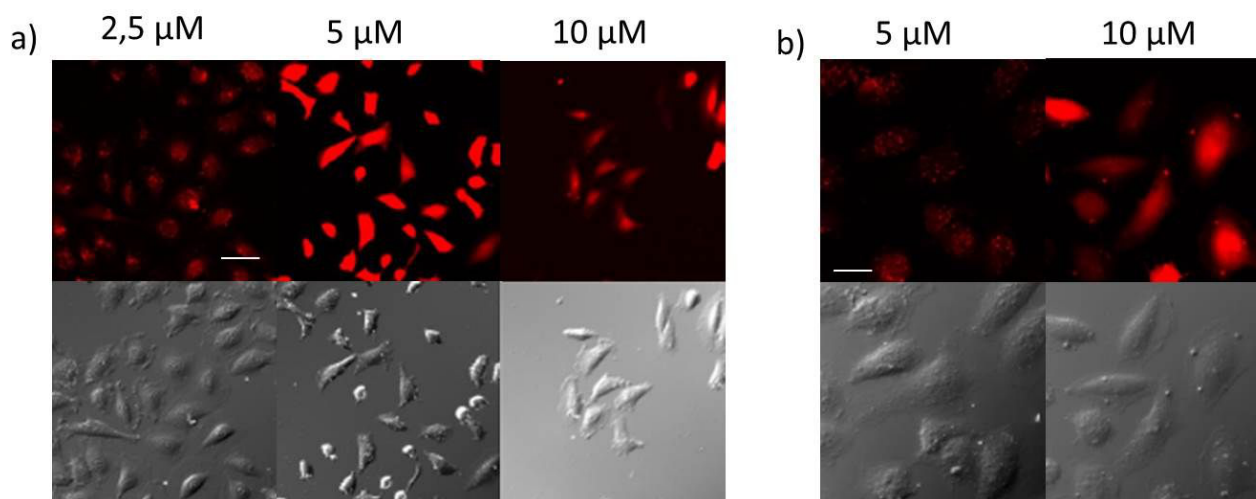
1. ábra. Oligoargininek (Arg₄, Arg₆) sejtbejutása a) HL-60 és b) HeLa sejteken. HeLa sejtek esetén a kezelés szérumot tartalmazó (+) vagy nem tartalmazó (-) médiummal történt. A Dabcyl-Arg₆-Lys(Rh) és a Ac-Arg₆-Lys(Rh) peptid sejtbejutásának különbségét Student t-teszttel vizsgáltuk (***: $p < 0,001$). Az adatok 3 mérés átlagát \pm standard hibáját mutatják. (Cf: 5(6)-karboxifluoreszcein; Rh: 5(6)-karboxi-tetrametilrodamin.)

A hexaarginin származék sejtbejutását HeLa sejteken is vizsgáltuk szérummentes vagy szérumot tartalmazó médiummal kezelve. Ezen sejt esetén is jelentős különbség mutatkozott a Dabcyl csoportot tartalmazó és anélküli peptid sejtbejutásában valamennyi vizsgált koncentrációban (1.b ábra). 2,5 μM -os peptidkoncentráció esetén vizsgálva a szérum hatását elmondhatjuk, hogy az jelentősen csökkentette mindkét peptid sejtbejutását, de a Dabcyl tartalmú hexaarginin még ekkor is jelentős internalizációt mutatott. Habár az irodalomban számos kémiai módosítást alkalmaztak már oligoargininek sejtbejutásának fokozására (acilezés [9], ciklizálás [10]), aromás csoportok ilyen jellegű alkalmazása nem széleskörűen elterjedt.

A sejtbejutás során nagyon fontos a peptid sejten belüli eloszlása. Az egyik fő probléma ezen peptidek esetén, hogy habár bejutnak a sejtbe, ott valamilyen vezikulában csapdába esnek, és nem érik el az intracelluláris teret. Ennek vizsgálatára a Dabcyl-Arg₆-Lys(Rh) peptiddel kezelt sejtek fluoreszcenciáját konfokális fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk (2. ábra).

A 37 °C-on 30 percig tartó kezelés után a sejtek jelentős fluoreszcenciát

mutattak már 2,5 μM -os kezelési koncentráció esetén is (2.a ábra). 5 és 10 μM -ban a teljes sejt egybefüggő fluoreszcenciát mutatott. A diffúz eloszlású fluoreszcencia jel már 2,5 μM -nál is megfigyelhető, ami arra utal, hogy a peptid már ebben az alacsony koncentrációban is jelentős mértékben, direkt módon internalizálódik. Ha szérumot is tartalmazott a kezeléshez használt médium, ettől eltérő fluoreszcens képet tapasztaltunk (2.b ábra).



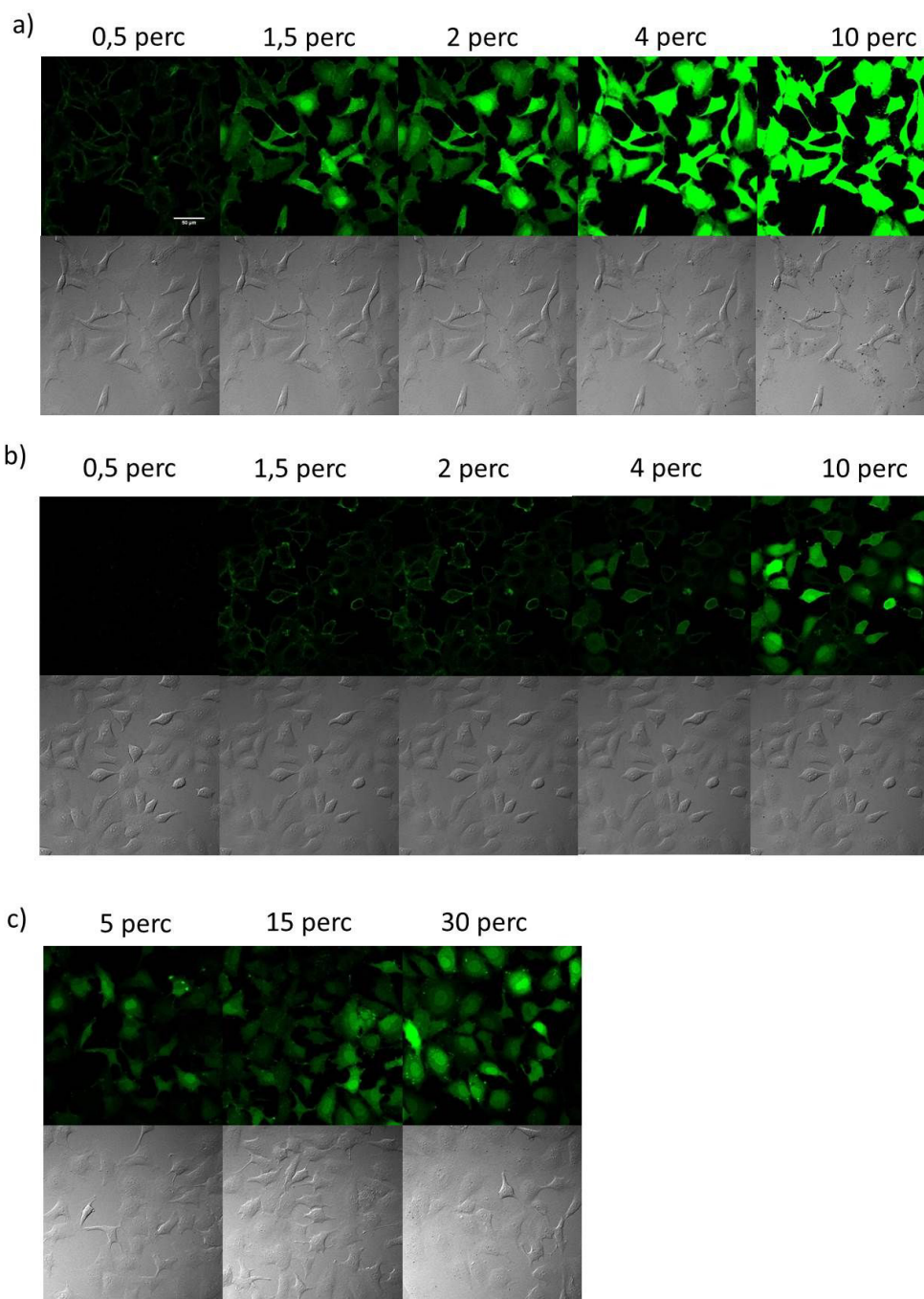
2. ábra. A Dabcyl-Arg₆-Lys(Rh) sejtbejutása HeLa sejteken **a)** szérummentes **b)** szérumot tartalmazó médiumban. Lépték: **a)** 50 μm , **b)** 100 μm . (Rh: 5(6)-karboxi-tetrametilrodamin.)

Egyfelől lecsökkent a fluoreszcencia intenzitás, másfelől az eloszlása 5 μM -nál pontszerű volt, utalva arra, hogy valamilyen vezikuláris transzport játszódtott le. A szérum ezen hatása azzal magyarázható, hogy a szérumfehérjék kölcsönhatnak és megkötik a peptideket, lecsökkentik azok koncentrációját az oldatban és így megváltoztatják a sejtbejutás módját is. A két mérés egyöntetűen mutatja, hogy a direkt penetrációhoz egy bizonyos peptidkoncentráció szükséges, és az alatt nem valósul meg. Hexaarginin esetén ez az érték 5-10 μM közé esett, ha azonban a peptid N-terminálisát Dabcyl csoporttal módosítottuk, akkor lecsökkent 5 μM alá.

A peptidek sejtbejutásának időfüggését vizsgálva elmondhatjuk, hogy a folyamat nagyon gyors, a peptid már rövid időn belül (1,5 perc) bejut a sejtbe, és ott diffúz eloszlást mutat (3.a ábra).

Ha a sejteket EIPA-val (5-(N-etil-N-isopropil)amilorid), egy jól ismert makropinocitózis gátlóval előkezeltük, akkor mind a sejtbejutás sebessége, mind mértéke jelentősen csökkent (3.b ábra). 4 perc után jelent meg a peptid a sejten

belül, és jelentősen gyengébb fluoreszcencia intenzitást kaptunk. Hasonló eredményt hozott, ha a kezelést 4 °C-on végeztük. Hosszabb idő elteltével jutott be a peptid a sejtekbe és kisebb fluoreszcencia jelet detektáltunk (3.c ábra). Mindez azt jelenti, hogy a Dabcyl csoport fokozza a hexaarginin sejtbejutását, de nem változtatja meg annak módját. Akárcsak az oktaarginin [11], ez a származék is makropinocitózis által jut a sejtekbe.



3. ábra. A Dabcyl-Arg₆-Lys(Cf) peptid sejtfelvétele HeLa sejteken. HeLa sejteket inkubáltunk Dabcyl-Arg₆-Lys(Cf) peptiddel 5 μM-os koncentrációban α-MEM(-) médiumban **a)** 37 °C-on; **b)** makropinocitózis inhibitor előkezelést (EIPA, 100 μM, 30 perc) követően 37 °C-on; **c)** 4 °C-on. Lépték: 50 μm. (Cf: 5(6)-karboxifluoreszcein.)

Egy fluoriméterrel történő mérésen alapuló módszerrel pontosan meghatározható a sejtekbe jutott peptid mennyisége [12]. Ebben az esetben a sejteket a fluoreszcensen jelölt peptidekkel történő kezelés után lizáljuk, és a sejtlyázum fluoreszcencia intenzitásából egy kalibrációs görbe segítségével meghatározzuk a sejtekbe jutott peptid mennyiségét. CHO-K1 sejteket kezeltünk a peptidek különböző koncentrációjú oldataival 4 és 37 °C-on (1. táblázat) 60 percig. 4 °C-on nem játszódik le energiafüggő sejtbejutás, így a peptidek sejtbejutása nem valósulhat meg endocitózison keresztül, az csak direkt internalizációval történhet (1. táblázat, Transzlok.). Ezzel szemben 37 °C-on mind az endocitózis, mind a direkt internalizáció lejátszódhat (1. táblázat, n(peptid) (pmol) 37 °C-on).

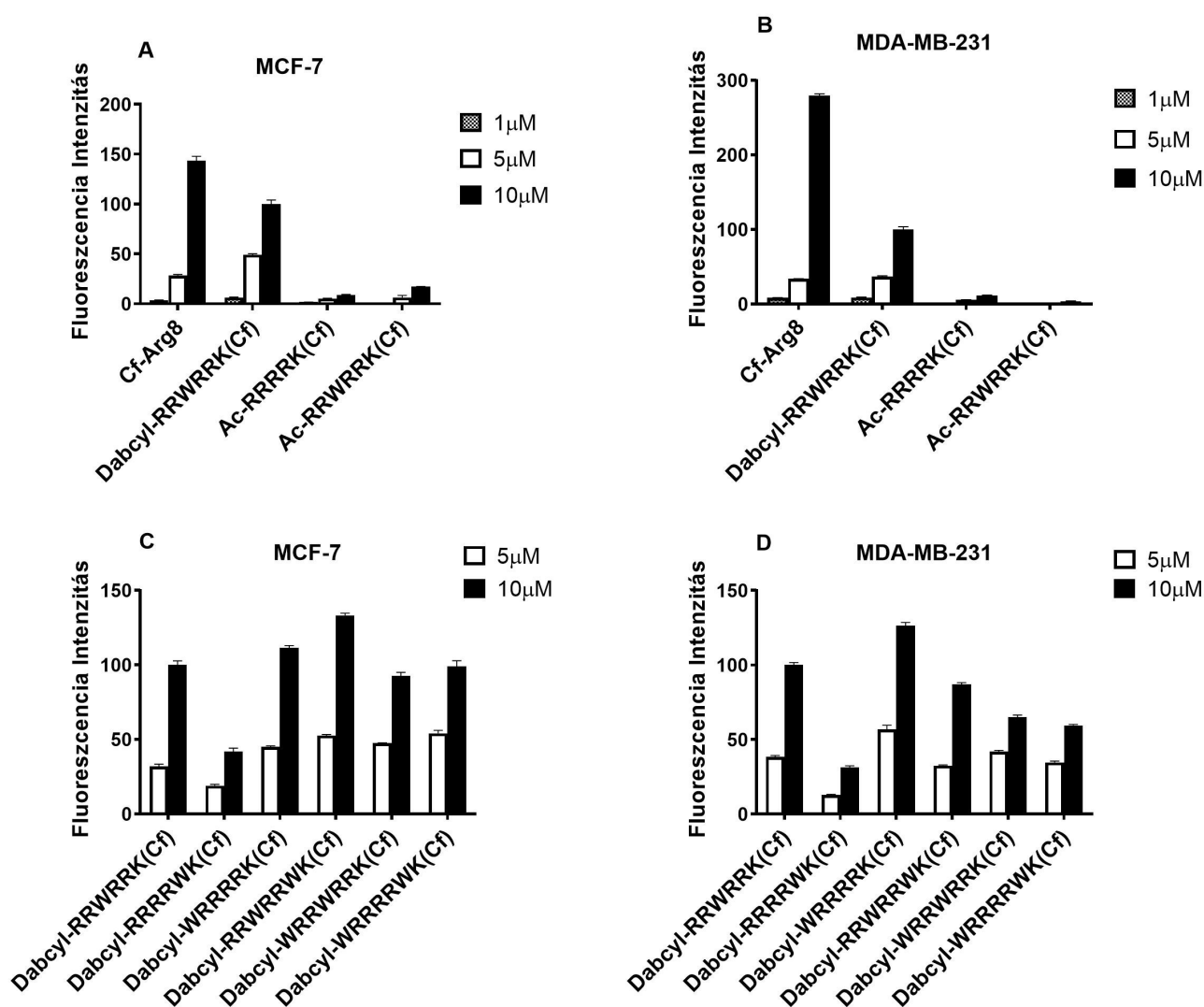
1. táblázat Dabcyl csoporttal módosított oligoargininek sejtbejutása

Peptid	c(peptid) (μM)	n(peptid) (pmol) 37 °C-on Endocit.+ Transzlok.	n(peptid) (pmol) 4°C-on Transzlok.	n(peptid) 4°C-on / n(peptid) 37°C-on
Dabcyl-Arg ₄ -Lys(Cf)-NH ₂	1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,06	0,57
	2,5	2,2 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,43
	5	7,8 ± 0,9	1,8 ± 0,1	0,22
	10	30 ± 3,3	4,2 ± 0,3	0,14
Dabcyl-Arg ₆ -Lys(Cf)-NH ₂	1	2,5 ± 0,2	0,6 ± 0,04	0,25
	2,5	24 ± 1,3	1,9 ± 0,3	0,08
	5	59 ± 2,5	6,1 ± 0,8	0,10
	10	149 ± 6	18 ± 2	0,12

A két érték arányából (1. táblázat, n(peptid) 4°C-on / n(peptid) 37°C-on) következtethetünk a direkt internalizáció sejtbejutásban játszott arányára. A tetra- és hexaarginin származékaival kapott eredményeket összehasonlítva érdekes összefüggést állapíthatunk meg. A hexaarginin esetében visszakaptuk a konfokális fluoreszcens mikroszkóppal látott eredményeket, azaz a koncentráció növekedésével nő a direkt internalizáció mértéke (kivéve 1 μM-nál). Tetraarginin esetén azonban azt tapasztaltuk, hogy alacsony koncentrációnál a direkt internalizáció jelentős szerepet játszik a sejtbejutásban, míg a koncentráció növekedésével ennek aránya csökken az endocitózissal szemben.

A fentiek alapján ezen tetraarginin származék ideális lehetne hatóanyagok

sejtbejuttatására, hiszen a direkt sejtbejutás elkerüli a vezikuláris becsapódást. Hogy tovább fokozzuk a hatékonyságát, további módosításokat próbáltunk ki. Az irodalomban számos példa van arra, hogy a Trp jelentős mértékben képes oligoargininek internalizációját fokozni [13]. Ezért mi is beépítettünk a tetraarginin származékunkba egy vagy két Trp egységet, távtartóval vagy anélkül [14]. Az egyes származékok hatékonyságának vizsgálatához MCF-7 és MDA-MB-231 sejteket kezeltünk a peptidek különböző koncentrációjú oldataival 90 percig, 37 °C-on, majd mértük a sejtek fluoreszcenciáját áramlási citometriával (4. ábra).



4. ábra. A DabcyI és Trp tartalmú tetraargininek sejtbejutása MCF-7 és MDA-MB-231 sejteken. A sejteket 1, 5 és 10 μM-os peptid oldatokkal inkubáltuk 90 percig 37 °C-on, majd tripszines kezelés után a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük. **A)** és **B)** a DabcyI csoport és Trp hatását, míg **C)** és **D)** a Trp helyzetének és számának a hatását mutatja be a sejtbejutásra. A fluoreszcencia intenzitásokat a DabcyI-RRWRRK(Cf) peptid 10 μM-ban mért fluoreszcencia intenzitásához (100%) viszonyítottuk.

MCF-7 esetében a mért fluoreszcencia intenzitások azt mutatták, hogy egy Trp beépítése a szekvencia közepére csak kismértékben fokozza a tetraarginin sejtbejutását, ha viszont a Dabcyl csoport is jelen van (Dabcyl-RRWRRK(Cf)), akkor kisebb koncentrációknál (1 és 5 μM) az oktaargininnél hatékonyabb, míg 10 μM -ban azzal összemérhető sejtpenetrációs képességet kaptunk (4.a ábra). Az MDA-MB-231 sejtekkel is hasonló eredményt kaptunk, azzal a különbséggel, hogy 10 μM -ban az oktaarginin 3-szor nagyobb internalizációt mutatott a Dabcyl-RRWRRK(Cf) peptidhez képest (4.b ábra). Tovább vizsgálva a Trp hatását megállapítottuk, hogy annak helyzete befolyásolja a sejtbejutás mértékét (4.c, d ábra). Ha az N-terminálisra, vagyis a Dabcyl csoporthoz közel helyeztük el, akkor kismértékű növekedést (10-25%), míg a C-terminálisra helyezve jelentős csökkenést (> 50%) mértünk a sejtbejutásban mindkét sejtvonalon. További Trp beépítése a szekvenciába – a két Trp helyzetétől függetlenül – vagy nem növelte jelentősen a sejtbejutást (Dabcyl-RRWRRWK (Cf) peptid MCF-7 sejteken, 4.c ábra), vagy csökkenést eredményezett az internalizáció mértékében (mindegyik származék MDA-MB-231 sejteken, 4.d ábra). A két hatékony származék sejtbejutását CHO sejteken is vizsgáltuk a korábban már említett fluorimetriás módszerrel (2. táblázat).

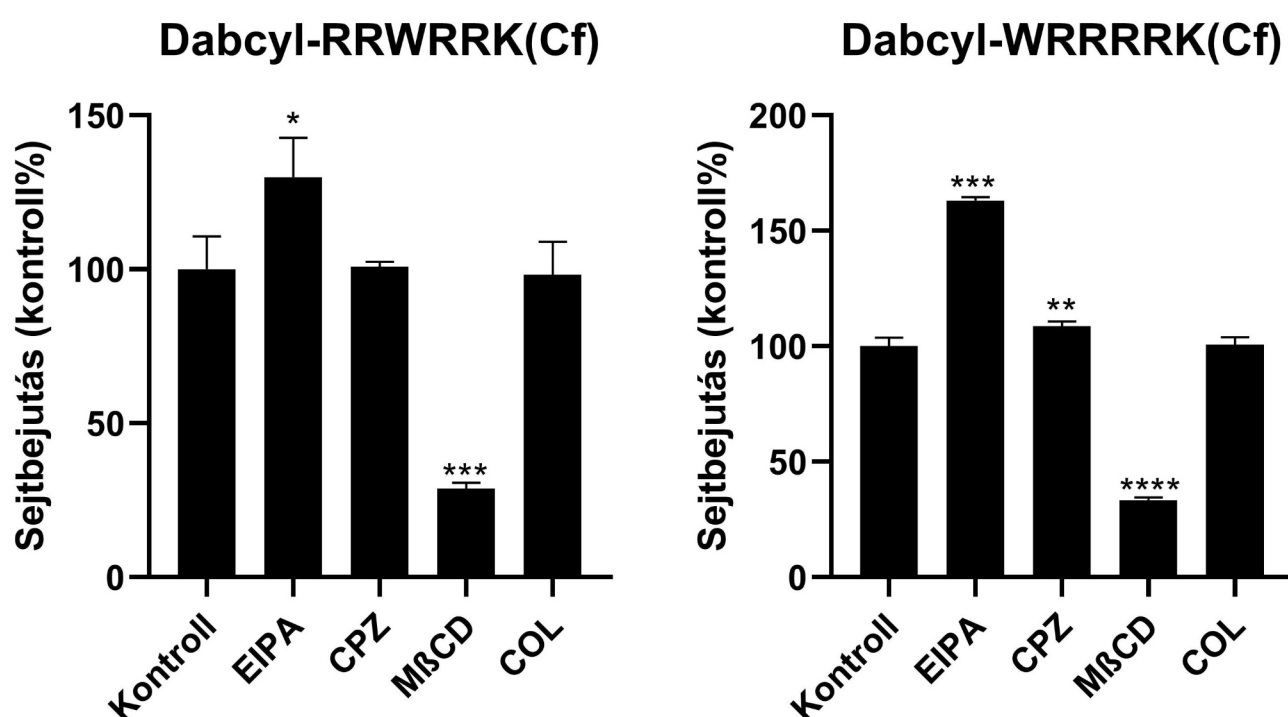
2. táblázat Dabcyl-RRWRRK(Cf) és Dabcyl-WRRRRK(Cf) peptidek sejtbejutása

Peptid	c(peptid) (μM)	n(peptid) (pmol) 37 °C-on Endocit.+ Transzlok.	n(peptid) (pmol) 4°C-on Transzlok.	n(peptid) 4°C-on / n(peptid) 37°C-on
Dabcyl-Arg ₂ -Trp-Arg ₂ -Lys(Cf)-NH ₂	1	2,2 ± 0,4	1,8 ± 0,3	0,82
	2,5	12 ± 2,5	7,5 ± 1,3	0,63
	5	37 ± 5	14 ± 1,9	0,38
	10	123 ± 16	25 ± 2,7	0,20
Dabcyl-Trp-Arg ₄ -Lys(Cf)-NH ₂	1	8 ± 1	2,4 ± 0,3	0,30
	2,5	25 ± 4	10 ± 1,8	0,40
	5	83 ± 16	19 ± 2	0,23
	10	270 ± 68	50 ± 8	0,19

Ezen a sejtvonalon a Trp különböző helyzete nagyobb különbséget eredményezett. Ha a Trp a peptid N-terminálisára került beépítésre, akkor 2-szer hatékonyabb internalizációt mértünk minden koncentrációban (2. táblázat). Habár a Dabcyl-RRWRRK(Cf) peptid kisebb mértékű sejtbejutást mutatott, annak mértéke megegyezett a korábban hasonló sejtvonalon vizsgált Dabcyl-

RRRRRRK(Cf) peptidével (1. táblázat). További érdekes megfigyelés volt a peptidekkel kapcsolatban, hogy a sejtbejutásukban jelentős mértékű a direkt internalizáció. A Dabcyl-RRWRRK(Cf) peptid esetén alacsony koncentrációban szinte kizárólag a direkt internalizáció a fő útvonal. Így elmondhatjuk, hogy a Dabcyl-Arg₄-Lys(Cf) sejtbejutását a Trp beépítése jelentősen növeli úgy, hogy közben a direkt internalizáció nyújtotta előnyét nem rontja, sőt még fokozza is.

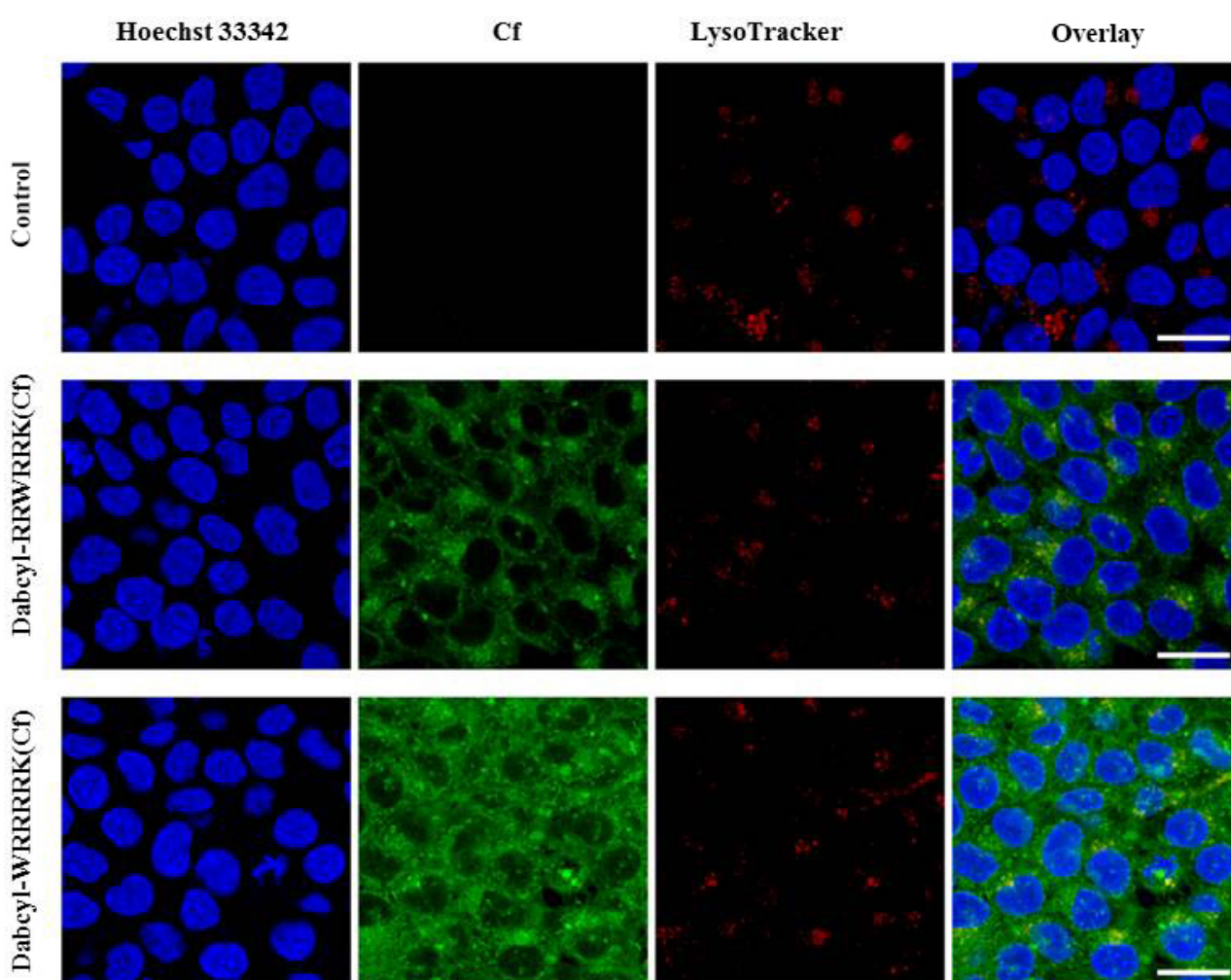
Mivel mindkét peptid sejtbejutásában szerepet játszik valamilyen endocitózis, inhibitorok segítségével vizsgáltuk a különböző endocitózis útvonalak lehetséges szerepét (5. ábra).



5. ábra. Különböző endocitózist gátló szerek hatása a peptidek sejtbejutására. MDA-MB-231 sejteket kezeltünk 5-(N-etil-N-isopropil)amilorid (EIPA, 50 μ M), klórpromazin (CPZ, 30 μ M), metil- β -ciklodextrin (M β CD, 5 mM) és kolchicin (COL, 20 μ M) oldatával 30 percig, majd a peptidek 5 μ M-os oldataival 90 percig. A sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával vizsgáltuk. A kontrolltól való szignifikáns eltérést Student t-tesztel vizsgáltuk (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ és ****: $p < 0,0001$).

A különböző inhibitorok közül csak a metil- β -ciklodextrin (M β CD) eredményezett szignifikáns csökkenést a peptidek sejtbejutásában. A membrán koleszterin tartalmának elvonásával ez a vegyület gátolja a kaveloa/lipid-raft-mediált endocitózist. Sem az EIPA (makropinocitózis inhibitor), sem a klórpromazin (CPZ, klatrin-mediált endocitózis inhibitor), sem a kolchicin (COL, mikrotubulus polimerizációt gátló anyag) nem csökkentette szignifikánsan a sejtbejutott peptidek mennyiségét egyik peptid esetében sem. Az M β CD által lecsökkentett

fluoreszcencia intenzitás aránya (DabcyI-WRRRR-K(Cf): 28,8% és DabcyI-RRWRR-K(Cf): 33,5%) megfelel a fluorimetriás mérések során tapasztalt endocitózis/direkt internalizáció arányának. Elmondhatjuk tehát, hogy mindkét peptid esetén a direkt internalizáció mellett fellépő vezikuláris transzportban az endocitózis kaveloa/lipid-raft-mediált változata vesz részt. Habár az endocitózis általi sejtbejutás gyakran rontja a CPP-nek, mint hatóanyag szállító rendszereknek a hatékonyságát, ez a változata azzal az előnnyel járhat, hogy a keletkező vezikulák elkerülik a lizoszómát, és tartalmukat inkább a Golgi-készülékbe vagy az endoplazmatikus retikulumba szállítják, ahonnan a hatóanyag bomlás nélkül kiszabadulhat.



6. ábra. DabcyI-RRWRRK(Cf) és DabcyI-WRRRRK(Cf) peptidek sejtbejutása MDA-MB-231 sejteken. A sejteket a peptidek 5 μM -os oldataival inkubáltuk 1 órán keresztül (zöld), a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel festettük meg (kék), a lizoszómákat LysoTracker Deep Red festékkel jelöltük (piros). Lépték: 20 μm .

A két peptid sejten belüli eloszlásának vizsgálatához MDA-MB-231 sejteket inkubáltunk a peptidek 5 μM -os oldataival, majd fixálás után vizsgáltuk

konfokális fluoreszcens mikroszkóppal (6. ábra). Mindkét peptid esetén jelentős sejtbejutást tapasztaltunk, de a Dabcyl-WRRRRK(Cf) peptiddel kezelt sejtek erősebb fluoreszcenciát mutattak. Mindkét esetben megfigyelhető volt diffúz és pontszerű eloszlás, utalva a direkt és az endocitózis útján történő internalizációra. A sejtmagot jelölve, jól látható volt, hogy a sejtmag kék és a sejtből lévő peptid zöld fluoreszcens jele nem mutatott kolokalizációt, azaz elmondható, hogy egyik peptid sem lokalizálódott a sejtmagban.

Eredmények megbeszélése

A megfelelő hosszúságú oligoargininek hatékonyan képesek sejtekbe bejutni, és széleskörűen alkalmazott peptidek a legkülönbözőbb hatóanyagok sejtbejutására. A rövidebb származékaik – tetra-, hexaarginin – csak kismértékű internalizációra képesek. Oktaarginin esetén számos kémiai módosítással sikerült fokozni a sejtbejutást. Kutatásaink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a Dabcyl csoport, egy gyakran alkalmazott fluoreszcenciát elnyelő molekula FRET párokban, képes-e fokozni rövid oligoargininek sejtbejutását. Eredményeink azt mutatták, hogy mind a tetraarginin, mind a hexaarginin sejtbejutását fokozta, de a hexaarginin (Dabcyl-RRRRRRK(Cf)) esetén ez a hatás sokkal jelentősebb volt, még az oktaargininnél is hatékonyabb peptidet kaptunk (1. ábra). A sejten belüli eloszlása azt mutatta, hogy ez a peptid már alacsony koncentrációban is jelentős direkt internalizációra képes (2. ábra), és az emellett fellépő energiafüggő sejtbejutás makropinocitózis útján valósul meg (3. ábra). A makropinocitózis a fő útvonal az oktaarginin sejtbejutásában is [11]. A konfokális fluoreszcens mikroszkóppal kapott képeken (2. ábra) jól látható, hogy már alacsony koncentrációnál fellép a közvetlen sejtbejutás. Elmondható tehát, hogy a Dabcyl csoport jelentős mértékben fokozza a hexaarginin sejtbejutását úgy, hogy a fő internalizációs utat nem változtatja meg.

A peptidekkel kezelt sejtek lizátumának fluorimetriás vizsgálata azt mutatta, hogy habár a tetraarginin származék (Dabcyl-RRRRK(Cf)) kevésbé képes bejutni a sejtekbe, a Dabcyl-RRRRRRK(Cf) peptidhez képest jelentős direkt internalizációt mutatott alacsony koncentrációban (1. táblázat). Ez nagyon előnyös tulajdonság, és úgy látszik, az arginin egységek számának csökkentése a Dabcyl csoport jelenlétében képes fokozni a közvetlen sejtbejutás arányát. Ezzel párhuzamosan azonban a bejutott peptid mennyisége is nagymértékben csökkent. Irodalmi adatok alapján, melyek azt mutatták, hogy a Trp képes fokozni oligoargininek sejtbejutását [13], a Dabcyl-RRRRK(Cf) peptidbe egy Trp építettünk (Dabcyl-RRWRRK(Cf)). Ekkor jelentősen megnövelt sejtbejutást

mértünk (4. ábra). A Trp hatása helyzetfüggő volt, az N-terminálisra helyezve (Dabcyl-WRRRRK(Cf)) hatékonyabb peptidet kaptunk, míg a C-terminális helyzetben (Dabcyl-RRRRWK(Cf)) sokkal kisebb mértékű internalizációt eredményezett (4. ábra). Fluorimetriás mérések azt mutatták, hogy az internalizáció növelésével egyidejűleg a közvetlen sejtbejutás magas arányát is sikerült megőriznünk, ami a Dabcyl-RRWRRK(Cf) peptid estén volt kiugróan magas (2. táblázat). Ezen peptidek sejtbejutásában a közvetlen internalizáció mellett a kaveola/lipid-raft-mediált endocitózis játszik szerepet (5. ábra). Ez a fajta endocitózis lehetővé teszi, hogy a sejtbejutás után a peptid és szállítmánya elkerülje a lizoszómát, és a Golgi-készüléken vagy az endoplazmatikus retikulumon keresztül a citoszolba kerüljön.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a Dabcyl csoport képes megnövelni oligoargininek sejtbejutását, de a hatékony peptidhez megfelelő számú arginin egységre van szükség (a hexaarginin hatékony volt, míg a tetraarginin nem). Emellett nem változtatta meg az eredeti peptid sejtbejutásának mechanizmusát, az továbbra is makropinocitózissal jutott be a sejtekbe a közvetlen internalizáció mellett. Megfigyeltük továbbá, hogy Dabcyl csoport mellett Trp beépítése már rövid oligoarginin (tetraarginin) esetén is hatékony sejtpenetráló peptidet eredményez, úgy, hogy jelentős mértékű közvetlen internalizációt tapasztalunk, és emellett már nem makropinocitózis, hanem a hatóanyagszállítás esetén hatékonyabb kaveola/lipid-raft-mediált endocitózis valósul meg. Eredményeink felhasználásával lehetőség nyílna peptidek, fehérjék egyszerű módosítására sejtbejutásuk fokozása érdekében.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal az ELTE 2020 Kiválósági programján keresztül - TKP2020-IKA-05, a Tempus Közalapítvány Stipendium Hungaricum ösztöndíja; a Magyar-Francia (2018-2.1.13-TÉT-FR-2018-00007) és a Magyar-Japán (TÉT_12_JP-1- 2014-0023) Tét program, valamint a Versenyképes Közép-Magyarországi Operatív Program (VEKOP-2.3.3-15-2017-00020).

Irodalomjegyzék

- [1] Liu, G., Yang, L., Chen, G., Xu, F., Yang, F., Yu, H., Li, L., Dong, X., Han, J., Cao, C., Qi, J., Su, J., Xu, X., Li, X., Li, B. (2021) A Review on Drug Delivery System for Tumor Therapy. *Front Pharmacol*, **12**: 735446.
- [2] Allahou, L. W., Madani, S. Y., Seifalian, A. (2021) Investigating the

- Application of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Int J Biomater*, **2021**: 3041969.
- [3] Vrettos, E. I., Mező, G., Tzakos, A. G. (2018) On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site. *Beilstein J Org Chem*, **14**: 930–954.
- [4] Hudecz, F., Bánóczy, Z., Csík, G. (2005) Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. *Med Res Rev*, **25**: 679–736.
- [5] Ruseska, I., Zimmer, A. (2020) Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J Nanotechnol*, **11**: 101–123.
- [6] Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, **276**: 5836–5840.
- [7] Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., Rothbard, J. B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*, **56**: 318–325.
- [8] Szabó, I., Illien, F., Dókus, L. E., Yousef, M., Baranyai, Z., Bősze, S., Ise, S., Kawano, K., Sagan, S., Futaki, S., Hudecz, F., Bánóczy, Z. (2021) Influence of the DabcyI group on the cellular uptake of cationic peptides: short oligoarginines as efficient cell-penetrating peptides. *Amino Acids*, **53**: 1033–1049.
- [9] Katayama, S., Hirose, H., Takayama, K., Nakase, I., Futaki, S. (2011) Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J Control Release*, **149**: 29–35.
- [10] Amoura, M., Illien, F., Joliot, A., Guitot, K., Offer, J., Sagan, S., Burlina, F. (2019) Head to tail cyclisation of cell-penetrating peptides: Impact on GAG-dependent internalisation and direct translocation. *Chem Commun*, **55**: 4566–4569.
- [11] Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., Futaki, S. (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*, **46**: 492–501.
- [12] Illien, F., Rodriguez, N., Amoura, M., Joliot, A., Pallerla, M., Cribier, S., Burlina, F., Sagan, S. (2016) Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: Optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification. *Sci Rep*, **6**: 36938.

- [13] Walrant, A., Bauzá, A., Girardet, C., Alves, I. D., Lecomte, S., Illien, F., Cardon, S., Chaianantakul, N., Pallerla, M., Burlina, F., Frontera, A., Sagan, S. (2020) Ionpair- π interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*, **1862**: 183098.
- [14] Yousef, M., Szabó, I., Biri-Kovács, B., Szeder, B., Illien, F., Sagan, S., Bánóczy, Z. (2021) Modification of Short Non-Permeable Peptides to Increase Cellular Uptake and Cytostatic Activity of Their Conjugates. *ChemistrySelect*, **6**: 10111–10120.



Bánóczy Zoltán 2003-ban szerzett okleveles vegyész diplomát az Eötvös Loránd Tudományegyetemen. PhD fokozatát szintén az ELTE Kémiai Doktori Iskolájában szerezte 2007-ben. A doktori kutatásait az MTA-ELTE Peptid-kémiai Kutatócsoportban végezte Hudecz Ferenc témavezetésével. Jelenleg az ELTE Kémiai Intézetének adjunktusa. Fő kutatási területe sejtpenetráló-peptidek és biokonjugátumaiknak szintézise és vizsgálata, mely témában több Q1-es cikke jelent meg. Az utóbbi időben a peptidkémia mellett érdeklődik és foglalkozik ferrocén tartalmú, remélhetőleg biológiai aktivitással rendelkező kismolekulák szerves szintézisével is.

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.

Az „Áttekintő közlemények az MBKE tagjainak tollából” című rovatban a megjelenés formája az első oldal pdf változata (amennyiben ezt a folyóirat engedi) és egy, a cikkhez vezető link.

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

A beküldés folyamatos.

A Biokémia szerkesztőbizottsága

**ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK
AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL**
(Szerkesztette: Sarkadi Balázs)

**A szerzők által 2022. január – március között beküldött cikkek
(a közlemények első oldala is mellékelve):**

Kovács T, Mikó E, Ujlaki G, Yousef H, Csontos V, Uray K, Bai P (2021) The involvement of oncobiosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer. *Cancer and Metastasis* 40(4):1223-1249
IF:9,246. Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-021-10013-3>

Sebestyén A, Dankó T, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petővári G (2021) The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev* 40(4):989-1033. doi: 10.1007/s10555-021-10006-2. Epub 2022 Jan 14. IF:9,246. Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-021-10006-2>

Szántó M, Gupte R, Kraus LW, Pacher P, Bai P (2021) PARPs in lipid metabolism and related diseases. *Progress in Lipid Research* 84:101117 IF:16,195. Link: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782721000333?via%3Dihub>



The involvement of oncobiosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer

Tünde Kovács¹ · Edit Mikó¹ · Gyula Ujlaki¹ · Heba Yousef¹ · Viktória Csontos¹ · Karen Uray¹ · Peter Bai^{1,2,3}

Received: 12 October 2021 / Accepted: 15 December 2021 / Published online: 30 December 2021
 © The Author(s) 2021

Abstract

Breast cancer, the most frequent cancer in women, is characterized by pathological changes to the microbiome of breast tissue, the tumor, the gut, and the urinary tract. Changes to the microbiome are determined by the stage, grade, origin (NST/lobular), and receptor status of the tumor. This year is the 50th anniversary of when Hill and colleagues first showed that changes to the gut microbiome can support breast cancer growth, namely that the oncobiome can reactivate excreted estrogens. The currently available human and murine data suggest that oncobiosis is not a cause of breast cancer, but can support its growth. Furthermore, preexisting dysbiosis and the predisposition to cancer are transplantable. The breast's and breast cancer's inherent microbiome and the gut microbiome promote breast cancer growth by reactivating estrogens, rearranging cancer cell metabolism, bringing about a more inflammatory microenvironment, and reducing the number of tumor-infiltrating lymphocytes. Furthermore, the gut microbiome can produce cytostatic metabolites, the production of which decreases or blunts breast cancer. The role of oncobiosis in the urinary tract is largely uncharted. Oncobiosis in breast cancer supports invasion, metastasis, and recurrence by supporting cellular movement, epithelial-to-mesenchymal transition, cancer stem cell function, and diapedesis. Finally, the oncobiome can modify the pharmacokinetics of chemotherapeutic drugs. The microbiome provides novel leverage on breast cancer that should be exploited for better management of the disease.

Keywords Breast cancer · Oncobiome · Oncobiosis · Inflammation · Metastasis · Bacterial metabolite

1 Introduction

Dysbiosis is an abnormal adaptation of the microbiome, characterized by abnormal microbial composition and function. Neoplastic diseases are characterized by dysbiosis that is coined oncobiosis [1]. The microbiome that is undergoing oncobiome transformation is termed the oncobiome. Oncobiosis occurs in multiple neoplasias, including breast cancer, and oncobiosis may have a pathogenic role in these cancers [2–8]. In this review, we will dissect the microbiome-elicited

pathways and discuss how these pathways protect against metastasis formation in breast cancer.

Breast cancer is the most frequent cancer among women and is the leading cause of cancer-related deaths in women [9, 10]. Nevertheless, in developed countries, the 5-year survival of breast cancer is above 80% due to population-wide screening programs and the consequent early identification [11]. Although several risk factors were identified that increase the risk for breast cancer, most newly diagnosed patients have no obvious risk factors [12]. The risk for breast cancer increases with age, and most breast cancer patients are diagnosed in their 50 s after menopause. Extended exposure to female hormones due to hormone-replacement therapy, early menarche, and late menopause are risk factors for breast cancer [12]. BRCA1 and BRCA2 genes were identified as genetic risk factors for breast cancer, although mutation carriers represent a minority among breast cancer patients [13]. A family history of breast cancer or neoplasias is also a risk factor for breast cancer [12] and dense breast [14, 15]. Successful pregnancies, lactation, and physical activity are protective factors against the disease

✉ Peter Bai
 baip@med.unideb.hu

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

² MTA-DE Lendület Laboratory of Cellular Metabolism, Debrecen 4032, Hungary

³ Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen 4032, Hungary



The role of metabolic ecosystem in cancer progression — metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues

Anna Sebestyén¹ · Titanilla Dankó¹ · Dániel Sztankovics¹ · Dorottya Moldvai¹ · Regina Raffay¹ · Catherine Cervi¹ · Ildikó Krencz¹ · Viktória Zsiros² · András Jeney¹ · Gábor Petővári¹

Received: 6 October 2021 / Accepted: 26 November 2021 / Published online: 14 January 2022
 © The Author(s) 2021

Abstract

Despite advancements in cancer management, tumor relapse and metastasis are associated with poor outcomes in many cancers. Over the past decade, oncogene-driven carcinogenesis, dysregulated cellular signaling networks, dynamic changes in the tissue microenvironment, epithelial-mesenchymal transitions, protein expression within regulatory pathways, and their part in tumor progression are described in several studies. However, the complexity of metabolic enzyme expression is considerably under evaluated. Alterations in cellular metabolism determine the individual phenotype and behavior of cells, which is a well-recognized hallmark of cancer progression, especially in the adaptation mechanisms underlying therapy resistance. In metabolic symbiosis, cells compete, communicate, and even feed each other, supervised by tumor cells. Metabolic reprogramming forms a unique fingerprint for each tumor tissue, depending on the cellular content and genetic, epigenetic, and microenvironmental alterations of the developing cancer. Based on its sensing and effector functions, the mechanistic target of rapamycin (mTOR) kinase is considered the master regulator of metabolic adaptation. Moreover, mTOR kinase hyperactivity is associated with poor prognosis in various tumor types. *In situ* metabolic phenotyping in recent studies highlights the importance of metabolic plasticity, mTOR hyperactivity, and their role in tumor progression. In this review, we update recent developments in metabolic phenotyping of the cancer ecosystem, metabolic symbiosis, and plasticity which could provide new research directions in tumor biology. In addition, we suggest pathomorphological and analytical studies relating to metabolic alterations, mTOR activity, and their associations which are necessary to improve understanding of tumor heterogeneity and expand the therapeutic management of cancer.

Keywords Metabolic heterogeneity · Metabolic plasticity · Metabolic phenotypes · mTOR hyperactivity · Cancer

1 Introduction

Metabolic alterations and bioenergetic adaptation mechanisms are essential components of the metabolic ecosystem and play a key role in cancer progression. In the past two decades, considerable advancements have been achieved in this field of research. *Warburg* and *Minami* were the first to describe altered tumor metabolism in 1923 [1]. Approximately one century later, metabolic symbiosis of tumor tissues, including alterations within the tumor microenvironment, were highlighted among the main hallmarks of cancer [2]. The term “Warburg effect” was coined in the 1970s, referring to rapid glucose uptake and high-rate lactate secretion into the tumor microenvironment (increased acidification). This fundamental feature of the anabolic processes is necessary for cancer progression and tumor cell proliferation, where the conversion of glucose to lactate provides a

The included figures were created with BioRender (<https://biorender.com>) covered by 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research institutional license.

✉ Anna Sebestyén
 sebestyen.anna@med.semmelweis-univ.hu;
 hsebanna@gmail.com

¹ 1St Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, 1085 Budapest, Hungary

² Department of Anatomy, Histology and Embryology, Semmelweis University, Tüzoltó utca 58, 1094 Budapest, Hungary



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Lipid Research

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



Review

PARPs in lipid metabolism and related diseases

Magdolna Szántó^a, Rebecca Gupte^{b,c}, W. Lee Kraus^{b,c}, Pal Pacher^{d,**,1}, Peter Bai^{a,e,f,*}

^a Department Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032, Hungary

^b Laboratory of Signaling and Gene Regulation, Cecil H. and Ida Green Center for Reproductive Biology Sciences, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

^c Division of Basic Research, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

^d National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

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

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



ARTICLE INFO

Keywords:

PARP
ARTD
cholesterol
triglyceride
polyunsaturated fatty acid
HDL
LDL
SREBP
ACAT1
ABCA1

ABSTRACT

PARPs and tankyrases (TNKS) represent a family of 17 proteins. PARPs and tankyrases were originally identified as DNA repair factors, nevertheless, recent advances have shed light on their role in lipid metabolism. To date, PARP1, PARP2, PARP3, tankyrases, PARP9, PARP10, PARP14 were reported to have multi-pronged connections to lipid metabolism. The activity of PARP enzymes is fine-tuned by a set of cholesterol-based compounds as oxidized cholesterol derivatives, steroid hormones or bile acids. In turn, PARPs modulate several key processes of lipid homeostasis (lipotoxicity, fatty acid and steroid biosynthesis, lipoprotein homeostasis, fatty acid oxidation, etc.). PARPs are also cofactors of lipid-responsive nuclear receptors and transcription factors through which PARPs regulate lipid metabolism and lipid homeostasis. PARP activation often represents a disruptive signal to (lipid) metabolism, and PARP-dependent changes to lipid metabolism have pathophysiological role in the development of hyperlipidemia, obesity, alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease, type II diabetes and its

Abbreviations: ABCA1, ATP-binding cassette sub-family A Member 1; ACAT1, Mitochondrial acyl-coenzyme A/cholesterol acyltransferase-1; ACBD3, Acyl-CoA-binding domain containing 3; ADPR, ADP-ribose; AFLD, Alcoholic fatty liver disease; AHR, Aryl hydrocarbon receptor; ALDH2, Aldehyde dehydrogenase 2; AMPK, AMP-activated protein kinase; ApoB, Apolipoprotein B; AR, Androgen receptor; ARH3, ADP-ribosyl-acceptor hydrolase-3; ARTs, ADP-ribosyl transferases; ARTD, Diphtheria toxin-like ADP-Ribosyltransferases; C/EBP α , CCAAT-enhancer-binding protein alpha; cyp, Cytochrome P450; DGAT, Diacylglycerol O-acyltransferase; DHT, dihydrotestosterone; EBF, Early B cell factor; EMA, European Medicines Authority; eNOS, Endothelial nitrogen oxide synthase; EPHX1, Microsomal epoxide hydrolase; ER α , Estrogen receptor alpha; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; FABP7, Fatty acid binding protein 7; FDA, Food and Drug Administration; FoxO1, Forkhead transcription factor O1; GATA, GATA-binding factor; GLP-1, Glucagon-like peptide-1; Glut4, Glucose transporter-4; GR, Glucocorticoid receptor; hADMSC, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; HCD, High cholesterol diet; HDAC, Histone deacetylase; HDL, High density lipoprotein; HFD, High-fat diet; HFRD, High fructose diet; HNF4, Hepatocyte nuclear factor 4; HPP1, Histone PARylation factor 1; Hsd17b11, Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11; H2BE35, Histone H2B on glutamate 35; IDL, Intermediate density lipoprotein; IGF-1, Insulin-like growth factor-1; iNOS, Inducible nitrogen oxide synthase; InsR, Insulin receptor; iPSCs, Induced pluripotent stem cells; IRF, Interferon-regulatory factor; JNK, Jun kinase; KLF, Krüppel-like factor; LDL, Low density lipoprotein; LPS, Bacterial lipopolysaccharide; LXR, Liver X receptor; MARYlation, Mono(ADP-ribosylation); MCD, Methionine-choline deficient; mTORC1/2, Mammalian/mechanistic Target of Rapamycin Complex 1/2; NAD⁺, Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease; NASH, Non-alcoholic steatohepatitis; NCoR-1, Nuclear Receptor Corepressor 1; NEFA, Non-esterified fatty acids; NF- κ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NMN, Nicotinamide mononucleotide; HIF, hypoxia inducible factor; NMNAT, Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenyllyltransferase; NOR1, Neuron-derived orphan receptor 1; NOx, Nitrogen oxides; NR, Nuclear receptor; oxLDL, Oxidized LDL; OXPHOS, Oxidative phosphorylation; PAR, poly(ADP-ribose); PARG, Poly(ADP-ribose) glycohydrolase; PARPi, PARP inhibitor; PARylation, Poly(ADP-ribosylation); PPAR α , Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPAR γ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PR, Progesterone receptor; P-Sel, P-selectin; PTMs, Post-translational modifications; RXR α , Retinoid X-receptor alpha; SAHA, Suberoylanilide hydroxamic acid; snRNAs, Short nucleolar RNAs; SNP, Single nucleotide polymorphism; Srd5a1, 5 α -reductase; SREBP, Sterol regulatory-element binding protein; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; STAT, Signal transducer and activator of transcription; TC, Total cholesterol; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TF, Transcription factors; TG, Serum triglyceride; TLR2, Toll-like receptor-2; TNF α , Tumor necrosis factor α ; TNKS, Tankyrase; TRPM2, Transient receptor potential M2; UCP, Uncoupling protein; V-Cam, Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106); VLDL, Very low density lipoprotein; VPA, Valproic acid; WAT, White adipose tissue; WHO, World Health Organization; 7KC, 7-ketocholesterol; 15-HC, 15 α -hydroxicholestene.

* Correspondence to: Peter Bai, University of Debrecen, Department of Medical Chemistry, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary.

** Correspondence to: Pal Pacher, NIAAA/NIH, 5625 Fishers Lane, Room 2N-17, Rockville, MD 20852, USA.

E-mail addresses: pacher@nih.gov (P. Pacher), baip@med.unideb.hu (P. Bai).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101117>

Received 11 June 2021; Received in revised form 10 August 2021; Accepted 18 August 2021

Available online 25 August 2021

0163-7827/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A DNS-HIBAECKERÜLÉS GENOMI LENYOMATAINAK VIZSGÁLATA

Póti Ádám

**Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet,
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,
Szerkezeti Biokémia Program
e-mail: poti.adam@ttk.hu**

Témavezető: Dr. Szüts Dávid

Minden egyes sejt genomjában napi szinten több tízezer, különböző forrásból származó károsodás, vagy más néven DNS-lézió alakul ki, melyek különböző formákat vehetnek fel [1]. Az evolúció során létrejött számos DNS-hibajavító folyamat ellenére, ezek sokszor a DNS másolásáig fennmaradnak, és elakaszthatják a nagy specificitású, érzékeny replikatív DNS-polimerázokat, ami a replikációs villa eltörését, genomi átrendeződéseket, vagy a sejt halálát okozhatja [2]. Ennek megakadályozására alakult ki a DNS-hibaelkerülés folyamata [3], melynek két alapvető változata a transzléziós szintézis (TLS), mely specializált, a léziókat is felismerni képes, úgynevezett transzléziós polimerázokat alkalmaz, illetve a templátváltás és a homológ rekombináció (HR), melyek ideiglenesen az ép testvérkromatida szekvenciáját használják fel a károsodás kikerüléséhez. A párhuzamos útvonalak közötti választás legfontosabb faktora a replikációs villa egyik központi fehérjéjének, a PCNA-nak (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a poszttranszlációs módosítása, elsősorban nem-proteolitikus ubikvitinációja.

A transzléziós polimerázok legfontosabb jellemzője, hogy szerkezeti tulajdonságaik, például tágas szubsztrátkötő-zsebük és az „ellenőrző” 3'-5' exonukleáz-domének hiánya miatt sokkal megengedőbbek a templát-DNS bázisainak minőségével szemben [4]. Azonban éppen kevésbé szigorú másolási tulajdonságaik következtében gyakran a DNS információtartalmát megváltoztatva írják át a léziókat, azaz mutációkat okoznak. Ez igaz mind a külső DNS-károsító hatásokkal, mind pedig a sejtek spontán mutagenikus folyamataival kapcsolatban [5], sőt, ép DNS-en is alacsonyabb pontossággal rendelkeznek [6]. A transzléziós szintézisben résztvevő különféle polimerázoknak és szabályozó fehérjéknek a sejtekben megfigyelhető genomi változásokra kifejtett hatását már több mint fél évszázada tanulmányozzák, ám a teljes genom szintjén, élő sejtekben a jelenséget csak az elmúlt évtizedekben, az új-generációs szekvenálási technológiák széles körben elérhetővé válásával kezdték vizsgálni.

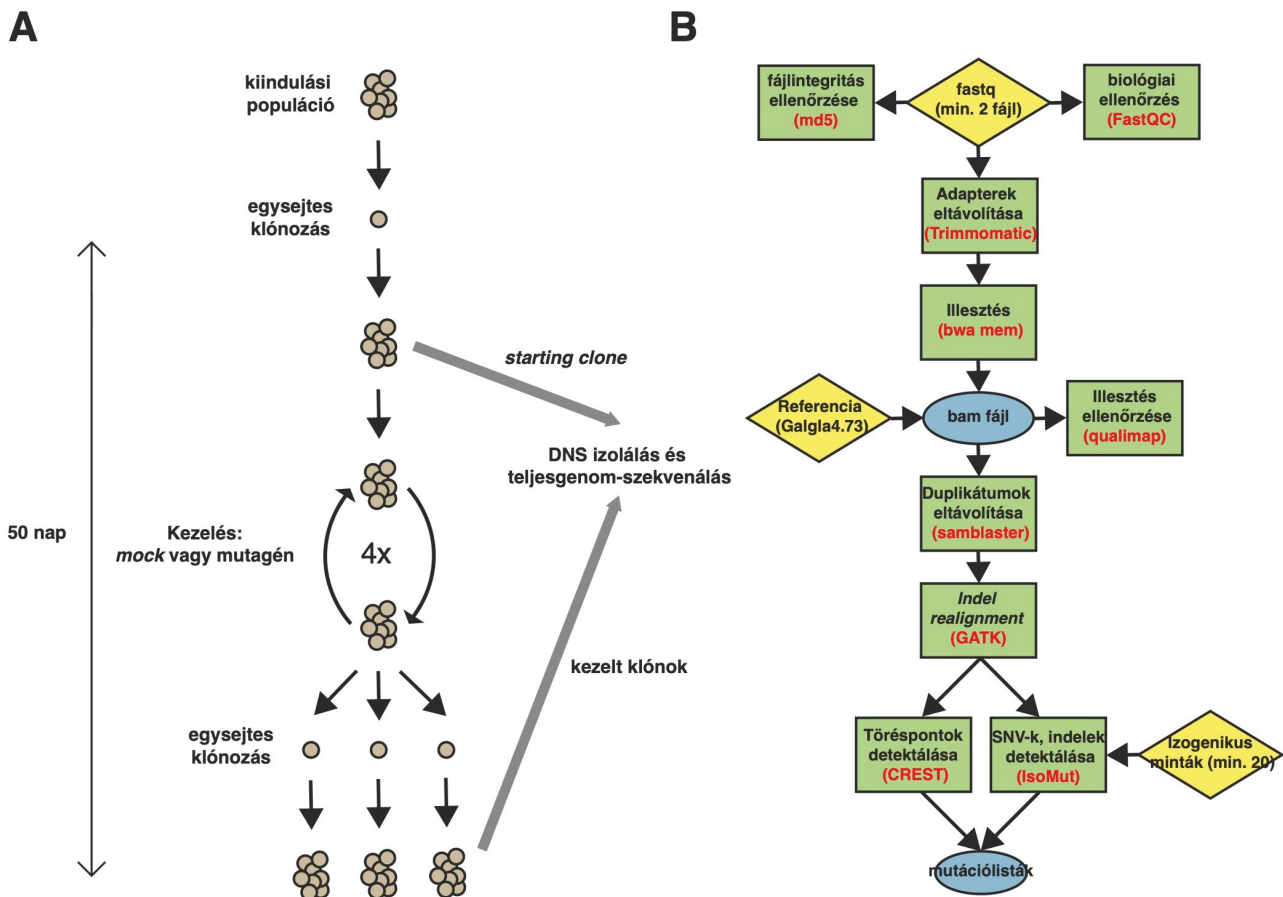
A genomban kialakuló mutációk fontosságát a daganatok genomjainak vizsgálata is bizonyítja: az elmúlt években több tízezer tumoros minta mutációinak matematikai elemzésével olyan mintázatokat (úgynevezett *signature*-öket) találtak [7], melyek utalhatnak a betegséget kiváltó külső vagy belső okokra, illetve az adott daganatra optimális kezelésekre is; ezek például a COSMIC Signatures adatbázisban [8] találhatóak meg. Számos ilyen mutációs mintázat eredetét azonban, noha konzisztensen kimutatható a jelenlétük, eddig nem sikerült felderíteni.

Az ilyen jellegű kérdések megválaszolására a genetikailag jól jellemzett sejtvonalak standardizált körülmények között történő mutagén kezelése, illetve az indukált genetikai változások teljesgenom-szekvenálással történő felderítése nyújthat lehetőséget. Doktori munkám alatt egy ilyen kísérletes és elemzési rendszer felállításában vettem részt, majd ennek segítségével vizsgáltam a DNS-hibaelkerülés által, különböző károsító hatások miatt kialakuló mutációkat és az azokból összeálló mintázatokat. Ezeket a mutagén folyamatokat három különböző megközelítésben vizsgáltam: elemeztem a külső DNS-károsító anyagok által kiváltott mutációs mintázatokat, vizsgáltam egyes DNS-hibaelkerülő folyamatok hiányában spontán kialakuló mutációkat, illetve jellemeztem a transzléziós szintézis által indukált léziók környezetében, ám ép DNS-en képződő, úgynevezett „járulékos” mutációkat.

Az elemzések lefolytatásához szükség volt egy olyan kísérletes, illetve bioinformatikai munkafolyamat kiépítésére, mely alkalmas az adott időtartam alatt indukálódó különböző mutációtípusok gyors és megbízható detektálására (1. ábra). Ennek a módszertani fázisnak elsősorban a második, *in silico* szakaszában vettem részt. Ennek során egyrészt részletesen feltérképeztük a kísérletek zömében felhasznált, házityúk limfoblasztóma eredetű DT40 sejtvonal genomját, másrészt pedig több különböző célú szoftver összehangolásával felállítottam egy, az általunk szekvenált, illetve adatbázisokból letöltött genomi minták előkészítését, elemzését és hosszútávú tárolását lehetővé tevő bioinformatikai rendszert. A folyamat egyik központi eleme a részben a kutatócsoportunk által fejlesztett IsoMut nevű szoftver, mely alkalmas akár 20-30 izogenikus mintában rövid idő alatt, nagy pontossággal megtalálni az egyedi mutációkat.

A külső hatások mutagén hatásaival kapcsolatban elsősorban a ciszplatin nevű kemoterápiás szert használtuk, melynek tumorellenes hatása legnagyobb

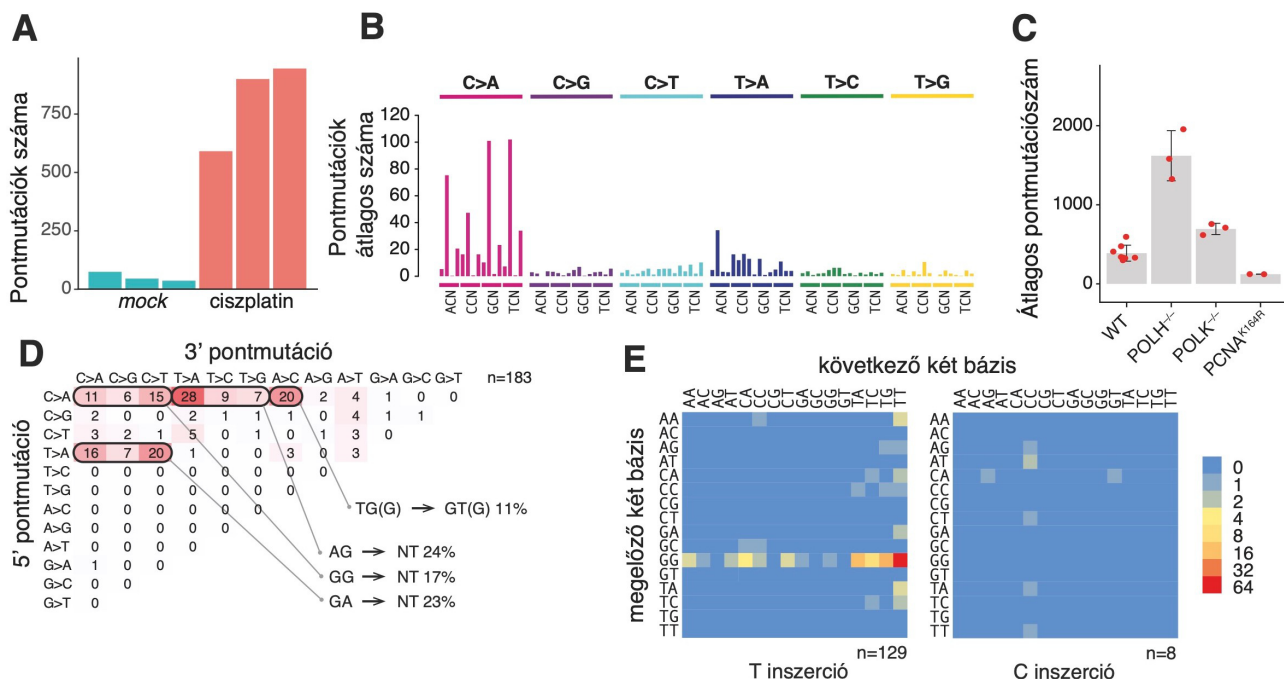
részben a genomi DNS szomszédos purinbázisainak szálon belüli kereszt-kötésein alapszik. Vadtípusú DT40 sejteken 50 nap alatt végrehajtott, az IC_{50} -nek megfelelő koncentrációjú ciszplatinnal történő kezelések után a kontrollhoz képest mind a pontmutációs ráta, mind a rövid indelek számának jelentős növekedését tapasztaltuk (2. ábra).



1. ábra. Az indukált mutációk kimutatására alkalmas munkafolyamat áttekintő sémája. A) Kísérletes szakasz. B) Bioinformatikai szakasz.

A vártak megfelelően a mutációk többnyire szomszédos purinoknál alakultak ki, és a leggyakoribb események A/G[G>T]N pontmutációk, GG[+1T]T inszerciók és GG és AG motívumokat érintő dinukleotid-mutációk voltak. Transzléziós szintézis génekre kiütött sejtek segítségével megmutattuk, hogy ezek a változások a PCNA ubikvitinációjától függenek, ám a közvetlenül felelős polimerázt nem találtuk meg. Összehasonlítva mások korábban publikált eredményeivel azt találtuk, hogy az általunk kimutatott mutációs mintázat mellett párhuzamosan egyéb mintázatok is megjelenhetnek, melyek sejtípustól függőek, és valószínűleg az eltérő DNS-hibajavítási útvonal-használatból adódnak.

Kutatócsoportunk egy korábbi publikációjában leírta [9], hogy a BRCA1^{-/-} vagy BRCA2^{-/-} DT40 sejtekben megemelkedett pontmutációs ráta tapasztalható, mely egy jellegzetes triplet spektrumot követ, és ez nagy hasonlóságot mutat a BRCA1/2 mutáns daganatokban tapasztalt COSMIC SBS3 *signature*-rel.



2. ábra. A cisplatin által indukált mutációk jellemzői. A) A cisplatin kezelés hatása a pontmutációk számára. **B)** A cisplatin-kezelt sejtekben tapasztalt triplet pontmutációs spektrum. **C)** Cisplatin által indukált mutációk száma TLS mutánsokban. **D)** A dinukleotid mutációk észlelt típusai. **E)** A cisplatin-indukálta inszerciók megoszlása a szomszédos bázisok szerint.

Doktori munkám során egy nem-negatív mátrix faktorizáció (NMF) nevű gépi tanulási módszert felhasználva bebizonyítottam, hogy a BRCA1/2 géneken kívül még számos, a homológia-alapú javításban részt vevő gén hiányában is a *signature* 3 jelenik meg (3. ábra). Egy CRISPR-Cas9 alapú kettősszál-törés esszé segítségével ki tudtam zárni, hogy ez a DNS töréseivel van összefüggésben, végül pedig BRCA1-re és különféle TLS-polimerázokra kettős mutáns sejtek spontán mutációinak vizsgálatával azt is megmutattuk, hogy a HR hiányában jelentkező mutációkat a transzléziós szintézis váltja ki.

Harmadik megközelítésként a TLS által ép DNS-en, nem célzottan kialakuló, „járulékos” mutációkat vizsgáltam DT40 sejt vonalak teljes genom-szekvenálási adataiban (4. ábra). Ehhez első megközelítésben az egymáshoz a vártnál közelebb eső pontmutációs párok számát tanulmányoztam különféle mutagén hatások következtében, és azt találtam, hogy ilyen események csak bizonyos

mutagén hatások után jelentkeznek (ciszplatin, UVC sugárzás, és a BRCA1^{-/-} genotípus). A ciszplatin és az UVC esetében jól elkülöníthetőek a karakterisztikus, közvetlenül a lézióknál képződő mutációk, és ez alapján az derült ki, hogy a mutációs párok egyik tagja legtöbbször egy lézióknál, míg a másik attól a polimeráz haladási iránya szerint *downstream* irányban, legfeljebb 30 bázispárnyira jelent meg. Genetikai megközelítéssel bizonyítottam, hogy a járulékos mutációkat a ciszplatin esetében a polimeráz κ nevű TLS polimeráz hozza létre, a PCNA ubikvitinációján közreműködésével. Ezzel szemben a BRCA1 és más HR gének hiányában csak a PCNA ubikvitinációjának szerepét tudtam kimutatni, ami több párhuzamos útvonal létét sugallja. Különböző humán sejtek és tumorok genomjának vizsgálatával bizonyítottam, hogy járulékos mutációk emberben is kialakulnak, illetve ciszplatin esetében NMF segítségével azt is igazoltam, hogy a nem közeli mutációs párban elhelyezkedő, ám nem is a lézióknál közvetlenül elhelyezkedő szubsztitúciók jelentős része is valójában járulékos mutáció.

Doktori munkám során összességében számos oldalról körüljártam a sejtek spontán és kívülről indukált mutagenézisének mechanizmusait, melyek minden esetben arra utaltak, hogy a transzléziós szintézis, bár fontos szerepe van a replikáció folytonosságának fenntartásában, felelős a pontmutációs teher egy jelentős részéért is. Eközben számos, a terület élvonalába tartozó kísérletes és bioinformatikai módszerrel ismerkedtem meg, és lehetőségem volt részt venni egy olyan elemzési keretrendszer felállításában is, amely számos külső hatás vagy mutáns genotípus mutagén következményeinek pontos és hatékony kimutatására és részletes tanulmányozására lehetőség fog teremteni a jövőben.

A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Molnár, J., Póti, Á., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Swanton, C., Tusnády, G.E., Szallasi, Z., Csabai, I., Szüts, D. (2014) The genome of the chicken DT40 bursal lymphoma cell line. *G3 (Bethesda)*, **4(11)**: 2231-40.

Calcutt, M.J., Szikriszt, B., Póti, Á., Molnár, J., Gervai, J.Z., Tusnády, G.E., Foecking, M.F., Szüts, D. (2015) Genome Sequence Analysis of Mycoplasma sp. HU2014, Isolated from Tissue Culture. *Genome Announcements*, **3(5)**: e01086-15.

Szikriszt, B., Póti, Á., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Molnár, J., Ribli, D., Szeltner, Z., Tusnády, G.E., Csabai, I., Szallasi, Z., Swanton, C., Szüts, D. (2016)

A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biology*, **17**: 99.

Póti, Á., Berta, K., Xiao, Y., Pipek, O., Klus, G.T., Ried, T., Csabai, I., Wilcoxon, K., Mikule, K., Szallasi, Z., Szüts, D. (2018) Long-term treatment with the PARP inhibitor niraparib does not increase the mutation load in cell line models and tumour xenografts. *British Journal of Cancer*, **119(11)**: 1392-1400.

Póti, Á., Gyergyák, H., Németh, E., Rusz, O., Tóth, S., Kovácsházi, C., Chen, D., Szikriszt, B., Spisák, S., Takeda, S., Szakács, G., Szallasi, Z., Richardson, A.L., Szüts, D. (2019) Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents. *Genome Biology*, **20(1)**: 240.

Szikriszt, B., Póti, Á., Németh, E., Kanu, N., Swanton, C., Szüts, D. (2021) A comparative analysis of the mutagenicity of platinum-containing chemotherapeutic agents reveals direct and indirect mutagenic mechanisms. *Mutagenesis*, **36(1)**: 75-86.

Irodalomjegyzék

- [1] Chatterjee, N., Walker, G.C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagenesis*, **58(5)**: 235-63.
- [2] Varga, T., Aplan, P.D. (2005) Chromosomal aberrations induced by double strand DNA breaks. *DNA Repair (Amst)*, **4(9)**: 1038-46.
- [3] Chang, D.J., Cimprich, K.A. (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nature Chemical Biology* **5(2)**: 82-90.
- [4] Biertümpfel, C., Zhao, Y., Kondo, Y., Ramón-Maiques, S., Gregory, M., Lee, J.Y., et al. (2010) Structure and mechanism of human DNA polymerase ϵ . *Nature*, **465(7301)**: 1044-8.
- [5] Sale, J.E. (2013) Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5(3)**: a012708.
- [6] Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Kunkel, T.A. (2000) Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- ϵ . *Nature*, **404(6781)**: 1011-3.
- [7] Nik-Zainal, S., Alexandrov, L.B., Wedge, D.C., Van Loo, P., Greenman, C.D., Raine, K., et al. (2012) Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, **149(5)**: 979-93.
- [8] Alexandrov, L.B., Kim, J., Haradhvala, N.J., Huang, M.N., Tian Ng, A.W., Wu,

- Y., et al. (2020) The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, **578(7793)**: 94-101.
- [9] Szikriszt, B., Póti, Á., Pipek, O., Krzystanek, M., Kanu, N., Molnár, J., et al. (2016) A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biology* **17**: 99.

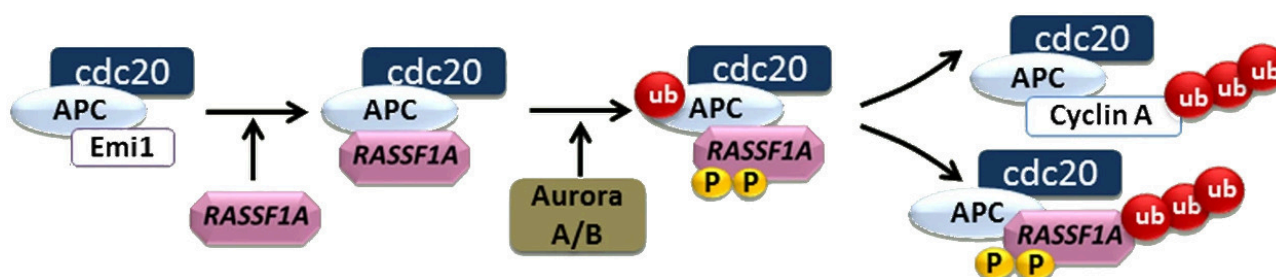
A RASSF1A TUMORSZUPPRESSZOR FEHÉRJE AURORA-A KINÁZ ÁLTALI FOSZFORILÁCIÓJA: ENZIMKINETIKA ÉS MODELLEZÉS

Szimler Tamás

Természetudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet,
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,
Szerkezeti Biokémia Program
e-mail: szimtom@gmail.com

Témavezetők: Kazinczyné Dr. Vas Mára, Dr. Gráczer Éva

A RASSF1A (a Ras-kötő domén fehérjecsald / *Ras ASSociation domain Family 1A* jelű fehérjéje) egy nagy jelentőségű tumorszuppresszor fehérje: hiánya, vagy csökkent működése gyakran megfigyelhető különféle ráktípusok esetében. Számos jelpálya fontos szereplője, a sejtek működését három különböző területen szabályozza. Egyrészt fontos közvetítője a külső jelek hatására beinduló (*extrinszik*) apoptotikus jelátvitelnek, vagyis részt vesz a rákos sejtek elpusztításában. Másrészt több ponton szabályozza a sejtciklust, így akadályozza a rákos sejtekre jellemző kóros sejtburjánzást. A mikrotubulusokat is stabilizálja, így gátolja a sejtmozgásokat, ezen keresztül pedig valószínűleg az áttétek kialakulását is [1, 2].

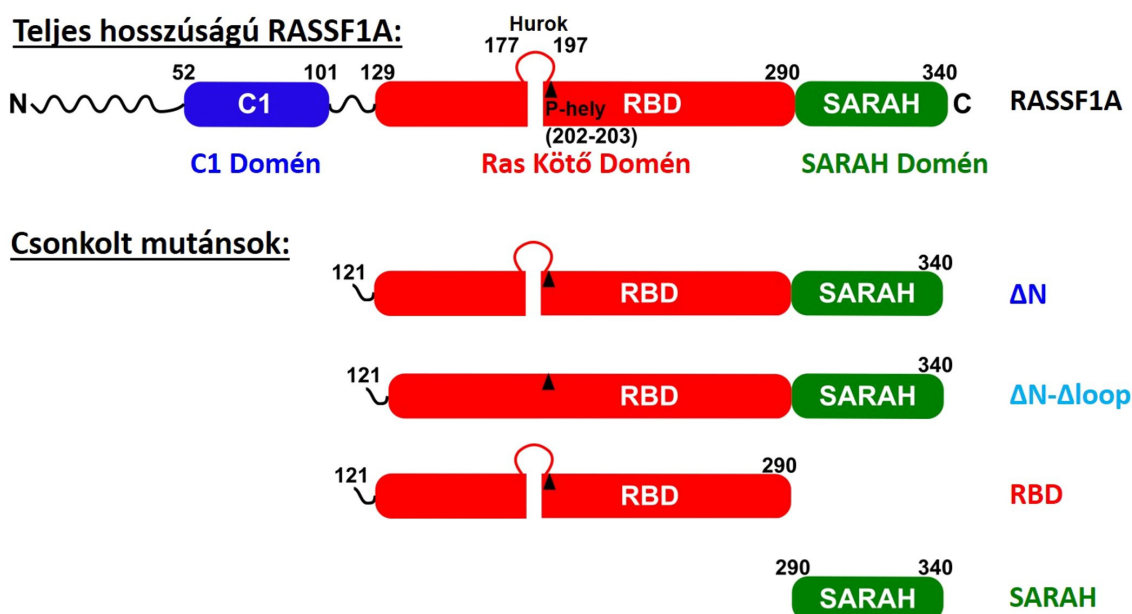


1. ábra. A RASSF1A gátló hatása a mitózis elején és foszforilációja az Aurora-A kináz által [2].

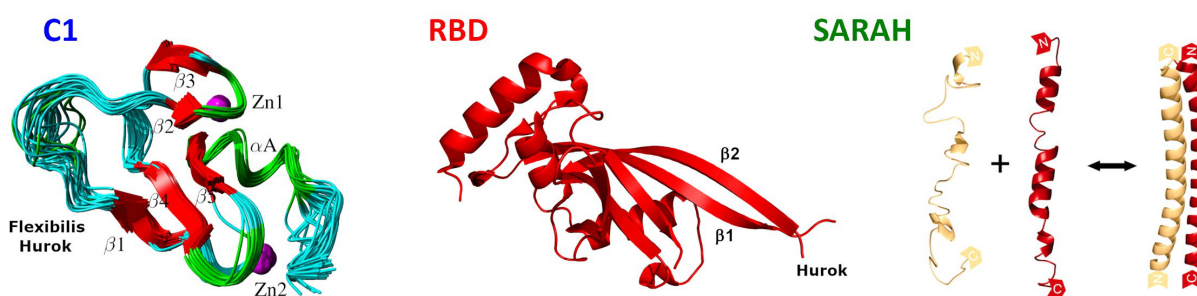
Doktori munkám során a RASSF1A és egy onkogén proteinkináz, az Aurora-A kölcsönhatását vizsgáltam, amely a sejtben a mitózis korai fázisában zajlik [3] (1. ábra). A RASSF1A ekkor gátolja az APC/C-Cdc20 (APC: Anafázist elősegítő komplex / *Anaphase Promoting Complex*, Cdc: Sejtosztódási ciklus fehérje / *Cell-Division Cycle protein*) ubikvitin-ligáz komplexet, így a sejtosztódást is. A mitózis során működik azonban az Aurora-A kináz is, amely a RASSF1A fehérjét foszforilálja. A foszforilált RASSF1A az APC/C-Cdc20 komplexnek már nem gátlószere, hanem szubsztrátja. A RASSF1A ubikvitinálódik és lebomlik, az APC/C-Cdc20 komplex így felszabadul a gátlás alól, az osztódás pedig folytatódik.

A RASSF1A említett foszforilációja kóros esetben, például ha a RASSF1A eleve csökkent koncentrációban van jelen a sejtben, vagy az Aurora-A túlzott működése esetén, kontrollálatlan osztódáshoz, rákhoz vezethet. Ezt a hatást fokozza, hogy a foszforiláció ráadásul a RASSF1A lebomlását eredményezi, ami annak egyéb tumorszuppresszor működését is visszaszorítja. Az Aurora-A kináz és a RASSF1A fehérje kölcsönhatása tehát jó célpontja lehet kemoterápiás szereknek. Ilyen szerek tervezéséhez ismernünk kellene a kölcsönhatás molekuláris részleteit. Doktori munkámban ezek feltárását kezdtem meg a kötőfelszínnek domén szintű térképezésével.

A



B

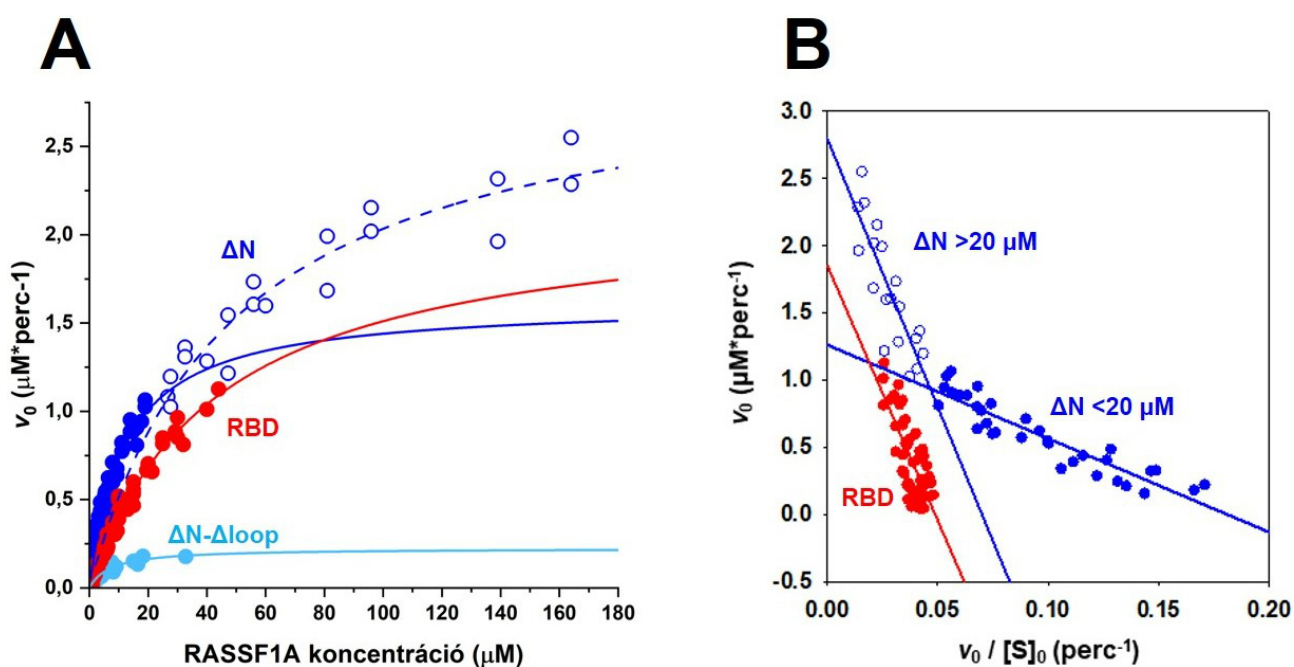


2. ábra. A RASSF1A doménjei és a deléciós mutánsok. A) A fehérjék domén topológiája. Fekete hullámos vonal jelöli a rendezetlen szakaszokat, színes négyzetek a doméneket. A számok a domének és szerkezeti elemek határait jelölik a szekvenciában. **B)** A közeli rokon RASSF5 doménjeinek térbeli szerkezete [6–8].

A RASSF1A 3 doménből, illetve egy N-terminális rendezetlen szakaszból áll [4] (2.A ábra, fent). Legnagyobb doménje a Ras-kötő-domén (RBD), amely az Aurora-A foszforilációs helyet is hordozza, ennek szomszédságában pedig egy

flexibilis hurok található. A C-terminális helyzetű SARAH domén (Sav-RAssf-Hpo kölcsönhatás domén) alfa-helikális szerkezetű. Ilyen domén számos fehérjében található, más SARAH doménekkal alkotnak homo- és heterodimereket [5, 6]. A RASSF1A fehérjéről ugyan nem áll rendelkezésre kristályszerkezet, viszont a közeli rokon RASSF5 doménjeinek szerkezete ismert (2.B ábra). A RASSF1A-domének szerkezete a szekvenciák egyezése alapján ehhez nagyon hasonló lehet.

A RASSF1A 4 csonkolt mutánsát hoztam létre (2.A ábra), ezek összehasonlításával az egyes domének kölcsönhatásban betöltött szerepét vizsgálhattam. A teljes hosszúságú RASSF1A előállítás sajnos nem sikerült, ez a fehérje valószínűleg csak sejtes közegben stabil. A legteljesebb általam létrehozott változat, a ' ΔN ' mellett két másik mutánsból kitöröltem ezen felül a SARAH domént ('RBD' változat), illetve a hurkot (' ΔN - Δ loop'), valamint külön kifejeztem magát a SARAH domént is. Az Aurora-A kináz oldaláról egyetlen konstrukciót használtam: a csak a kinázdoménből álló csonkolt változatot.



3. ábra. Foszforilációs kinetikai mérések. A ΔN (sötétkék) $20 \mu\text{M}$ alatti (teli körök) és feletti (üres karikák) koncentrációinál, valamint az RBD (piros) és ΔN - Δ loop (világoskék) mutánsokkal mért kinetikai paraméterek koncentrációfüggése **A)** Michaelis-Menten és **B)** Eadie-Hofstee szerinti ábrázolásban [9].

A RASSF1A fehérjéről ismert, hogy homodimereket képez, azt viszont nem tisztázták egyértelműen, hogy ebben mely molekularészletek vesznek részt. A RASSF1A csonkolt mutánsaival végzett analitikai gélszűrés kísérletek alapján a

dimerizáció (legalábbis az általam vizsgált csonkolt formák esetében) a SARAH doménon keresztül zajlik. A monomer-dimer egyensúly disszociációs állandója durva becsléssel a 10 μM nagyságrendbe tehető.

Az enzim-szubsztrát komplex funkcionális vizsgálatához a RASSF1A Aurora-A kináz általi foszforilációját mértem *steady-state* körülmények között a szubsztrát RASSF1A mutánsok különböző koncentrációinál (3. ábra). A kezdeti sebesség koncentrációfüggésének illesztésével kapott kinetikai paramétereket az 1. táblázat foglalja össze. Az adatok Eadie-Hofstee szerinti ábrázolásából (3.B ábra) kitűnik, hogy a ΔN változat bifázikus kinetikát követ, melynek töréspontja kb. 20 μM koncentrációnál található. Az adatok két populációja a monomer (<20 μM) és dimer (>20 μM) állapotoknak felelhet meg, a töréspontot jellemző 20 μM koncentráció nagyságrendileg megegyezik a dimerek disszociációjára becsült 10 μM K_d értékkel. Ezen felül a csak monomerként létező RBD mutáns kinetikája nem bifázikus (3.B ábra). Érdekes, hogy a monomer RBD kinetikai szempontból nem a monomer, hanem a dimer ΔN mutánsra hasonlít: mindkettő lényegesen nagyobb K_m értékkel jellemezhető, mint a monomer ΔN . Ez arra utal, hogy a SARAH domén közvetlenül részt vesz az Aurora-A kinázzal alkotott kölcsönhatásban: ha nincs jelen (RBD) vagy le van kötve egy homodimer kölcsönhatásban (ΔN dimer), az Aurora-kinázzal alkotott komplex affinitása csökken. A hurok eltávolítása (ΔN - Δloop) a K_m paraméterre nincs hatással, a k_{cat} értékét viszont jelentősen csökkenti, a hurok tehát a katalízist segíti elő.

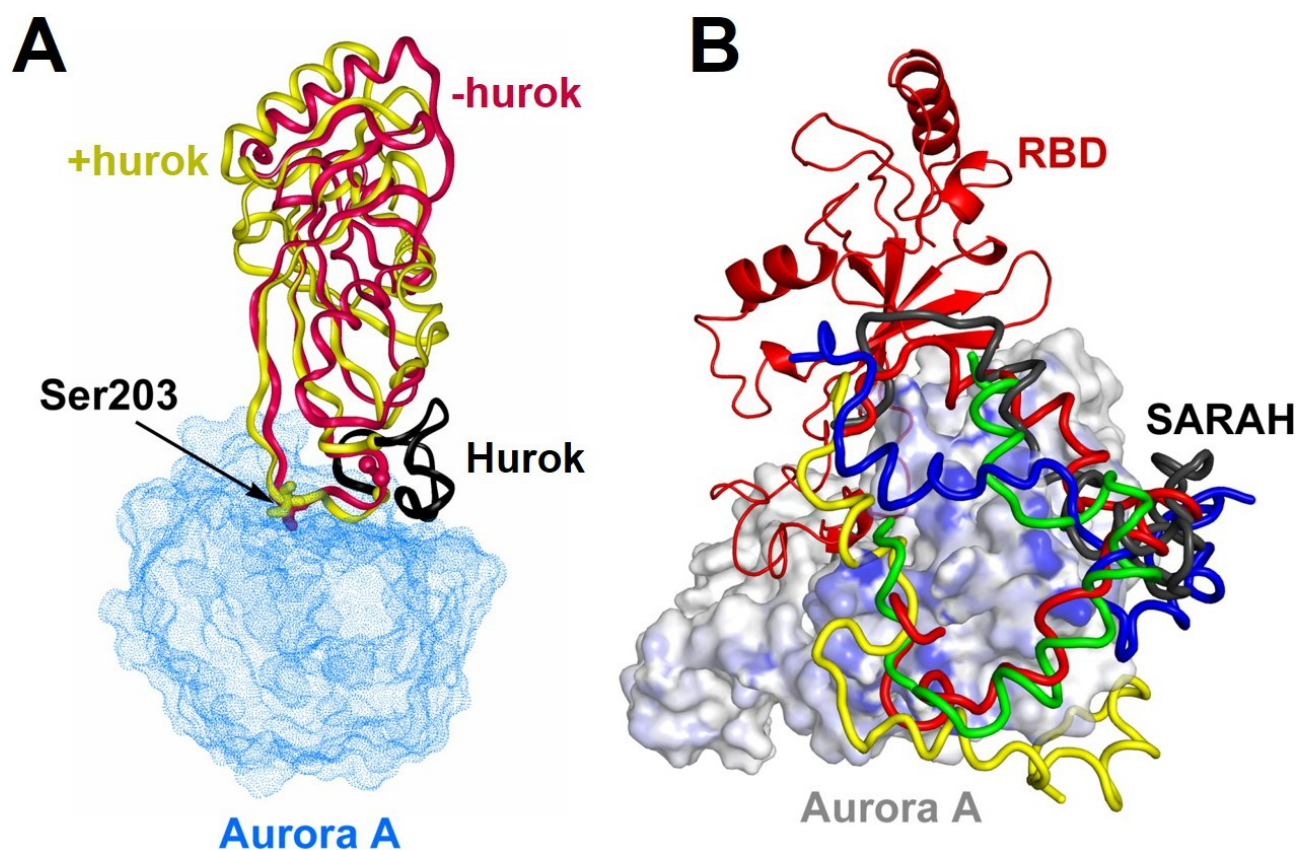
1. táblázat. A RASSF1A mutánsok foszforilációjának kinetikai paraméterei

RASSF1A mutáns	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)
ΔN (< 20 μM)	35 \pm 10	9,0 \pm 2,5
ΔN (> 20 μM)	70 \pm 15	41 \pm 5
ΔN - Δloop	6,8 \pm 0,6	10 \pm 2
RBD	47 \pm 5	43 \pm 5

Az Aurora-A kinázdomén és a RASSF1A deléciós mutánsok fizikai kölcsönhatását SPR (*Surface Plasmon Resonance*) kötődési kísérletekben vizsgáltam. A mérések egyértelműen megmutatták, hogy az önmagában álló SARAH domén közvetlenül kötődik a kinázdomén felszínén. Emellett a teljesebb formákkal végzett kísérletekből kitűnt, hogy a ΔN mutáns lényegesen lassabban disszociál az Aurora-A kináizról, mint az RBD, amelyről a SARAH domén hiányzik. Ez a mérés is igazolja, hogy a SARAH domén stabilizálja az enzimszubsztrát

komplexet. Az önmagában álló SARAH domén ugyanakkor lényegesen gyengébben kötődik, mint a teljesebb formák, vagyis az Aurora-A elsődleges kötőhelye az RBD-doménon lehet.

Méréseim mellett csoportunkban a komplex *in silico* szerkezeti modelljét is létrehoztuk (4. ábra). Az RBD-domén és az Aurora-A kölcsönhatásának modellje (4.A ábra) alátámasztja feltételezésemet, hogy a hurok (fekete) nem vesz részt a kölcsönhatásban. A SARAH domén modellezése (4.B ábra) során a SARAH domén lehetséges konformációinak sokaságát hoztuk létre geometriai szimulációval, majd ezek közül választottuk ki azt a 10 szerkezetet, amelyek a legnagyobb felületen kötődtek az Aurora-A kinázdoménjén. Ez a modell igazolja, hogy szerkezeti szempontból valóban lehetséges közvetlen kölcsönhatás a SARAH domén és az Aurora-A kinázdoménje között. A pontos kötőfelszínt a modell ugyan nem tárta fel, de a kölcsönhatások gyakoriságának eloszlása alapján az valószínűleg a kinázdomén C-lebenyén lehet.



4. ábra. Az enzim-szubsztrát komplex szerkezeti modellezése. A) Az Aurora-A kinázdomén (kék) és a RASSF1A RBD-domén kölcsönhatása. A sárgával jelölt RBD tartalmazza a hurkot (fekete) is, a piros modellből ez hiányzik. Az RBD szerkezetekben az Aurora-A foszforilációs hely (Ser203 oldallánc) is feltüntetésre került. **B)** A SARAH domén lehetséges kötődése az Aurora-A kinázdoménjén. A kinázdomént fehér, az RBD-domént piros, az 5 SARAH domént különböző színekkel jelöltem. A kinázdomén felszínén kék színezés jelöli a SARAH doménnel alkotott kölcsönhatások gyakoriságát [9].

A fentebb bemutatott eredmények alapján a RASSF1A – Aurora A komplex kialakulására és működésére a következő modellt állítottam fel: az elsődleges kölcsönhatás az Aurora-A kinázdoménje és a RASSF1A Ras-kötő doménje között alakul ki. Ezt követően a SARA domain az Aurora-A kinázdoménre (feltehetőleg annak C-lebenyére) rázárulva stabilizálja a komplexet. A foszforilációs helyel szomszédos huroknak a katalízisben van szerepe, valószínűleg a foszforilációs hely és környezete számára biztosítja a szükséges mozgékonyt a katalitikus ciklus során.

Eredményeim jó alapot szolgáltathatnak a kötőfelszín részletesebb feltérképezéshez, amely pedig már lehetővé tenné a fehérje-fehérje kölcsönhatást célzó gátlószerek tervezését. Elvi szempontból fontos eredmény, hogy eddig le nem írt, meglepő közvetlen kölcsönhatást mutattunk ki egy SARA domain és egy globuláris fehérjedomén között.

A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Szimler, T., Gráczer, É., Györffy, D., Végh, B., Szilágyi, A., Hajdú, I., Závodszy, P., Vas, M. (2019) New type of interaction between the SARA domain of the tumour suppressor RASSF1A and its mitotic kinase Aurora A. *Scientific Reports*, **9**: 5550.

Somogyi, M., Szimler, T., Baksa, A., Végh, B., Bakos, T., Paréj, K., Ádám, Cs., Zsigmond, Á., Megyeri, M., Flachner, B., Sajó, R., Gráczer, É., Závodszy, P., Hajdú, I., Beinrohr, L. (2019) A versatile modular vector set for optimizing protein expression among bacterial, yeast, insect and mammalian hosts. *PLoS One*, **14**: e0227110.

Irodalomjegyzék

- [1] Amin, K. S., Banerjee, P.P (2012) The cellular functions of RASSF1A and its inactivation in prostate cancer. *Journal of carcinogenesis*, **11**: 3.
- [2] Dubois, F., Bergot, E., Zalzman, G., Levallet, G. (2019) RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis-an updated review. *Cell death & disease*, **10(12)**: 928.
- [3] Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S. W.-M., Nakayama, K.-I., Nakayama, K., Lo, K.-W. (2012) Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene*, **31(15)**: 1975–1987.
- [4] Volodko, N., Gordon, M., Sall, M., Ghazaleh, H. A., Baksh, S. (2014) RASSF1A tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS letters*, **588(16)**: 2671–2684.
- [5] Aruxandei, D. C., Makbul, C., Koturenkiene, A., Lüdemann, M.-B.,

- Herrmann, C. (2011) Dimerization-induced folding of MST1 SARAH and the influence of the intrinsically unstructured inhibitory domain: low thermodynamic stability of monomer. *Biochemistry*, **50(51)**: 10990–11000.
- [6] Makbul, C., Aruxandei, D. C., Hofmann, E., Schwarz, D., Wolf, E., Herrmann, C. (2013) Structural and thermodynamic characterization of Nore1-SARAH: a small, helical module important in signal transduction networks. *Biochemistry*, **52(6)**: 1045–1054.
- [7] Harjes, E., Harjes, S., Wohlgemuth, S., Müller, K.-H., Krieger, E., Herrmann, C., Bayer, P. (1993) GTP-Ras disrupts the intramolecular complex of C1 and RA domains of Nore1. *Structure (London, England)*, **14(5)**: 881–888.
- [8] Stieglitz, B., Bee, C., Schwarz, D., Yildiz, O., Moshnikova, A., Khokhlatchev, A., Herrmann, C. (2008) Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II. *The EMBO journal*, **27(14)**: 1995–2005.
- [9] Szimler, T., Gráczer, É., Györffy, D., Végh, B., Szilágyi, A., Hajdú, I., Závodszky, P., Vas, M. (2019) New type of interaction between the SARAH domain of the tumour suppressor RASSF1A and its mitotic kinase Aurora A. *Scientific Reports*, **9**: 5550.

KIEMELKEDŐ KÖZLEMÉNYEK 2021 I) IF>8

Al-Zaeed, N., Budai, Z., Szondy, Z., Sarang, Z. (2021) TAM kinase signaling is indispensable for the proper skeletal muscle regeneration process. *Cell Death Dis* 12(6):611. IF: 8.469.

Bányai, L., Trexler, M., Kerekes, K., Csuka, O., Patthy, L. (2021) Use of signals of positive and negative selection to distinguish cancer genes and passenger genes. *Elife* 10:e59629. IF: 8.140

Bernula, P., Pettkó-Szandtner, A., Hajdú, A., Kozma-Bognár, L., Josse, E.-M., Ádám, É., Nagy, F., Viczián, A. (2021) SUMOylation of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 promotes photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 229(4):2050-2061. IF: 10.151

Betancourt, L.H., Gil, J., Kim, Y., Doma, V., Çakır, U., Sanchez, A., Murillo, J.R., Kuras, M., Parada, I.P., Sugihara, Y., Appelqvist, R., Wieslander, E., Welinder, C., Velasquez, E., de Almeida, N.P., Woldmar, N., Marko-Varga, M., Pawłowski, K., Eriksson, J., Szeitz, B., Baldetorp, B., Ingvar, C., Olsson, H., Lundgren, L., Lindberg, H., Oskolas, H., Lee, B., Berge, E., Sjögren, M., Eriksson, C., Kim, D., Kwon, H.J., Knudsen, B., Rezeli, M., Hong, R., Horvatovich, P., Miliotis, T., Nishimura, T., Kato, H., Steinfeld, E., Oppermann, M., Miller, K., Florindi, F., Zhou, Q., Domont, G.B., Pizzatti, L., Nogueira, F.C.S., Horváth, P., Szadai, L., Tímár, J., Kárpáti, S., Szász, A.M., Malm, J., Fenyő, D., Ekedahl, H., Németh, I.B., Marko-Varga, G. (2021) The human melanoma proteome atlas—Defining the molecular pathology. *Clin Transl Med* 11(7):e473. IF: 11.492

Betancourt, L.H., Gil, J., Sanchez, A., Doma, V., Kuras, M., Murillo, J.R., Velasquez, E., Çakır, U., Kim, Y., Sugihara, Y., Parada, I.P., Szeitz, B., Appelqvist, R., Wieslander, E., Welinder, C., de Almeida, N.P., Woldmar, N., Marko-Varga, M., Eriksson, J., Pawłowski, K., Baldetorp, B., Ingvar, C., Olsson, H., Lundgren, L., Lindberg, H., Oskolas, H., Lee, B., Berge, E., Sjögren, M., Eriksson, C., Kim, D., Kwon, H.J., Knudsen, B., Rezeli, M., Malm, J., Hong, R., Horváth, P., Szász, A.M., Tímár, J., Kárpáti, S., Horvatovich, P., Miliotis, T., Nishimura, T., Kato, H., Steinfeld, E., Oppermann, M., Miller, K., Florindi, F., Zhou, Q., Domont, G.B., Pizzatti, L., Nogueira, F.C.S., Szadai, L., Németh, I.B., Ekedahl, H., Fenyő, D., Marko-Varga, G. (2021) The Human Melanoma Proteome Atlas—Complementing the melanoma transcriptome. *Clin Transl Med* 11(7):e451. IF: 11.492

Börcsök, J., Sztupinszki, Z., Bekele, R., Gao, S.P., Diossy, M., Samant, A.S., Dillon, K.M., Tisza, V., Spisák, S., Ruzs, O., Csabai, I., Pappot, H., Frazier, Z.J., Konieczkowski, D.J., Liu, D., Vasani, N., Rodrigues, J.A., Solit, D.B., Hoffman-Censits, J.H., Plimack, E.R., Rosenberg, J.E., Lazaro, J.B., Taplin, M.E., Iyer, G., Brunak, S., Lozsa, R., Van Allen, E.M., Szüts, D., Mouw, K.W., Szallasi, Z. (2021) Identification of a Synthetic Lethal Relationship between Nucleotide Excision Repair Deficiency and Irofulven Sensitivity in Urothelial Cancer. *Clin Cancer Res* 27(7):2011-2022. IF: 12.531

Breitenecker, K., Homolya, M., Luca, A.C., Lang, V., Trenk, C., Petroczi, G., Mohrherr, J., Horvath, J., Moritsch, S., Haas, L., Kurnaeva, M., Eferl, R., Stoiber, D., Moriggl, R., Bilban, M., Obenauf, A.C., Ferran, C., Dome, B., Laszlo, V., Gyórfy, B., Dezso, K., Moldvay, J., Casanova, E., Moll, H.P. (2021) Down-regulation of A20 promotes immune escape of lung adenocarcinomas. *Sci Transl Med* 13(601):eabc3911. IF: 17.956

Bui, L.T., Winters, N.I., Chung, M.I., Joseph, C., Gutierrez, A.J., Habermann, A.C., Adams, T.S., Schupp, J.C., Poli, S., Peter, L.M., Taylor, C.J., Blackburn, J.B., Richmond, B.W., Nicholson, A.G., Rassl, D., Wallace, W.A., Rosas, I.O., Jenkins, R.G., Kaminski, N., Kropski, J.A., Banovich, N.E.; Human Cell Atlas Lung Biological Network (BRC group: BIOMAG Horváth, P.) (2021) Chronic lung diseases are associated with gene expression programs favoring SARS-CoV-2 entry and severity. *Nat Commun* 12(1):4314. IF: 14.919

Csizmadia, G., Erdős, G., Tordai, H., Padányi, R., Tosatto, S., Dosztányi, Z., Hegedűs, T. (2021) The MemMoRF Database for Recognizing Disordered Protein Regions Interacting with Cellular Membranes. *Nucleic Acids Res* 49(D1):D355–D360. IF: 16.971

Dukay, B., Walter, F.R., Vigh, J.P., Barabási, B., Hajdu, P., Balassa, T., Migh, E., Kincses, A., Hoyk, Z., Szögi, T., Borbély, E., Csoboz, B., Horváth, P., Fülöp, L., Penke, B., Vígh, L., Deli, M.A., Sántha, M., Tóth, M.E. (2021) Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury. *J Neuroinflammation* 18(1):22. IF: 8.322

Erdős, G., Pajkos, M., Dosztányi, Z. (2021) IUPred3: Prediction of Protein Disorder Enhanced with Unambiguous Experimental Annotation and Visualization of Evolutionary Conservation. *Nucleic Acids Res* 49(W1):W297–W303. IF: 16.971

Földi, M.C., Pesti, K., Zboray, K., Toth, A. V., Hegedűs, T., Málnási-Csizmadia, A., Lukacs, P., Mike, A. (2021) The Mechanism of Non-Blocking Inhibition of Sodium Channels Revealed by Conformation-Selective Photolabeling. *Br J Pharmacol* 178(5):1200–1217. IF: 8.739

Fuxreiter, M., Vendruscolo, M. (2021) Generic nature of the condensed states of proteins. *Nat Cell Biol* 23(6):587-594. IF: 28.824

Gianni, S., Freiburger, M., Jemth, P., Ferreira, D., Wolynes, P., Fuxreiter, M. (2021) Fuzziness and Frustration in the Energy Landscape of Protein Folding, Function, and Assembly. *Accounts Chem Res* 54(5):1251-1259. IF: 22.384

Haddad, G., Lorenzen, J.M., Ma, H., de Haan, N., Seeger, H., Zaghrini, C., Brandt, S., Kölling, M., Wegmann, U., Kiss, B., Pál, G., Gál, P., Wüthrich, R.P., Wuhrer, M., Beck, L.H., Salant, D.J., Lambeau, G., Kistler, A.D. (2021) Altered glycosylation of IgG4 promotes lectin complement pathway activation in anti-PLA2R1-associated membranous nephropathy. *J Clin Invest* 131(5):e140453. IF: 14.808

He, Y., Rivera, J., Diossy, M., Duan, H., Bowman-Colin, C., Reed, R., Jennings, R., Novak, J., Tran, S.V., Cohen, E.F., Szuts, D., Giobbie-Hurder, A., Bronson, R.T.,

Bass, A.J., Signoretti, S., Szallasi, Z., Livingston, D.M., Pathania, S. (2021) BRCA1/Trp53 heterozygosity and replication stress drive esophageal cancer development in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(41):e2108421118. IF: 11.205

Hegedűs, C., Juhász, T., Fidrus, E., Janka, E.A., Juhász, G., Boros, G., Paragh, G., Uray, K., Emri, G., Remenyik, É., Bai, P. (2021) Cyclobutane pyrimidine dimers from UVB exposure induce a hypermetabolic state in keratinocytes via mitochondrial oxidative stress. *Redox Biol* 38:101808. IF: 11.799

Issaian, A., Hay, A., Dzieciatkowska, M., Roberti, D., Perrotta, S., Darula, Z., Redzic, J., Busch, M.P., Page, G.P., Rogers, S.C., Doctor, A., Hansen, K.C., Eisenmesser, E.Z., Zimring, J.C., D'Alessandro, A. (2021) The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality. *Haematologica* 106(11):2971-2985. IF: 9.941

Ivanovics, B., Gazsi, G., Reining, M., Berta, I., Póliska, S., Tóth, M., Domokos, A., Nagy, B., Staszny, Á., Cserhádi, M., Csósz, É., Bácsi, A., Csenki-Bakos, Z., Ács, A., Urbányi, B., Czimmerer, Z. (2021) Embryonic exposure to low concentrations of aflatoxin B1 triggers global transcriptomic changes, defective yolk lipid mobilization, abnormal gastrointestinal tract development and inflammation in zebrafish. *J Hazard Mater* 416:125788. IF: 10.588

Koós, K., Oláh, G., Balassa, T., Mihut, N., Rózsa, M., Ozsvár, A., Tasnádi, E., Barzó, P., Faragó, N., Puskás, L., Molnár, G., Molnár, J., Tamás, G., Horváth, P. (2021) Automatic deep learning-driven label-free image-guided patch clamp system. *Nat Commun* 12(1):936. IF: 14.919

Korkmazhan, E., Tompa, P., Dunn, A.R. (2021) The role of ordered cooperative assembly in biomolecular condensates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(10):647-648. IF: 94.444

Kovács, K., Farkas, Z., Bajić, D., Kalapis, D., Daraba, A., Almási, K., Kintses, B., Bódi, Z., Notebaart, R.A., Poyatos, J.F., Kemmeren, P., Holstege, F.C.P., Pál, Cs., Papp, B. (2021) Suboptimal global transcriptional response increases the harmful effects of loss-of-function mutations. *Mol Biol Evol* 38(3):1137-1150. IF: 16.240

Kovács, T., Mikó, E., Ujlaki, G., Yousef, H., Csontos, V., Uray, K., Bai, P. (2021) The involvement of onco-biosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 40(4):1223-1249. IF: 9.264

Kumar, M., Michael, S., Alvarado-Valverde, J., Mészáros, B., Sámano-Sánchez, H., Zeke, A., Dobson, L., Lazar, T., Örd, M., Nagpal, A., Farahi, N., Käser, M., Kraleti, R., Davey, N.E., Panca, R., Chemes, L.B., Gibson, T.J. (2021) The Eukaryotic Linear Motif resource: 2022 release. *Nucleic Acids Res* 50(D1):D497-D508. IF: 16.971

Lazar, T., Martínez-Pérez, E., Quaglia, F., Hatos, A., Chemes, L.B., Iserte, J.A., Méndez, N.A., Garrone, N.A., Saldaño, T.E., Marchetti, J., Rueda, A.J.V., Bernadó,

P., Blackledge, M., Cordeiro, T.N., Fagerberg, E., Forman-Kay, J.D., Fornasari, M.S., Gibson, T.J., Gomes, G.W., Gradinaru, C.C., Head-Gordon, T., Jensen, M.R., Lemke, E.A., Longhi, S., Marino-Buslje, C., Minervini, G., Mittag, T., Monzon, A.M., Pappu, R.V., Parisi, G., Ricard-Blum, S., Ruff, K.M., Salladini, E., Skepö, M., Svergun, D., Vallet, S.D., Varadi, M., Tompa, P., Tosatto, S.C.E., Piovesan, D. (2021) PED in 2021: a major update of the protein ensemble database for intrinsically disordered proteins. *Nucleic Acids Res* 49(D1):D404-D411. IF: 16.971

Muus, C., Luecken, M.D., [...], The Human Cell Atlas Lung Biological Network (BRC group: BIOMAG Horváth, P.) (2021) Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med* 27(3):546-559. IF: 53.440

Nagy, T., Tóth, Á., Telbisz, Á., Sarkadi, B., Tordai, H., Tordai, A., Hegedűs, T. (2021) The transport pathway in the ABCG2 protein and its regulation revealed by molecular dynamics simulations. *Cell Mol Life Sci* 78(5):2329-2339. IF: 9.261

Panca, R., Vranken, W., Mészáros, B. (2021) Computational resources for identifying and describing proteins driving liquid-liquid phase separation. *Brief Bioinform* 22(5):bbaa408. IF: 11.622

Pavani, M., Bonaiuti, P., Chirolì, E., Gross, F., Natali, F., Macaluso, F., Póti, Á., Pasqualato, S., Farkas, Z., Pompei, S., Cosentino Lagomarsino, M., Rancati, G., Szűts, D., Ciliberto, A. (2021) Epistasis, aneuploidy, and functional mutations underlie evolution of resistance to induced microtubule depolymerization. *EMBO J* 40(22):e108225. IF: 11.598

Peirsman, A., Blondeel, E., Ahmed, T., Anckaert, J., Audenaert, D., Boterberg, T., Buzás, K., Carragher, N., Castellani, G., Castro, F., Dangles-Marie, V., Dawson, J., De Tullio, P., De Vlieghere, E., Dedeyne, S., Depypere, H., Diosdi, A., Dmitriev, R.I., Dolznig, H., Fischer, S., Gespach, C., Goossens, V., Heino, J., Hendrix, A., Horvath, P., Kunz-Schughart, L.A., Maes, S., Mangodt, C., Mestdagh, P., Michlíková, S., Oliveira, M.J., Pampaloni, F., Piccinini, F., Pinheiro, C., Rahn, J., Robbins, S.M., Siljamäki, E., Steigemann, P., Sys, G., Takayama, S., Tesei, A., Tulkens, J., Van Waeyenberge, M., Vandesompele, J., Wagemans, G., Weindorfer, C., Yigit, N., Zablowky, N., Zanoni, M., Blondeel, P., De Wever, O. (2021) MISpheroID: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity. *Nat Methods* 18(11):1294-1303. IF: 28.547

Pihl, R., Jensen, R.K., Poulsen, E.C., Jensen, L., Hansen, A.G., Thøgersen, I.B., Dobó, J., Gál, P., Andersen, G.R., Enghild, J.J., Thiel, S. (2021) ITIH4 acts as a protease inhibitor by a novel inhibitory mechanism. *Sci Adv* 7(2):eaba7381. IF: 14.136

Piovesan, D., Necci, M., Escobedo, N., Monzon, A. M., Hatos, A., Mičetić, I., Quaglia, F., Paladin, L., Ramasamy, P., Dosztányi, Z., Vranken, W. F., Davey, N. E., Parisi, G., Fuxreiter, M., Tosatto, S. C. E. (2021) MobiDB: Intrinsically Disordered Proteins in 2021. *Nucleic Acids Res* 49(D1):D361–D367. IF: 16.971

Potor, L., Hendrik, Z., Patsalos, A., Katona, É., Méhes, G., Póliska, S., Csósz, É., Kalló, G., Komáromi, I., Combi, Z., Posta, N., Sikura, K., Pethő, D., Oros, M., Vereb, G., Tóth, C., Gergely, P., Nagy, L., Balla, G., Balla, J. (2021) Oxidation of hemoglobin drives a pro-atherogenic polarization of macrophages in human atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 35(12):917-950. IF: 8.401

Prekovic, S., Schuurman, K., Mayayo-Peralta, I., Manjón, A.G., Buijs, M., Yavuz, S., Wellenstein, M.D., Barrera, A., Monkhorst, K., Huber, A., Morris, B., Lieftink, C., Chalkiadakis, T., Alkan, F., Silva, J., Györffy, B., Hoekman, L., van den Broek, B., Teunissen, H., Debets, D.O., Severson, T., Jonkers, J., Reddy, T., de Visser, K.E., Faller, W., Beijersbergen, R., Altelaar, M., de Wit, E., Medema, R., Zwart, W. (2021) Glucocorticoid receptor triggers a reversible drug-tolerant dormancy state with acquired therapeutic vulnerabilities in lung cancer. *Nat Commun* 12(1):4360. IF: 14.919

Schwenk, P., Sheerin, D.J., Ponnu, J., Staudt, A.M., Lesch, K.L., Lichtenberg, E., Medzihradzsky, K.F., Hoecker, U., Klement, É., Viczián, A., Hiltbrunner, A. (2021) Uncovering a novel function of the CCR4-NOT complex in phytochrome A-mediated light signalling in plants. *Elife* 10:e63697. IF: 8.140

Skrapits, K., Sárvári, M., Farkas, I., Göcz, B., Takács, S., Rumpler, É., Váczi, V., Vastagh, C., Rácz, G., Matolcsy, A., Solymosi, N., Póliska, S., Tóth, B., Erdélyi, F., Szabó, G., Culler, M., Allet, C., Cotellessa, L., Prévot, V., Giacobini, P., Hrabovszky, E. (2021) The cryptic gonadotropin-releasing hormone neuronal system of human basal ganglia. *Elife* 10:e67714. IF: 8.140

Sompol, P., Gollihue, J.L., Kraner, S.D., Artiushin, I.A., Cloyd, R.A., Chishti, E.A., Koren, S.A., Nation, G.K., Abisambra, J.F., Huzian, O., Nagy, L.I., Sántha, M., Hackler, L. Jr., Puskás, L.G., Norris, C.M. (2021) Q134R: Small chemical compound with NFAT inhibitory properties improves behavioral performance and synapse function in mouse models of amyloid pathology. *Aging Cell* 20(7):e13416. IF: 9.304

Szántó, M., Gupte, R., Kraus, L.W., Pacher, P., Bai, P. (2021) PARPs in lipid metabolism and related diseases. *Prog Lipid Res* 84:101117. IF: 16.195

Szkalitsy, Á., Piccinini, F., Beleon, A., Balassa, T., Varga, I.G., Migh, E., Molnár, Cs., Paavolainen, L., Timonen, S., Banerjee, I., Ikonen, E., Yamauchi, Y., Andó, I., Peltonen, J., Pietiäinen, V., Honti, V., Horváth, P. (2021) Regression plane concept for analysing continuous cellular processes with machine learning. *Nat Commun* 12(1):2532. IF: 14.919

Tálas, A., Huszár, K., Kulcsár, P.I., Varga, J.K., Varga, É., Tóth, E., Welker, Z., Erdős, G., Pach, P.F., Welker, Á., Györgypál, Z., Tusnády, G.E., Welker, E. (2021) A method for characterizing Cas9 variants via a one-million target sequence library of self-targeting sgRNAs. *Nucleic Acids Res* 49(6):e31. IF: 16.971

Tálas, A., Simon, D.A., Kulcsár, P.I., Varga, É., Krausz, S.L., Welker, E. (2021) BEAR reveals that increased fidelity variants can successfully reduce the

mismatch tolerance of adenine but not cytosine base editors. *Nat Commun*
12(1):6353. IF: 14.919

**KIEMELKEDŐ KÖZLEMÉNYEK 2021.
II) BIOKÉMIAI SZERVEZETEK KIADVÁNYAI**

Arianti, R., Vinnai, B., Bartáné Tóth, B., Shaw, A., Csősz, É., Vámos, A., Győry, F., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Kristóf, E., Fésüs, L. (2021) ASC-1 transporter-dependent amino acid uptake is required for the efficient thermogenic response of human adipocytes to adrenergic stimulation. *FEBS Lett* 595(16):2085-2098. IF: 4.124

Bajusz, C., Kristó, I., Abonyi, Cs., Venit, T., Vedelek, V., Lukácsovich, T., Farkas, A., Borkúti, P., Kovács, Z., Bajusz, I., Marton, A., Vizler, C., Lipinszki, Z., Sinka, R., Piergiorgio, P., Vilmos, P. (2021) The nuclear activity of the actin-binding Moesin protein is necessary for gene expression in *Drosophila*. *FEBS J* 288(16):4812-4832. IF: 5.542

Bene, K., Halasz, L., Nagy, L. (2021) Transcriptional repression shapes the identify and function of tissue macrophages. *FEBS Open Bio* 11(12):3218-3229. IF: 2.693

Hamdoun, A., Hellmich, U.A., Szakacs, G., Kuchler, K. (2021) The incredible diversity of structures and functions of ABC transporters. *FEBS Lett* 595(6):671-674. IF: 4.124

Király, R., Csősz, É., Kurtán, T., Keresztessy, Z., Fésüs, L. (2021) Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 revealed by site directed mutagenesis. *FEBS J* 274(1):167. IF: 5.542

Kozák, E., Szikora, B., Iliás, A., Jani, P.K., Hegyi, Z., Matula, Z., Dedinszki, D., Tőkési, N., Fülöp, K., Pomozi, V., Várady, G., Bakos, É., Tusnady, G.E., Kacsokovics, I., Váradi, A. (2021) Creation of the first monoclonal antibody recognizing an extracellular epitope of hABCC6. *FEBS Lett* 595(6):789-798. IF: 4.124

Molnár, T., Pallagi, P., Tél, B., Király, R., Csoma, E., Jenei, V., Varga, Z., Gogolák, P., Odile Hueber, A., Máté, Z., Erdélyi, F., Szabó, G., Pettkó-Szandtner, A., Bácsi, A., Virág, L., Maléth, J., Koncz, G. (2021) Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death. *FEBS J* 288(22):6476-6491. IF: 5.542

Shaw, A., Szatmári-Tóth, M., Csomós, I., Mocsár, G., Balajthy, Z., Győry, F., Kristóf, E., Fésüs, L. (2021) Mitophagy is downregulated upon thermogenic stimulus in human beige adipocytes. *FEBS Open Bio* 11(S1):9. IF: 2.693

Szeltner, Z., Póti, Á., Harami, G.M., Kovács, M., Szüts, D. (2021) Evaluation and modulation of DNA lesion bypass in an SV40 large T antigen-based in vitro replication system. *FEBS Open Bio* 11(4):1054-1075. IF: 2.693

Takáts, S., Lévy, L., Boda, A., Tóth, S., Simon-Vecsei, Z., Rubics, A., Varga, Á., Lippai, M., Lőrincz, P., Glatz, G., Juhász, G. (2021) The Warburg Micro

Syndrome-associated Rab3GAP-Rab18 module promotes autolysosome maturation through the Vps34 Complex I. *FEBS J* 288(1):190-211. IF: 5.542

Ungvári, O., Király, L., Bakos, É., Özvegy-Laczka, C. (2021) 8-acetoxy-trisulfopyrene as the first activatable fluorogenic probe for add-and-read assessment of Organic anion-transporting polypeptides, OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1. *FASEB J* 35(9):e21863. IF: 5.191

Veres, B., Eros, K., Antus, C., Kalman, N., Fonai, F., Jakus, P.B., Boros, E., Hegedus, Z., Nagy, I., Tretter, L., Gallyas, F. Jr, Sumegi, B. (2021) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition amplifies inflammatory reprogramming in endotoxemia. *FEBS Open Bio* 11(3):684-704. IF: 2.693

**MEGHIVÓ A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET
2022. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSÉRE
PÉCS, 2022. AUGUSZTUS 25-27.**

Kedves Kollégák!

Nem sikerült még „leporolni” a Biokémiai Vándorgyűlés weblapját <https://www.hbs-conference.hu/>, de remélhetőleg hamarosan erre is sor kerül.

A weblapon olvashatókkal ellentétben **LESZ az idén Biokémiai Vándorgyűlés 2022. aug. 25-27. között Pécsen**, amelyre szeretettel várunk minden érdeklődőt!

A konferencia felhívása és minden további információ a konferencia honlapján lesz megtalálható (<https://www.hbs-conference.hu/>), illetve elektronikus levélben értesítjük az MBKE tagjait.

*Buday László, az MBKE elnöke
Lontay Beáta, az MBKE főtitkára
Bognár Zita és Gallyas Ferenc, helyi szervezők*

FELHÍVÁS

A Tankó Béla díj az MBKE legrangosabb kitüntetése, amelynek odaítélésére kétfévente kerül sor. 2012 óta a díjat két kategóriában adományozza az Egyesület Intéző Bizottsága.

Tankó Béla díjjal a megelőző években kiemelkedő jelentőségű kutató és iskolateremtő munkát végző, illetve a magyar biokémikus közösség érdekében jelentős közéleti aktivitást kifejtő kollégákat díjazzuk.

A **Tankó Béla életmű díjat** a magyarországi biokémiai és molekuláris biológiai kutatás irányait meghatározó, alapvető felfedezéseket jegyző kutatók kapják.

A díjra személyi javaslatot tehet az MBKE bármely tagja.

Kérjük a javaslatok beküldését 2022. április 15-ig a mbke@ttk.hu és a szucs.maria@brc.hu e-mail címekre.

PÁLYÁZATI FELHÍVÁS

A BIO-SCIENCE Kft. pályázatot hirdet a Magyar Biokémiai Egyesülettel együttműködve a 2021. évben, nemzetközi folyóiratban megjelent¹, molekuláris biológiai témájú közlemény szerzője/szerzői részére.

Pályázatot nyújthatnak be az MBKE tagjai és tagjelöltjei². A 35 év alatti pályázók az elbírálás során előnyben részesülnek. A pályázatokat az MBKE elismert szakemberekből álló bizottsága bírálja el.

A pályázat díja nettó 500.000 Ft

Az összeg felhasználható a BIO-SCIENCE Kft. által forgalmazott termékekre és a 2022. évi MBKE Vándorgyűlésen (Pécs, 2022. augusztus 25-27.) való részvétel költségeinek (regisztráció és szállásköltség) fedezésére.

A nyertes pályázó eredményeit szóbeli előadásban ismerteti a 2022. évi MBKE Vándorgyűlésen. Előnyben részesülnek azok a munkák, amelyek döntően hazai tudományos műhelyekben készültek.

A pályázatokat (a folyóiratban megjelent cikk pdf file-ját) az MBKE Titkárságára kérjük beküldeni, az mbke@ttk.hu e-mail címre.

Beküldési határidő: 2022. április 20.

Az eredményről a pályázókat 2022. május 15-ig értesítjük.

¹Online megjelenés is elfogadható.

²Az MBKE tagjelöltje az a személy, aki a belépési nyilatkozatot kitöltve eljuttatta az MBKE-nek és befizette a tagdíjat.