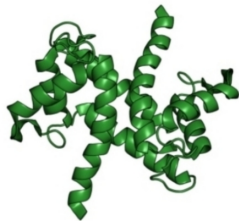


BIOKÉMIA

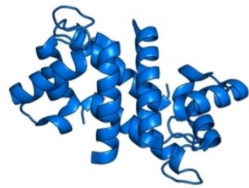
2024. SZEPTEMBER

XLVIII. ÉVFOLYAM 3. SZÁM

A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET INTERNETES FOLYÓIRATA



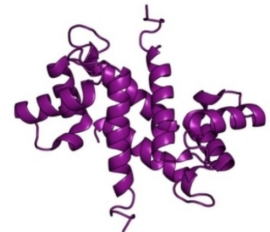
S100A1



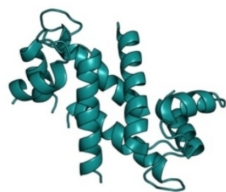
S100A2



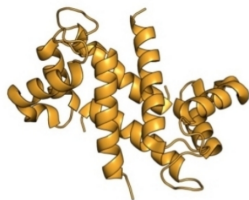
S100A3



S100A4



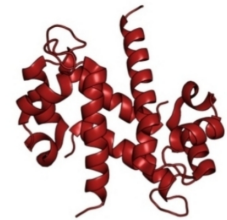
S100A5



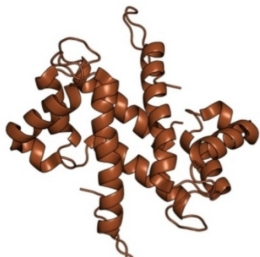
S100A6



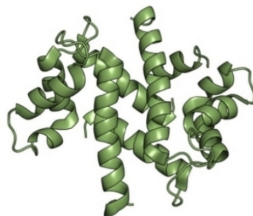
S100A7



S100A8



S100A9



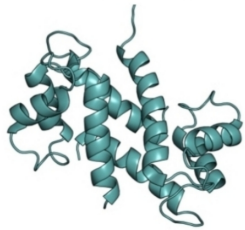
S100A10



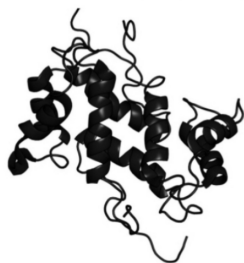
S100A11



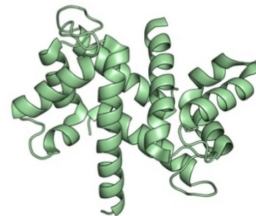
S100A12



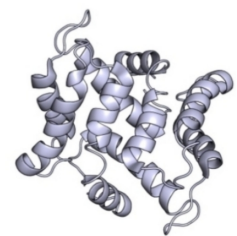
S100A13



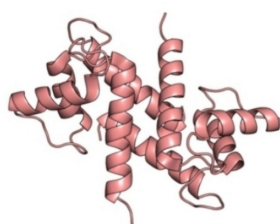
S100A14



S100A15



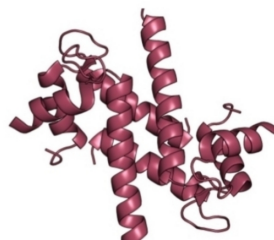
S100A16



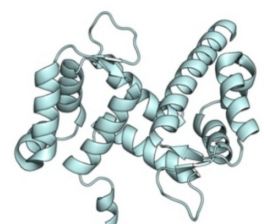
S100B



S100G



S100P



S100Z

BIOKÉMIA

a Magyar Biokémiai Egyesület
internetes folyóirata

XLVIII. évfolyam 3. szám
2024. szeptember

Szerkesztőbizottság:

Alexa Anita, Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc,
Ifj. Gallyas Ferenc, Geiszt Miklós, Nyitray
László, Sarkadi Balázs, Székács András,
Szondy Zsuzsa, Szűcs Mária, Vas Virág

Főszerkesztő:

Alexa Anita (alex.aanita@ttk.hu)

Szerkesztőségi titkár:

Vas Virág

Rovatvezetők:

Bősze Szilvia (Hazai Tudományos
Műhelyek)
Gallyas Ferenc (Fórum)
Nyitray László (PhD disszertációk
bemutatása, FEBS Network szemelvények)
Sarkadi Balázs (Áttekintő közlemények)
Szűcs Mária (Akkire büszkék vagyunk)

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter

Szerkesztőségi e-mail cím:

biokemia.szerkesztoseg@ttk.hu

Honlap:

www.mbkegy.hu

Felelős kiadó:

Dr. Buday László, az MBKE elnöke

Kiadja:

Magyar Biokémiai Egyesület
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.

Az engedély száma:

III/SZ/397/1977
HU ISSN 2060 8152 (Online)
HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

Bemutakozás:

A BIODÉLIA magyar nyelvű, 1977 óta a MBKE gondozásában megjelenő, on-line folyóirat. Szerkesztőségünk a biokémia, a molekuláris biológia és a kapcsolódó tudományágak területéről jelentet meg tudományos és ismeretterjesztő cikkeket évente négy lapszámban. Emellett közlésre kerülnek tudományos esemény felhívások (elsőséget élveznek a FEBS és a MBKE által szervezett események), konferencia beszámolók, hazai díjak és elismerések nyertesének bemutatása, munkacsoportok bemutatása, friss PhD disszertációk rövid összefoglalói fiatal kutatók tollából. Szerkesztőségünk várja olyan kéziratok, felhívások beérkezését, melyek a MBKE tagok számára érdekesek, hasznosak lehetnek. A lapszámok nyílt hozzáférésű (open access) formában kerülnek közlésre. A tudományos cikk rovatban megjelenő kéziratok szakértői lektorálást (peer review) követően jelenhetnek meg. A korábbi évfolyamok számai a MBKE honlapján (www.mbkegy.hu) kereshető formában elérhetőek.

Címlapkép:

A képen az S100 fehérjék atomi felbontású szerkezetei láthatók neveik feltüntetésével. Készítette: Ecsédi Péter

Tartalomjegyzék

Szerkesztői rovat

3 Főszerkesztői levél

Akkire büszkék vagyunk

4 Kitüntetések, díjak

5 Ecsédi Péter Akadémia Ifjúsági díjas írása: A S100-fehérjecsald kölcsönhatási hálózatának feltérképezése

Hazai tudományos műhelyek

20 Tárnoki-Zách Júlia, Bősze Szilvia, Czirók András: Új, automatizált in vitro modellek terápiás szerek fejlesztésében: a „Szöveti modellek Laboratórium” bemutatása

Tudományos cikk

28 Zámbo Boglárka, Gógl Gergő: Biológiai mechanizmusok mélyreható elemzése az újgenerációs interaktomika használatával

PhD disszertációk bemutatása

40 Tóth Eszter Ágnes: Fehérjekorona képződés az extracelluláris vezikulák felszínén a vérplazmában

47 Szinyákovics Janka: Az autofág kapacitás életkorfüggő szabályozása Drosophila Melanogasterben

Konferencia beszámoló

52 Vas Virág: Beszámoló az MBKE Vándorgyűléséről

FEBS Network szemelvények

57 Lipinszki Zoltán: FEBS 48. Kongresszusa

62 Nagy-Kanta Eszter: FEBS Young Scientists' Forum

64 Réthi-Nagy Zsuzsanna: Élménybeszámoló a 2024-es FEBS kongresszusról

Felhívások

65 FEBS Advanced Lecture Course: Epigenetika Konferencia

66 VI. Sejt-, Fejlődés- és Össejtbiológiai Konferencia

67 Áttekintő közlemények az MBKE tagjainak tollából

68 PhD disszertációk bemutatása

69 Fórum

Tisztelt Olvasóink! Kedves Kollégák!

Alexa Anita
főszerkesztő

Nagy izgalommal vágtunk bele a szeptemberi szám szerkesztésébe, hisz Dr. Szűcs Mária 15 évnyi munka után adta át a stafétabotot nekem a főszerkesztői székben. Szerencsére egy tapasztalt, lelkes szerkesztői csapat maradt mellettem, és Szűcs Mária előző főszerkesztőnk támogatásával továbbra is segíti a Biokémia megjelenését. Továbbá ő szerkeszti az „Akikre büszkék vagyunk” rovatot is. Ebben a számban Ecsédi Péter Akadémiai Ifjúsági díjas összefoglalóját olvashatjuk az S100-fehérjék világáról.

Ajánlom Önöknek Bősze Szilvia műhelybemutatóját, aki főszerkesztői kérésre saját kutatócsoportját mutatja be.

Tudományos cikként két fiatal, tehetséges és ambiciózus kutató, Zámbó Boglárka és Gógl Gergő összefoglalóját olvashatjuk Franciaországban végzett munkájukról.

Sok konferencia volt a nyár folyamán, ezekről is olvashatunk beszámolókat, úgymint a MBKE augusztusi vándorgyűlésének eseményeiről és a FEBS milánói kongresszusáról. Az utóbbi konferenciáról 3 felkért beszámolót is kaptunk: Lipinszki Zoltánét és két fiatal biokémikusét, Réthi-Nagy Zsuzsánáét és Nagy-Kanta Eszterét.

Bérdi Péter technikai szerkesztő segítségével egy kicsit megújult a folyóirat formája. A következő célunk az lesz, hogy könnyebbé tegyük a szerzőinknek és a szerkesztőknek a cikkek megírását, formázását illetve szerkesztését. Egy egységes, könnyen kezelhető sablont szeretnénk készíteni, de még nem tudjuk a módját. Ehhez kérnénk segítséget tisztelt olvasóinktól. Javaslataikat, meglátásaikat a Biokémia újsággal, vagy a magával a biokémiával kapcsolatban Gallyas Ferenc várja a Fórum rovatban. Az újság fokozatos formai és tartalmi megújulása mellett, új tagot is köszönhetünk a szerkesztőségben. Új tagunk Vas Virág (HUNREN, TTK, MÉI), aki Kiricsi Mónika helyére lépett a szerkesztőségben. Ezúton is hálásan köszönjük Mónika eddigi munkáját az újság szerkesztésében!

Biztatom Önöket, hogy bátran küldjenek tudományos cikkeket, áttekintő írásokat, PhD-összefoglalókat, műhelybemutatókat, illetve véleményeket a biokémiával és határterületeivel kapcsolatban.

A mostani számhoz pedig szerkesztő társaimmal együtt jó olvasást kívánunk!



Balról jobbra Vas Virág szerkesztőségi titkár, Bérdi Péter technikai szerkesztő és Alexa Anita főszerkesztő látható.

Az MBKE tagjainak elismerései 2024. június 15. és 2024. szeptember 1. között

Az **Academia Europaea** tagjai közé választották **Horváth Pétert**, a HUN-REN SZBK Biokémiai Intézetének igazgatóját, aki a tumoros megbetegedések diagnosztizálását segítő, mesterséges intelligencián alapuló mikroszkópos rendszer kifejlesztésének elismeréseként került be a rangos tudományos szervezetbe.

Kiemelkedő tevékenysége elismeréseként **Magyar Arany Érdemkereszt polgári tagozat** kitüntetésben részesült **Dr. Csonné Dr. Kiricsi Mónika**, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kara Biológia Intézetének oktatási intézetvezetőhelyettese, egyetemi docens. Mónika 15 éven keresztül (2009. november-2024. június) volt a BIODÉKA folyóirat szerkesztőségének a titkára.



Gratulálunk a kitüntetetteknek!

A S100 fehérjecsalád kölcsönhatási hálózatának feltérképezése

Ecsédi Péter

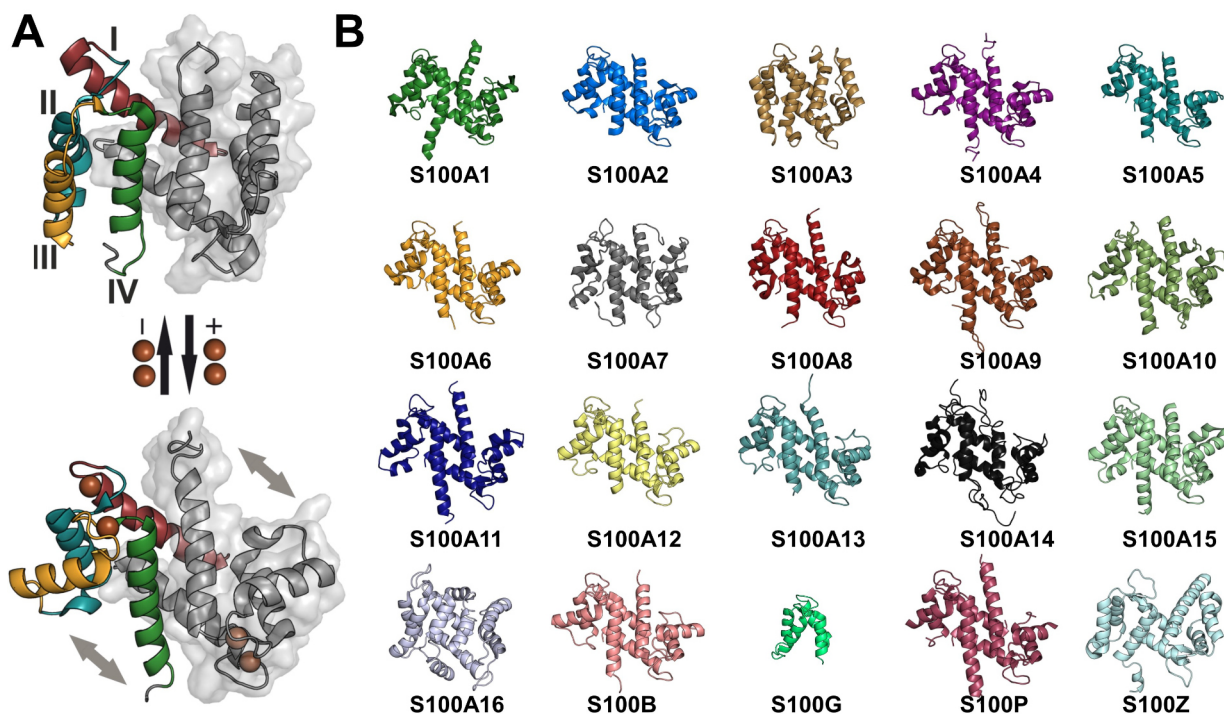
Eötvös Loránd Tudományegyetem,
Természettudományi Kar, Biokémiai Tanszék
e-mail: peter.ecsedi@ttk.elte.hu

Bevezetés

Az alábbi összefoglaló eddigi kutatómunkám eredményeiből készült, különösképpen az S100 fehérjecsaláddal kapcsolatos vizsgálataimra fókuszálva, amely az Akadémiai Ifjúsági Díjat elnyerő pályázatomból túlnyomó részét alkotta. Írásommal szeretném az olvasókkal megismertetni ezt az egyre nagyobb teranostikai (egyszerre terápiás és diagnosztikai) jelentőséggel bíró fehérjecsaládot, bemutatni patológiás szerepüket, és rámutatni, hogy miért nehéz ezen fehérjék terápiás célzása, illetve azt, hogy jelenleg milyen lehetőségei és nehézségei vannak annak, hogy kiaknázhassuk tudásunkat a családdal köthető betegségek elleni harcban.

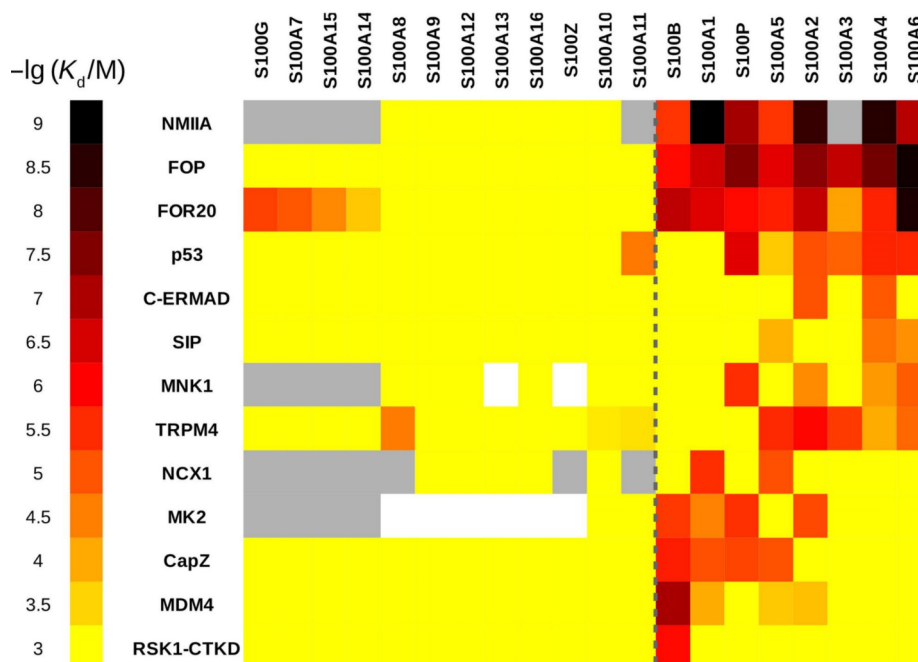
A Ca^{2+} -kötő S100 fehérjecsalád bemutatása és teranostikai értékük

Az S100 fehérjék története 1965-ben kezdődik, amikor az emberi agy vizsgálata során egy úgynevezett „S100” fehérjefrakciót állítottak elő a kutatók. A frakció a nevét onnan kapta, hogy a benne jelen levő fehérjék még telített ammónium-szulfát oldatban sem csapódnak ki [1].



1. ábra. A Ca^{2+} kötődésének szerkezetére gyakorolt hatása az S100A4-en bemutattva és az S100 fehérjék atomi felbontású szerkezetei. (A) Az S100A4 dimer natív formája (PDB azonosító: 1M31). Az egyik monomer szürkével, míg a másik monomer négy hélice színesen látható. Ca^{2+} (barna gömbök) kötődését követően a III-as hélix elfordul, és megjelenik az S100-akra jellemző hidrofób kötőárok (szürke nyilak) (PDB azonosító: 3C1V). **(B)** Az S100 fehérjék atomi felbontású szerkezetei (PDB azonosítók: S100A1: 2LP3, S100A2: 4DUQ, S100A3: 3NSO, S100A4: 2Q91, S100A5: 4DIR, S100A6: 1K9K, S100A7: 3PSR, S100A8: 5HLO, S100A9: 6ZDY, S100A10: 4FTG, S100A11: 1QLS, S100A12: 1E8A, S100A13: 2EGD, S100A14: 2M0R, S100A15: 8S9W, S100A16: 2L51, S100B: 3D10, S100G: 2MAZ, S100P: 1J55 és S100Z: 5HYD).

Évekkel később sikerült két különböző fehérjét azonosítani a felülúszóból sertésben [2], melyek az S100 α és S100 β nevet kapták (a mai nevezéktan szerint S100A1 és S100B). Ezen fehérjéket először agyspecifikusnak, pontosabban gliasejt-specifikusnak gondolták, amely feltételezés egészen 1981-ig fennállt [3]. Azóta több, a családhoz tartozó fehérjét fedeztek fel, és kiderült az is, hogy számos szervben és szövetben előfordulhatnak, jelenlétük nem korlátozódik az agyra. Ma az S100 fehérjéket az EF-kéz motívummal rendelkező kalciumkötő fehérjék szupercsaládjába soroljuk. Kicsi, homo- és néhány ismert esetben heterodimer (kivétel az S100G, amely csak monomer formában van jelen) molekulák, és mai ismereteink alapján azt mondhatjuk, hogy a korai gerincesekben jelentek meg. Emberben szűken véve 20, szerkezetében nagyon hasonló paralógot ismerünk (1. ábra) [4]. E tagok közül 16 génje, nevezetesen az S100A1–A16, szorosan egymáshoz csoportosulva ugyanazon kromoszómán helyezkedik el (1q21), míg az S100B, S100G, S100P és S100Z génjei különböző helyeken találhatóak (21q22, Xp22, 4p16 és 5q13, megfelelően) [5].



2. ábra. Az S100 fehérjék kölcsönhatási hálózatának bemutatása [15]. Ezen kölcsönhatások alapján az S100 fehérjék két fő funkciós csoportot alkotnak, 1) árva: kevés kötőpartnerrel rendelkezők, vagy nem ismertek még a partnerek (balra); 2) promiszkus: több egymással átfedő kölcsönhatással rendelkezők (jobbra). Az egyes kölcsönhatások erősségét különböző színek jelölik [15].

Az S100 fehérjék nem rendelkeznek enzimaktivással, hatásukat számos fehérjével történő kölcsönhatásaikon keresztül képesek kifejteni úgy, hogy azok működését módosítják, funkcióikhoz fontos felszíneik elfoglalásával. Tudni kell, hogy az S100 fehérjék a kölcsönhatásaikat Ca^{2+} -függő módon alakítják ki. A Ca^{2+} kötődését követő konformációváltozás hatására egy hidrofób felszín jelenik meg az S100 fehérjéken, mely alkalmas a partnermolekulák megkötésére (1. ábra) [6]. Az S100A10 kivételt jelent a családban, mert nem képes Ca^{2+} koordinálására és egy konstitutívan aktív, nyitott konformációt vesz fel. Olyan ismert fehérjék tartoznak az S100 fehérjék kötőpartnerrei közé, mint a „genom őrzője”, a p53 [7-9], a nem-izom miozin 2 (NM2A) motorfehérjék [10, 11], a Ca^{2+} - és membránkötő annexin A2 (ANXA2) [12, 13], a riboszomális S6 kináz 1 (RSK1) [14], vagy a centroszomális fehérjék közül a FOP [15] és a FOR20 [16]. Ezen partnerek kölcsönhatását sok esetben csak egyes S100 fehérjékkel vizsgálták korábban, de a teljes interakciós hálózatot mi tanulmányoztuk először, a fehérjecsalád összes

tagját bevonva a kutatásba (2. ábra) [15, 17]. Munkánk során magas promiszkuitást találtunk az egyes S100 fehérjék között, mely valószínűleg a fehérjecsaládon belüli nagy szekvenciális és szerkezeti hasonlóságoknak köszönhető [18]. Az S100 fehérjék általában partnereik rendezetlen szakaszaival lépnek kölcsönhatásba, így a megfigyelt promiszkuitáshoz hozzájárulhat, hogy a kötéseknél kevésbé lép fel a konformációs szelekció, a kötőfelszínnek nem kell idomulnia egy jól definiált partnerszerkezethez is [19].

1. táblázat. S100 fehérjék és a megváltozott expressziójukhoz kapcsolt betegségek.

| S100 fehérje | Reumás betegségek | Tumороk | Neurodegeneratív betegségek | Szív- és érrendszeri betegségek |
|--------------|-------------------|---------|-----------------------------|---------------------------------|
| S100A1 | | | + | + |
| S100A2 | | + | | + |
| S100A4 | + | + | | + |
| S100A5 | | | | + |
| S100A6 | | + | + | + |
| S100A7 | + | | + | + |
| S100A8 | + | + | + | + |
| S100A9 | + | + | + | + |
| S100A11 | + | + | | + |
| S100A12 | + | | + | + |
| S100B | + | + | + | + |

A táblázat csak azon S100 fehérjéket mutatja, melyeket már kapcsolatba hoztak valamilyen a négy kategóriába sorolható betegséggel [21, 23, 27, 28].

Az S100 fehérjék élettani funkciói még mindig csak hézagosan ismertek, de ismerve a kiterjedt kölcsönhatási hálózatukat nem meglepő, hogy szerepet játszanak intracellulárisan olyan folyamatokban, mint a proliferáció, a differenciáció, az apoptózis, a Ca²⁺-homeosztázis és az energia-anyagcsere, míg extracellulárisan képesek aktiválni számos felszíni receptort [5, 20]. Az S100 család tagjai iránti érdeklődés annak köszönhető, hogy számos betegséggel kapcsolhatóak össze, mint például a kardiomiopátiák [21], a tumoros elváltozások [22], valamint a gyulladós [23] és neurodegeneratív betegségek [24]. Ritka kivétellel egytől egyig egy vagy több S100 fehérje megemelkedett expressziós szintjét mutatták ki sok, ezen betegségben szenvedő páciensnél [5, 6, 25]. Az S100 fehérjékhez kapcsolódó kutatási eredmények és kapcsolatuk az említett betegségekhez meglehetősen sokrétű, amelyet az 1. táblázatban próbáltam lényegre törően összefoglalni. Ezen megfigyelések és negatív kapcsolatok miatt az S100 fehérjék ma diagnosztikai (2. táblázat) és egyben ígéretes terápiás (3. táblázat), azaz teranosztikai célpontoknak számítanak [26].

Mivel az említett betegségek egyénenként mások lehetnek, nem nagyon lehet általános megállapításokat tenni az egyes S100 fehérjék hatásaira sem, érdemes feltérképezni az S100 család kölcsönhatásait; a receptoraiktól, a jelátviteli útvonalakon keresztül az intracelluláris kötőpartnereikig. A család tagjai – köszönhetően széles partnerhálózatuknak – a legkülönbözőbb módokon képesek hatni az egyes sejtek működésére, s talán ezért is, jelenleg a szakirodalomban nincsen egyértelmű konszenzus azt illetően, hogy az egyes S100 fehérjék az adott szervben, szövetben és fiziológiás/patológiás stádiumban pontosan hogyan érik el hatásukat. Ennek feltérképezése jelenleg is zajlik, és eddigi munkám is ezen ismeretekhez járult

hozzá, elsősorban a kölcsönhatások atomi felbontású megismerésére fókuszálva. Ez a tudás elengedhetetlenek, hogy megtalálhassuk az S100 fehérjék átfedő kölcsönhatási hálózatában fellelhető apró különbségeket, és azokat célozva partner és/vagy S100-specifikus gátlószereket fejleszthessünk a jövőben.

2. táblázat. Az S100 fehérjék legfontosabb diagnosztikai lehetőségei.

| S100 fehérje | Patológiás állapot |
|-------------------|---|
| S100A2 | Endometriális karcinóma [29] |
| S100A4 | Premetasztatikus állapotok [30] |
| | Amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) [31] |
| | Reumatoid artritisz [32] |
| | Magas és laphámsejtes adenokarcinóma [33] |
| S100A6 | Adenokarcinóma [34, 35] |
| | Laphámsejtes karcinóma [34, 35] |
| | Kissejtes tüdőrák [34, 35] |
| | Húgyhólyagrak [36] |
| S100A7 és S100A15 | Pikkelysömör [37] |
| S100A8/A9 | Reumatoid artritisz [38] |
| | Gyulladásos bélrendszeri betegségek [39] [40] |
| | Mellrákos tumorok [41] |
| | COVID-19 súlyossága [42] |
| S100A10 | Mellrák áttétképző képesség [43] |
| | Késői stádiumú nem-kissejtes karcinóma [44] |
| S100A14 | Mellrák [45, 46] |
| S100B | Gyenge traumatikus agysérülés általi koponyán belüli sérülés [47] |
| S100P | Tüdőrák áttétképzés [48] |
| | Végbélrák áttétképzés [49] |

3. táblázat. Ismertebb S100 fehérjék elleni terápiás lehetőségek.

| S100 fehérje | Patológiás állapot | Terápiás lehetőség |
|--------------|----------------------|---|
| S100A2 | Mellrák | miR-325-3p általi gátlás [50] |
| | Végbélrák | Delanzomib által az S100A2 és KPNA2 közti kapcsolat megakadályozása [51] |
| S100A4 | Prosztatarák | mab6B12 antitest általi S100A4 gátlás [52] |
| S100A6 | Végbélrák | CacyBP/SIP és S100A6 közti kapcsolat gátlása [53] |
| S100A7 | ER pozitív mellrák | S100A7 vagy RAGE inhibitor [54] |
| S100A9 | Brca1 mutáns mellrák | ICB elleni rezisztencia megszüntetése az S100A9/Cxcl12 jelátviteli útvonal gátlása által [55] |
| S100A10 | Végbélrák | ANXA2/S100A10 komplex gátlása [56] |
| S100B | Végbélrák | Pentamidines vezikulomok által S100B gátlás [57] |
| S100P | Végbélrák | S100P sejtmagba való bejutásának, vagy csak SLC2A5 promóterével való interakciójának megakadályozása [49] |

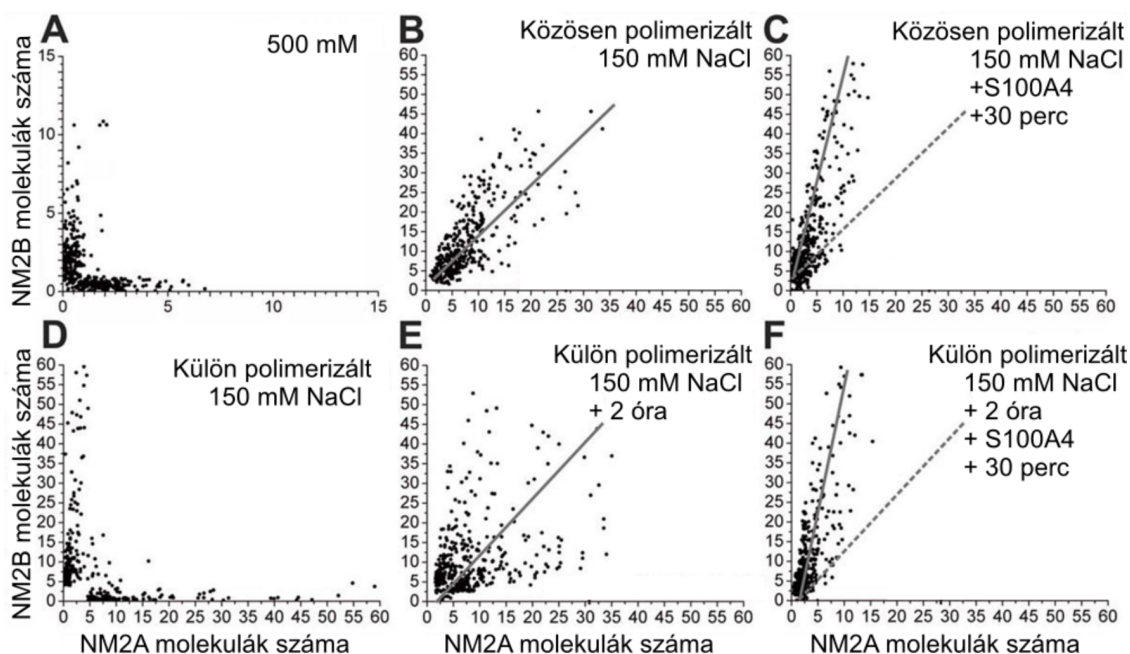
A metasztázis-asszociált S100A4

Patológiás szempontból a fehérjecsalád egyik leginkább vizsgált tagja az S100A4, amelyet korábban metasztázisnak is neveztek. Ez a név jól mutatja, hogy milyen erős összefüggést találtak a fehérje expressziós szintjének változása és a rosszindulatú sejtek metasztatikussá történő progressziója között. A számos állatmodellen végzet kísérlet mellett [58] talán Rudland és munkatársainak eredményei mutatják a legjobban az S100A4 hatását. Ők 349 emlőrákos beteget vizsgáltak és az S100A4 fehérje expresszióját mint a betegek túlélésének legjelentősebb előrejelzőjeként azonosították. Az S100A4-negatív daganatos betegek 80%-a élt 19 évet

követően is, míg az S100A4-pozitív betegeknek csak 11%-a volt még életben ezen idő elteltével [59]. Azóta már hasonló eredményeket találtak máj- [60] és agytumorok [61] esetében is. Feltételezések szerint ez a negatív összefüggés kapcsolatba hozható az S100A4 olyan partnerekkel való kölcsönhatásával, mint a nem-izom miozin 2 (NM2) [58, 62-64], az annexin A2 (ANXA2) [65] vagy a p53 [66].

Az S100A4 – NM2 kölcsönhatás vizsgálata

A gerinceseknél három nem-izomból származó miozin 2 (NM2) paralóg ismert: az NM2A, az NM2B és az NM2C [67, 68]. A paralógok 64–80%-os szekvenciaazonosságot mutatnak, de különböznek az ATP-áz aktivitásuk kinetikájában, a motilitási rátájukban [69-71] és az intracelluláris lokalizációjukban [72-74], valamint megkülönböztethető és átfedő sejtfunkciókat látnak el [75-77]. Az NM2 paralógok funkcionális „minifilamentumokat” képeznek a sejtekben [78, 79]. Az NM2A esetében kimutatható, hogy az S100A4-gyel való kölcsönhatás hatással van a sejtek motilitására úgy, hogy az S100A4 a kölcsönhatása révén megakadályozza az NM2A minifilamentumok képződését [10, 80, 81], ami így nem képes a citoszkéletális dinamikát szabályozni. Az S100A4-et túlexpresszázó sejtekben oldalirányú és előrenyúló nyúlványok megjelenése figyelhető meg [81], ami elősegíti a sejtmozgást és így a metasztázist. Az S100A4 – NM2A komplex atomi felbontású szerkezetét a Nyitray-munkacsoport munkatársai oldották meg és publikálták először [10]. Meglepő módon, a dimer S100 fehérjék esetén eddig nem ismert, 1:2-es sztöchiometriát találtak a komplexben, ahol egy NM2A molekula egy S100A4 dimer két kötőhelyével is kölcsönhatásba lépett, ezáltal mintegy körbeölelve a fehérjét. Ebből következett, hogy a korábbról ismert szimmetrikus komplexek helyett az S100A4 aszimmetrikus komplexet alakított ki a partner NM2A-val, s ez az aszimmetrikus kötődés szükséges feltétele a miozin filamentumképződés és szétesés szabályozásának [10].

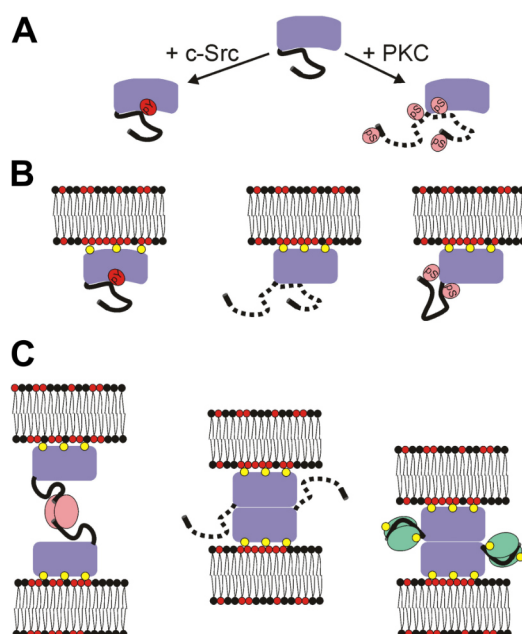


3. ábra. Heterofilamentumok kialakulása és az NM2A-szelektív S100A4 általi szétszerelése [11]. A méréseket teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia (TIRF) mikroszkóppal végeztük, ahol fluoreszcencia alapján az NM2A-t piros, míg az NM2B-t zöld színnel jelöltük. A fluoreszcencia-intenzitások alapján meg lehetett állapítani, hogy egy-egy minifilamentumban hány NM2A és NM2B molekula található. **(A)** 500 mM-os NaCl koncentráció mellett nem képződnek minifilamentumok, és csak gyenge intenzitású foltok észlelhetők (leginkább 2 vagy kevesebb molekula). A minifilamentumokat a NaCl koncentráció csökkentésével két különböző módon lehetett kialakítani. **(B)** A paralógokat magas ionerő mellett összekeverve, majd a sókoncentrációt lecsökkentve, vagy **(D)** a külön képzett minifilamentumokat összekeverve és **(E)** megvárva a filamentumokat alkotó molekulák keveredését (2 óra). **(C)** és **(F)** Az S100A4 szelektíven csökkenti az NM2A molekulák számát. A szürke vonalak az adatokhoz való lineáris illesztést mutatják. A (C) és (F) ábrák szaggatott vonalai a (B) és (E) ábrákon lévő illesztéseket mutatják, hogy hangsúlyozzák a változást.

Folytatva az NM2A-val kapcsolatos munkát, kutatásaim során az NM2A és NM2B minifilamentumok S100A4 általi szabályozását kezdtem vizsgálni. Az már ismert volt, hogy az S100A4 NM2A-val kialakított kölcsönhatása több nagyságrenddel erősebb az NM2B-hez viszonyítva [10, 82] illetve, hogy sejten belül a két NM2 paralóg heterofilamentumokként szerelődik össze, viszont polarizált sejtekben már főként homofilamentumokként eltérő lokalizációt mutat (NM2A a sejt elülső, míg az NM2B a sejt hátsó részén jelenik meg) [83]. Arra nézve eddig nem volt kísérletes bizonyíték, hogy esetlegesen az S100A4-nek lehet-e szabályozó szerepe az NM2 fehérjék sejten belüli eloszlásának kialakításában. Eredményeink megmutatták, hogy az NM2 filamentumokat nemcsak az S100A4, de más, szintén a metasztatikus tumorokkal korábban már kapcsolatba hozott S100 fehérjék (S100A1, S100A2, S100A6 és S100P) is képesek szétszerelni, szintén paralóg specifikus módon, ahogy azt megfigyelték korábban az S100A4-nél. Ezek az eredmények rámutatnak a rokon S100 fehérjék hasonló működésére patológiás esetekben és arra is, hogy egyes szövetekben miért az egyik, míg más szövetekben miért egy másik S100 fehérje okoz nagyon hasonló patológiás állapotot. További eredményeink bebizonyították, hogy az S100A4 képes szelektíven „kiválogatni” az NM2 heterofilamentumokból az NM2A paralógot, ezzel eltolni az egyensúlyt a minifilamentumokon belül (3. ábra). Az NM2B oldaláról hasonló szortírozó mechanizmust találtunk a C-terminális foszforiláció esetében, ami pedig az NM2B filamentumokból való eltávolítására szolgáló folyamat lehet [11].

Az S100A4 képes az S100A10-hez hasonlóan kötődni az ANXA2-höz

Az ANXA2 fehérje a nem EF-kéz Ca^{2+} -kötő fehérjecsalád tagja, amely emberben 12 paralógból áll [84]. Az ANXA2-t az a képessége jellemzi, hogy kalciumfüggő módon képes megkötni és aggregálni („annex”) anionos foszfolipid membránokat [85].



4. ábra. ANXA2 által közvetített liposzóma-aggregációs funkció foszforiláció és S100-kötés általi szabályozása [13]. (A) Az ANXA2 N-terminálisának konformációs flexibilitása nő a Ser26 Proteín kináz C (PKC) (narancs) vagy csökken a Tyr24 proto-onkogén c-Src tirozin kináz (c-Src) (piros) által történő foszforiláció következtében. **(B)** Ca^{2+} -függő (sárga) membránkötéskor, az ANXA2pY24-gyel ellentétben, mind a foszforilálatlan ANXA2, mind az ANXA2pS12–pS26 nyitott konformációt vesz fel; azonban feltehetően a pSer és az Arg oldalláncok közötti ionos kölcsönhatások miatt az ANXA2pS12–pS26 blokkolva van „autoinhibált nyitott állapotban” és az ANXA2pY24-hez hasonlóan nem képes membránaggregációra. **(C)** A natív ANXA2 nyitott konformációja lehetővé teszi az önasszociációt és a membránok összekapcsolását (középen). Az S100A10 (rózsaszín) elősegítheti a membránaggregációt két ANXA2 láncsal való szimmetrikus kölcsönhatása révén. Az S100A4 (zöld) viszont a teljes N-terminálissal való aszimmetrikus kölcsönhatása révén hathat, és a natív fehérjéhez hasonló mechanizmust serkenthet. Fontos megemlíteni, hogy az S100 fehérjék a foszforilálás okozta gátló hatásokat képesek ellensúlyozni.

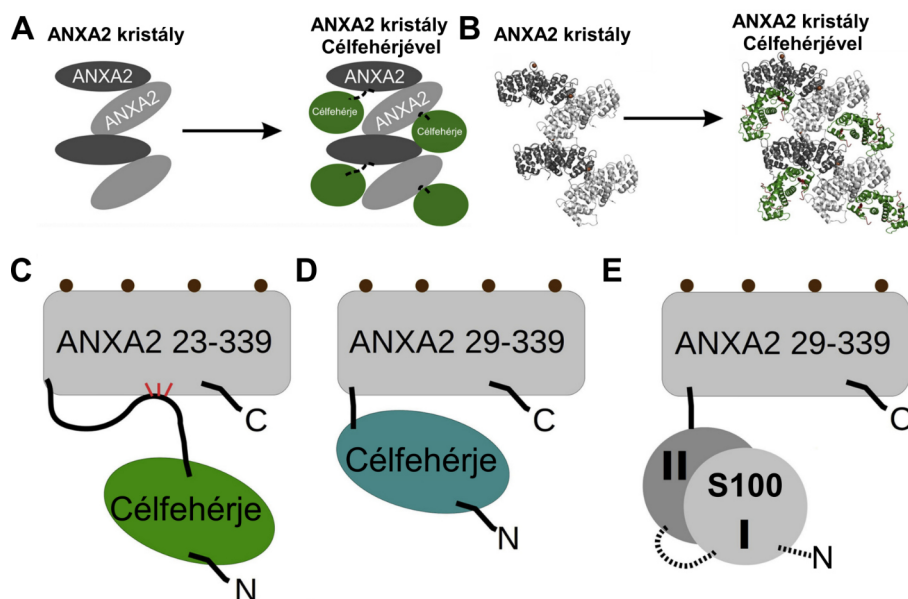
Ez a képesség alapozza meg biológiai funkcióit, beleértve a vezikuláris transzportfolyamatokat, az exocitózist és az endocitózist. Az ANXA2 túlzott expressziója különböző daganattípusokban figyelhető meg, és hozzájárul a rák kialakulásához a tumorsejtek adhéziójának, proliferációjának, apoptózisának, inváziójának, valamint a tumor neovaszkularizációjának befolyásolása révén [86]. Az S100 család úgy kapcsolható az annexinekhez, hogy az S100A10-et először az ANXA2-vel írták le szimmetrikus komplexben (két ANXA2-t köt meg két S100A10 monomer, azaz 1 dimer) [87]. Később bebizonyosodott, hogy az S100 fehérjecsalád más tagjai (S100A4, S100A6 és S100A11) is kölcsönhatásba lépnek az ANXA2-vel [12]. Az ANXA2 működésének szabályozása rendkívül összetett: magába foglalja a Ca^{2+} megkötését, a fehérje foszforilációját és az S100 fehérjékkel való kölcsönhatást. Számos különböző topológiai modellt javasoltak előttünk már az ANXA2 által közvetített membránaggregáció magyarázatára [88-90], a foszforilált és az S100A4-kötött ANXA2 3D-struktúráinak ismerete nélkül azonban az általuk közvetített szabályozás mechanizmusa tisztázatlan volt. Az általunk megoldott atomi felbontású szerkezetek (ANXA2 – S100A4 komplex PDB: 5LPU; ANXA2p24Y foszforilált PDB:5LQ0 és 5LQ2; ANXA2S26E foszfomimikált PDB:5LPX szerkezetek) segítségével felállíthattunk egy új, szélesebb körű működési modellt az ANXA2 membránaggregációs képességének szabályozásáról (4. ábra). Megszületett az első olyan S100-komplex szerkezeti modell is, amely nem csak a lineáris kötőmotívumot, hanem a teljes méretű partnerfehérjét tartalmazza, azonfelül egy újabb aszimmetrikus S100 kölcsönhatás szerkezetét ismerhettünk meg (egy partner kötődik a dimer S100 fehérjéhez, hasonlóan az NM2A – S100A4 és az Rsk1 – S100B komplexhez [14]). Utóbbi bizonyította, hogy az aszimmetrikus kölcsönhatások az S100 fehérjecsaládon belül sokkal gyakoribbak lehetnek, mint azt korábban gondolták [13].

Az ANXA2 felhasználása mint kristályosító segédfehérje

A fehérjekrisztallográfia még ma is a szerkezeti biológiai legfontosabb technikája. A szerkezetmegoldó módszerek folyamatos fejlődése azt okozta, hogy a fehérjekrisztallográfia elsődleges limitáló lépésévé a molekulák kristályrácsba rendezése vált, ez viszont még ma is nagy kihívások elé állítja a kutatókat. A kristályosodás folyamatát számos tényező befolyásolja, beleértve a fehérje kémiai jellemzőit, a környezeti tényezőket és a konformációs heterogenitást [91], illetve általában nagy mennyiségű tisztított fehérje szükséges hozzá. Egy népszerű módszer a fehérje expressziójának és tisztításának elősegítésére affinitás címkék használata a célfehérjéhez fuzionálva, mint például a His6-tag [92], a maltóz-kötő fehérje (MBP) [93], a glutation S-transzferáz (GST) [94], a tioredoxin (TRX) [95], vagy más rövid peptid vagy stabil fehérje [96]. A kristályosítás előtt ezeket a címkéket rendszerint helyspecifikus proteázok segítségével eltávolítják, ami a célmolekula kicsapódásához és/vagy aktivitásának elvesztéséhez vezethet [97]. Emiatt számos esetben fuzionált állapotban tartják meg a célfehérjéket. Ennek a fentiekén túl két másik előnye is lehet. Az egyik, hogy az affinitás címke kristályosodó képessége így kihasználható, ami segítheti a kristályosodás folyamatát, a másik, hogy a kiméramolekula ismert szerkezete felhasználható az adatfeldolgozás folyamán a molekuláris helyettesítés és a szerkezet finomítása során. Erre a célra sikeresen alkalmazták már a mannóz kötő fehérjét (MBP), a glutation-S-transzferázt (GST) és a tioredoxint (TRX) [98, 99], más jól kristályosodó fehérjékkel együtt, mint például a lizozim [100-102] vagy különböző antitest-fragmensek [103]. Eddig azonban csak az MBP tűnt általánosan hatékony kristályosító chaperonnak [98, 104], és kevés erőfeszítés történt olyan alternatívák megtalálására, amelyek hasonlóan jók vagy akár alkalmasabbak is erre a kettős szerepre. A *Protein Data Bankban (PDB)*, amely az atomi felbontású térszerkezetek tárháza, a kristályosító segédfehérjék alkalmazásával megoldott

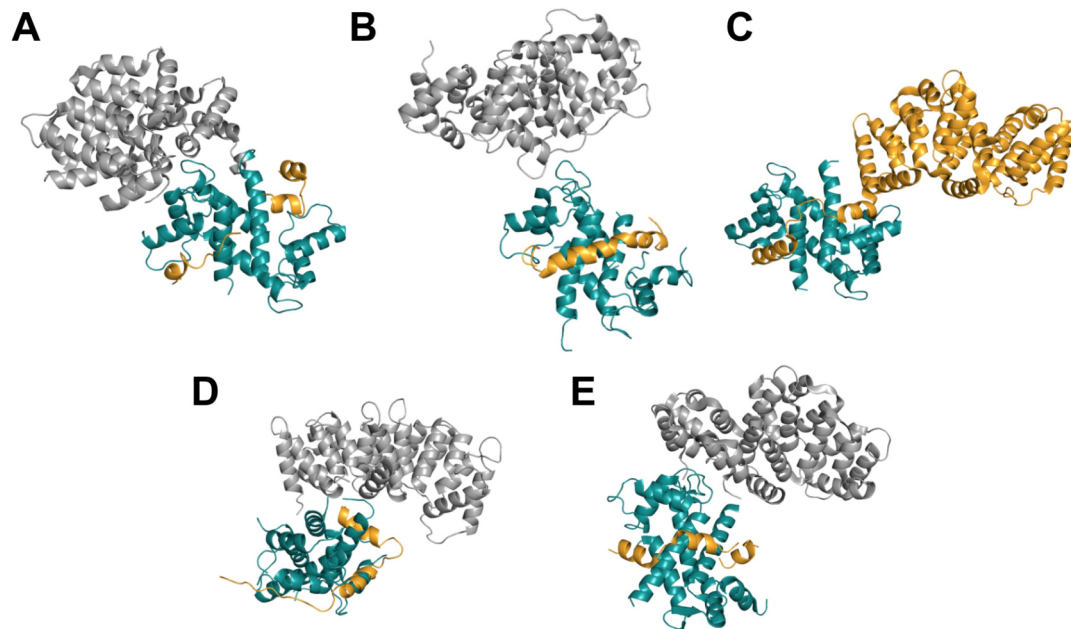
szerkezetek száma folyamatosan növekszik, ami azt jelzi, hogy ez a megközelítés rendkívül hatékony eszköz lehet a nehezen kristályosítható fehérjék vagy fehérjekomplexek szerkezetének megoldására. Ilyen nehéz célpontra példa az S100 fehérjék és komplexeik is, köszönhetően rendkívül jó oldékonyságuknak. Mi is számos kísérletet tettünk a p53 – S100A4 komplex kristályosítására önmagában, GST vagy vad típusú MBP (wtMBP) címkék felhasználásával, de ezek egyike sem járt sikerrel. Ezen felül a korábban megoldott NM2A – S100A4 szerkezet megismerése is csak a kristályosítást segítő aminosavcserék bevitelével vált lehetségessé [10]. Ezek a kutatócsoportunk általi próbálkozások is jól szemléltetik, hogy az S100 fehérjék kristályosítása komoly nehézségekkel jár. Itt fel is merül a kérdés, hogy találhatnánk-e egy az MBP-nél is hatékonyabb kristályosító segédfehérjét, ami felhasználható lenne az S100 fehérjékkel végzett kutatások során.

Az ANXA2-vel végzett szerkezeti munkák megmutatták számunkra, hogy az ANXA2 rendkívüli kristályosodó képességgel rendelkezik, sőt kristálypakolódása kiszámítható és rendszerében oldatcsatornák alakulnak ki, amelyekben a célfehérjék a kristályosodás folyamán elhelyezkedhetnek (5. ábra) [9]. Az ANXA2 ezen előnyös tulajdonságának kihasználása céljából terveztünk két fúziós segédfehérje rendszert (5. ábra). Az egyik konstrukció (ANXA2²²³⁻³³⁹) tartalmazza az ANXA2 N-terminálisának egy részét, amely visszakötődik a globuláris C-terminális doménra és ezzel stabilizálva azt, így elősegítve a kristályképződést. A szerkezeti plaszticitása miatt ez a kölcsönhatás esetenként megszűnhet, aminek hatására kialakulhat egy hosszú, rendezetlen linker a célfehérje és az ANXA2 között, ami viszont nagyban gátolhatja a kristályképződést. A másik konstrukció (ANXA2²²⁹⁻³³⁹) nem tartalmazza az ANXA2 N-terminális szakaszát, ezzel kizárva ezt a lehetőséget. A két konstrukciót vegyesen használva számos S100-kölcsönhatás (6. ábra) és PDZ-domén, illetve -kölcsönhatás [105, 106] atomi felbontású szerkezetét ismerhettük meg. Az általunk végzett munka mellett reményeink szerint az ANXA2 segédfehérje rendszer szélesebb körben is használható lesz más szerkezeti biológiai kutatásoknál is.



5. ábra. Az ANXA2-kristály szerkezete és az ANXA2-höz történő fúziós lehetőségek [9]. Az ANXA2 kristálypakolóadásának (A) szematikus és (B) szerkezeti ábrázolása célfehérje nélkül és célfehérjével. Az ANXA2 fúziós lehetőségei (C) hosszabb és (D) rövidebb összekötő szakasszal. A hosszabb szakasz az ANXA2-t stabilizáló kölcsönhatásokat is tartalmaz (piros vonalak), viszont ezen kölcsönhatások megszűnése esetén a linker hossza zavarhatja a fehérjekristály képződését. (E) Az S100 fehérjék esetében használt konstrukció szematikus ábrázolása. Az S100 monomerek is össze lettek kapcsolva (szaggatott vonal), hogy konstrukciónként egy ANXA2 legyen csak jelen.

Ami az S100 fehérjéket illeti, fő célunk az volt, hogy a megismert kölcsönhatási hálózat legtöbb eleméről kapjunk 3D-s szerkezetet, de erősen fókuszáltunk a specifikus kölcsönhatásokra. Az eddigi eredményekből az látszik, hogy a nagy affinitású kötődések esetében a partner nemcsak az S100 fehérjék Ca^{2+} -indukált kanonikus kötőzsebeivel lép kölcsönhatásba, hanem a köztes, a két monomer határán lévő felszínnel is. Ilyen típusú kötődés figyelhető meg az NM2A – S100A4, a p53 – S100P és a FOP – S100P komplexeknél, melyek disszociációs állandó (K_d) értékei nM-osak, vagy még erősebbek. Velük szembe állítható a p53 – S100A4 és az ANXA2 – S100A4 kölcsönhatások, melyek K_d értékei μM feletti, így kisebb affinitású kölcsönhatásokról van szó. Esetükben a partnerek szinte csak a kanonikus kötőzsebekkel lépnek kölcsönhatásba és csak tranziens interakciókat alakítanak ki a köztes részekben. Sajnos olyan más nagy affinitású kölcsönhatásokról nem sikerült adatokat szereznünk, mint a FOP – S100A6, FOR20 – S100A6, NM2A – S100A1 és az NM2A – S100A2, melyek ismerete tovább erősíthette volna feltevésünket. További izgalmas kölcsönhatások megismerése is várat magára, mint az NM2B – S100A4, mely az NM2A paralóghoz képes több nagyságrenddel gyengébb kölcsönhatás. Érdekes lenne látni a két NM2 paralóg kötődésének különbségeit. Ha esetükben is beigazolódna, hogy az NM2B nem használja az S100A4 köztes hélixeit, akkor az egy támadási lehetőség lehet egy csak NM2A kölcsönhatást célzó inhibitor fejlesztésére. Ugyanez igaz a p53 esetében is, amely gyenge kölcsönhatásokat alakít még ki az S100A6-tal és az S100A2-vel is, melyek feltételezéseink szerint a p53 – S100A4 kölcsönhatáshoz hasonlíthatnak, ezzel eltérve a p53 – S100P komplextől, ami szintén egy specifikus, a kölcsönhatást célzó inhibitor fejlesztési lehetőséget adna. A sort tovább lehetne folytatni a FOP, illetve FOR20 által kialakított kölcsönhatások jobb megismerésével, hasonló céllal.



6. ábra. Az ANXA2 felhasználása különböző S100 fehérjekomplexek szerkezeteinek megoldásához. (A) A p53 – S100A4 (PDB kód: 6T58), (B) egy affinitás növelt NM2A peptid – S100A4 (még publikálatlan szerkezet), (C) az ANXA2 – S100A4 (PDB kód: 5LPJ), (D) FOP – S100P (még publikálatlan szerkezet) és (E) a p53 – S100P (PDB kód: 7NMI) komplexek atomi felbontású szerkezetei. Narancssárgával a kölcsönható partnerek, türkizként az S100 fehérjék míg szürkével az ANXA2 látható. Az ANXA2 a (C) ábrán mint kölcsönható partner szerepel, míg a többi ábrán kristályosító segédfehérjeként.

Látható, hogy még sok kölcsönhatás nem ismert a kiterjedt S100 kölcsönhatási hálózatból, de munkánk elkezdte feltérképezni az S100 komplexek közötti apró különbségeket, melyeket a jövőben remélhetőleg ki is aknázhatunk.

Összegzés

Az S100 család több tagja is igen ígéretes jövő előtt áll mind diagnosztikai, mind pedig terápiás szempontból. Előbbi esetében nem is csupán általánosabb jellegű patológiás állapotok felmérésében – mint például a megnövekedett áttétképződés – játszhatnak még nagyobb szerepet a jövőben, hanem az adott szerven belüli specifikusabb ráktípusok megállapításánál, de akár az egyes ráktípusokon belül az adott stádiumok azonosításánál is. Utóbbi esetében, mivel a család tagjaihoz köthető patológiás esetek többségében az S100 fehérjék mennyiségének növekedése figyelhető meg, amely nem kívánt kölcsönhatásokat eredményez, azok különböző módokon és sikerességgel visszafordíthatók vagy megállíthatók. Bár több S100 fehérje esetében is rendelkezünk konkrét molekulákkal, amelyek eddigi ismereteink szerint megoldást jelenthetnének az adott fehérje által okozott patológiás állapot megszüntetésében vagy enyhítésében, ezeket nem mondhatjuk még kellően specifikusnak és jelenleg még nem látható, hogy milyen más S100 fehérjék fiziológiás funkcióit kapcsolják ki egyidőben. Arról nem is beszélve, hogy az egyes S100 fehérjék nem feltétlen csak párhuzamosan, de akár egymással szinergisztikusan is hathatnak az adott patológiás állapotra. Emiatt a család tagjait egységesen kell vizsgálnunk és nem szabad következtetéseket levonnunk egy-egy tag izolált mechanizmusának megismeréséből. Munkánk során ezt tartva szem előtt próbáltuk minél jobban kiszélesíteni az S100 fehérjecsaláddal kapcsolatos ismereteinket.

Mindezek alapján a fehérjecsalád teranosztikai lehetőségeit firtatva, véleményem szerint inkább a diagnosztika irányába mutatnak jobb tendenciák a jövőbeli alkalmazásokat illetően. Hozzáteszem, ezen a vonalon mi is fejlesztettünk egy, a jelenleg kapható S100A4 kimutatására alkalmas teszteknel specifikusabb és egyszerűbben alkalmazható ELISA-alapú eljárást. Ezek az eredmények jelenleg publikálás előtt állnak, de reményeink szerint felhasználják majd a jövőben az S100A4 kimutatásakor, amikor annak mennyiségi vizsgálata már szélesebb körben is a diagnosztika részévé válik.

Köszönetnyilvánítás

Munkám nem jöhetett volna létre Dr. Nyitray László és kutatócsoportja (ELTE Biokémiai Tanszék) nélkül. Nehéz felsorolni mindenkit, akinek szerepe volt abban, hogy az itt bemutatott eredményeket elérhessük, de ki kell emelnem Dr. Kiss Bencét, Dr. Gógl Gergőt, Dr. Simon Márton Andrást, Hóf Henriettát, Érfalvy Dávidot és Katran Viktoriát.

Irodalomjegyzék

- [1] Moore, B.W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*, **19**: (6) 739-44.
- [2] Abe, T., Takahashi, K., Ando, T. (1974) Purification and properties of S-100 protein from porcine brain. *J Biochem*, **75**: (1) 11-22.
- [3] Cocchia, D. (1981) Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. *Cell and tissue research*, **214**: (3) 529-40.
- [4] Donato, R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et biophysica acta*, **1450**: (3) 191-231.
- [5] Marenholz, I., Heizmann, C.W., Fritz, G. (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and biophysical research communications*, **322**: (4) 1111-22.
- [6] Bresnick, A.R., Weber, D.J., Zimmer, D.B. (2015) S100 proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **15**: (2) 96-109.
- [7] Fernandez-Fernandez, M.R., Rutherford, T.J., Fersht, A.R. (2008) Members of the S100 family bind p53 in two distinct ways. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **17**: (10) 1663-70.

- [8] van Dieck, J., Brandt, T., Teufel, D.P., Veprintsev, D.B., Joerger, A.C., Fersht, A.R. (2010) Molecular basis of S100 proteins interacting with the p53 homologs p63 and p73. *Oncogene*, **29**: (14) 2024-35.
- [9] Ecsedi, P., Gogl, G., Hof, H., Kiss, B., Harmat, V., Nyitray, L. (2020) Structure Determination of the Transactivation Domain of p53 in Complex with S100A4 Using Annexin A2 as a Crystallization Chaperone. *Structure*, **28**: (8) 943-953 e4.
- [10] Kiss, B., Duelli, A., Radnai, L., Kekesi, K.A., Katona, G., Nyitray, L. (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**: (16) 6048-53.
- [11] Ecsedi, P., Billington, N., Palfy, G., Gogl, G., Kiss, B., Bulyaki, E., Bodor, A., Sellers, J.R., Nyitray, L. (2018) Multiple S100 protein isoforms and C-terminal phosphorylation contribute to the paralog-selective regulation of nonmuscle myosin 2 filaments. *J Biol Chem*, **293**: (38) 14850-14867.
- [12] Liu, Y., Myrvang, H.K., Dekker, L.V. (2015) Annexin A2 complexes with S100 proteins: structure, function and pharmacological manipulation. *British journal of pharmacology*, **172**: (7) 1664-76.
- [13] Ecsedi, P., Kiss, B., Gogl, G., Radnai, L., Buday, L., Koprivanacz, K., Liliom, K., Leveles, I., Vertessy, B., Jeszenoi, N., Hetenyi, C., Schlosser, G., Katona, G., Nyitray, L. (2017) Regulation of the Equilibrium between Closed and Open Conformations of Annexin A2 by N-Terminal Phosphorylation and S100A4-Binding. *Structure*, **25**: (8) 1195-1207 e5.
- [14] Gogl, G., Alexa, A., Kiss, B., Katona, G., Kovacs, M., Bodor, A., Remenyi, A., Nyitray, L. (2016) Structural Basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) Inhibition by S100B Protein: MODULATION OF THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE (ERK) SIGNALING CASCADE IN A CALCIUM-DEPENDENT WAY. *J Biol Chem*, **291**: (1) 11-27.
- [15] Simon, M.A., Ecsedi, P., Kovacs, G.M., Poti, A.L., Remenyi, A., Kardos, J., Gogl, G., Nyitray, L. (2020) High-throughput competitive fluorescence polarization assay reveals functional redundancy in the S100 protein family. *FEBS J*, **287**: (13) 2834-2846.
- [16] Sakane, K., Nishiguchi, M., Denda, M., Yamaguchi, F., Magari, M., Kanayama, N., Morishita, R., Tokumitsu, H. (2017) Identification and characterization of a centrosomal protein, FOR20 as a novel S100A6 target. *Biochemical and biophysical research communications*, **491**: (4) 980-985.
- [17] Kiss, B., Ecsedi, P., Simon, M., Nyitray, L. (2019) Isolation and Characterization of S100 Protein-Protein Complexes. *Methods in molecular biology*, **1929**: 325-338.
- [18] Heizmann, C.W., Fritz, G., Schafer, B.W. (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **7**: d1356-68.
- [19] Ecsedi, P., Gogl, G., Nyitray, L. (2021) Studying the Structures of Relaxed and Fuzzy Interactions: The Diverse World of S100 Complexes. *Front Mol Biosci*, **8**: 749052.
- [20] Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., Geczy, C.L. (2013) Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*, **13**: (1) 24-57.
- [21] Zhou, Y., Zha, Y., Yang, Y., Ma, T., Li, H., Liang, J. (2023) S100 proteins in cardiovascular diseases. *Molecular medicine*, **29**: (1) 68.
- [22] Liang, X., Huang, X., Cai, Z., Deng, Y., Liu, D., Hu, J., Jin, Z., Zhou, X., Zhou, H., Wang, L. (2024) The S100 family is a prognostic biomarker and correlated with immune cell infiltration in pan-cancer. *Discover oncology*, **15**: (1) 137.
- [23] Austermann, J., Spiekermann, C., Roth, J. (2018) S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, **14**: (9) 528-541.
- [24] Goswami, D., Anuradha, U., Angati, A., Kumari, N., Singh, R.K. (2023) Pharmacological and Pathological Relevance of S100 Proteins in Neurological Disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, **22**: (10) 1403-1416.
- [25] Chen, H., Xu, C., Jin, Q., Liu, Z. (2014) S100 protein family in human cancer. *American journal of cancer research*, **4**: (2) 89-115.
- [26] Bresnick, A.R. (2018) S100 proteins as therapeutic targets. *Biophysical reviews*, **10**: (6) 1617-1629.
- [27] Salama, I., Malone, P.S., Mihaimed, F., Jones, J.L. (2008) A review of the S100 proteins in cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, **34**: (4) 357-64.
- [28] Cristovao, J.S., Gomes, C.M. (2019) S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, **13**: 463.
- [29] Wang, T., Liang, Y., Thakur, A., Zhang, S., Yang, T., Chen, T., Gao, L., Chen, M., Ren, H. (2016) Diagnostic significance of S100A2 and S100A6 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, **37**: (2) 2299-304.
- [30] Qi, Y., Zhao, T., Li, R., Han, M. (2022) Macrophage-Secreted S100A4 Supports Breast Cancer Metastasis by Remodeling the Extracellular Matrix in the Premetastatic Niche. *Biomed Res Int*, **2022**: 9895504.

- [31] Milani, M., Mammarella, E., Rossi, S., Miele, C., Lattante, S., Sabatelli, M., Cozzolino, M., D'Ambrosi, N., Apolloni, S. (2021) Targeting S100A4 with niclosamide attenuates inflammatory and profibrotic pathways in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*, **18**: (1) 132.
- [32] Senolt, L., Cerezo, L.A., Sumova, B., Pecha, O., Plestilova, L., Forejtova, S., Ruzickova, O., Husakova, M., Zavada, J., Pavelka, K., Vencovsky, J., Mann, H. (2015) High levels of metastasis-inducing S100A4 protein and treatment outcome in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, **20**: (1) 47-51.
- [33] Stewart, R.L., Carpenter, B.L., West, D.S., Knifley, T., Liu, L., Wang, C., Weiss, H.L., Gal, T.S., Durbin, E.B., Arnold, S.M., O'Connor, K.L., Chen, M. (2016) S100A4 drives non-small cell lung cancer invasion, associates with poor prognosis, and is effectively targeted by the FDA-approved anti-helminthic agent niclosamide. *Oncotarget*, **7**: (23) 34630-42.
- [34] Wang, T., Han, S., Du, G. (2021) S100A6 represses Calu-6 lung cancer cells growth via inhibiting cell proliferation, migration, invasion and enhancing apoptosis. *Cell Biochem Funct*, **39**: (6) 771-779.
- [35] He, X., Xu, X., Khan, A.Q., Ling, W. (2017) High Expression of S100A6 Predicts Unfavorable Prognosis of Lung Squamous Cell Cancer. *Med Sci Monit*, **23**: 5011-5017.
- [36] Dubois, J., Rueger, J., Haubold, B., Far, R.K., Sczakiel, G. (2021) Transcriptome analyses of urine RNA reveal tumor markers for human bladder cancer: validated amplicons for RT-qPCR-based detection. *Oncotarget*, **12**: (10) 1011-1023.
- [37] Kurpet, K., Chwatko, G. (2022) S100 Proteins as Novel Therapeutic Targets in Psoriasis and Other Autoimmune Diseases. *Molecules*, **27**: (19).
- [38] Gernert, M., Schmalzing, M., Tony, H.P., Strunz, P.P., Schwaneck, E.C., Frohlich, M. (2022) Calprotectin (S100A8/S100A9) detects inflammatory activity in rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy. *Arthritis Res Ther*, **24**: (1) 200.
- [39] Okada, K., Okabe, M., Kimura, Y., Itoh, H., Ikemoto, M. (2019) Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Lab Med*, **50**: (4) 370-380.
- [40] Singh, P., Ali, S.A. (2022) Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells*, **11**: (15).
- [41] Khorrami, S., Tavakoli, M., Safari, E. (2019) Clinical Value of Serum S100A8/A9 and CA15-3 in the Diagnosis of Breast Cancer. *Iran J Pathol*, **14**: (2) 104-112.
- [42] Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A.G., Dubuisson, A., Derosa, L., Almire, C., Henon, C., Kosmider, O., Droin, N., Rameau, P., Catelain, C., Alfaro, A., Dussiau, C., Friedrich, C., Sourdeau, E., Marin, N., Szwebel, T.A., Cantin, D., Mouthon, L., Borderie, D., Deloger, M., Bredel, D., Mouraud, S., Drubay, D., Andrieu, M., Lhonneur, A.S., Saada, V., Stoclin, A., Willekens, C., Pommeret, F., Griscelli, F., Ng, L.G., Zhang, Z., Bost, P., Amit, I., Barlesi, F., Marabelle, A., Pene, F., Gachot, B., Andre, F., Zitvogel, L., Ginhoux, F., Fontenay, M., Solary, E. (2020) Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*, **182**: (6) 1401-1418 e18.
- [43] Yanagi, H., Watanabe, T., Nishimura, T., Hayashi, T., Kono, S., Tsuchida, H., Hirata, M., Kijima, Y., Takao, S., Okada, S., Suzuki, M., Imaizumi, K., Kawada, K., Minami, H., Gotoh, N., Shimono, Y. (2020) Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. *Cancer Sci*, **111**: (12) 4359-4370.
- [44] Hou, Y.L., Zhang, J.H., Guo, J.B., Chen, H. (2021) Clinical significance of serum S100A10 in lung cancer. *J Int Med Res*, **49**: (10) 3000605211049653.
- [45] Hu, L., Kong, F., Pan, Y. (2019) Prognostic and clinicopathological significance of S100A14 expression in cancer patients: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, **98**: (28) e16356.
- [46] Tanaka, M., Ichikawa-Tomikawa, N., Shishito, N., Nishiura, K., Miura, T., Hozumi, A., Chiba, H., Yoshida, S., Ohtake, T., Sugino, T. (2015) Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion. *BMC Cancer*, **15**: 53.
- [47] Jones, C.M.C., Harmon, C., McCann, M., Gunyan, H., Bazarian, J.J. (2020) S100B outperforms clinical decision rules for the identification of intracranial injury on head CT scan after mild traumatic brain injury. *Brain Inj*, **34**: (3) 407-414.
- [48] Hsu, Y.L., Hung, J.Y., Liang, Y.Y., Lin, Y.S., Tsai, M.J., Chou, S.H., Lu, C.Y., Kuo, P.L. (2015) S100P interacts with integrin alpha7 and increases cancer cell migration and invasion in lung cancer. *Oncotarget*, **6**: (30) 29585-98.
- [49] Lin, M., Fang, Y., Li, Z., Li, Y., Feng, X., Zhan, Y., Xie, Y., Liu, Y., Liu, Z., Li, G., Shen, Z., Deng, H. (2021) S100P contributes to promoter demethylation and transcriptional activation of SLC2A5 to promote metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, **125**: (5) 734-747.
- [50] Wang, H., Hu, X., Yang, F., Xiao, H. (2021) miR-325-3p Promotes the Proliferation, Invasion, and EMT of Breast Cancer Cells by Directly Targeting S100A2. *Oncol Res*, **28**: (7) 731-744.

- [51] Han, F., Zhang, L., Liao, S., Zhang, Y., Qian, L., Hou, F., Gong, J., Lai, M., Zhang, H. (2022) The interaction between S100A2 and KPNA2 mediates NFYA nuclear import and is a novel therapeutic target for colorectal cancer metastasis. *Oncogene*, **41**: (5) 657-670.
- [52] Ganaie, A.A., Mansini, A.P., Hussain, T., Rao, A., Siddique, H.R., Shabaneh, A., Ferrari, M.G., Murugan, P., Klingelhofer, J., Wang, J., Ambartsumian, N., Warlick, C.A., Konety, B.R., Saleem, M. (2020) Anti-S100A4 Antibody Therapy Is Efficient in Treating Aggressive Prostate Cancer and Reversing Immunosuppression: Serum and Biopsy S100A4 as a Clinical Predictor. *Mol Cancer Ther*, **19**: (12) 2598-2611.
- [53] Feng, S., Zhou, Q., Yang, B., Li, Q., Liu, A., Zhao, Y., Qiu, C., Ge, J., Zhai, H. (2018) The effect of S100A6 on nuclear translocation of CacyBP/SIP in colon cancer cells. *PLoS One*, **13**: (3) e0192208.
- [54] Muoio, M.G., Talia, M., Lappano, R., Sims, A.H., Vella, V., Cirillo, F., Manzella, L., Giuliano, M., Maggiolini, M., Belfiore, A., De Francesco, E.M. (2021) Activation of the S100A7/RAGE Pathway by IGF-1 Contributes to Angiogenesis in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, **13**: (4).
- [55] Li, J., Shu, X., Xu, J., Su, S.M., Chan, U.I., Mo, L., Liu, J., Zhang, X., Adhav, R., Chen, Q., Wang, Y., An, T., Zhang, X., Lyu, X., Li, X., Lei, J.H., Miao, K., Sun, H., Xing, F., Zhang, A., Deng, C., Xu, X. (2022) S100A9-CXCL12 activation in BRCA1-mutant breast cancer promotes an immunosuppressive microenvironment associated with resistance to immunotherapy. *Nat Commun*, **13**: (1) 1481.
- [56] Fei, F., Liu, K., Li, C., Du, J., Wei, Z., Li, B., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, S. (2020) Molecular Mechanisms by Which S100A4 Regulates the Migration and Invasion of PGCCs With Their Daughter Cells in Human Colorectal Cancer. *Front Oncol*, **10**: 182.
- [57] Seguella, L., Rinaldi, F., Marianecchi, C., Capuano, R., Pesce, M., Annunziata, G., Casano, F., Bassotti, G., Sidoni, A., Milone, M., Aprea, G., de Palma, G.D., Carafa, M., Pesce, M., Esposito, G., Sarnelli, G. (2020) Pentamidine niosomes thwart S100B effects in human colon carcinoma biopsies favouring wtp53 rescue. *J Cell Mol Med*, **24**: (5) 3053-3063.
- [58] Boye, K., Maelandsmo, G.M. (2010) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology*, **176**: (2) 528-35.
- [59] Rudland, P.S., Platt-Higgins, A., Renshaw, C., West, C.R., Winstanley, J.H., Robertson, L., Barraclough, R. (2000) Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer research*, **60**: (6) 1595-603.
- [60] Taylor, S., Herrington, S., Prime, W., Rudland, P.S., Barraclough, R. (2002) S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer*, **86**: (3) 409-16.
- [61] Zakaria, R., Platt-Higgins, A., Rathi, N., Crooks, D., Brodbelt, A., Chavredakis, E., Lawson, D., Jenkinson, M.D., Rudland, P.S. (2016) Metastasis-inducing proteins are widely expressed in human brain metastases and associated with intracranial progression and radiation response. *Br J Cancer*, **114**: (10) 1101-8.
- [62] Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A.C., Shaw, G.S. (2006) Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *The Biochemical journal*, **396**: (2) 201-14.
- [63] Li, Z.H., Bresnick, A.R. (2006) The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer research*, **66**: (10) 5173-80.
- [64] Tarabykina, S., Griffiths, T.R., Tulchinsky, E., Mellon, J.K., Bronstein, I.B., Kriajevska, M. (2007) Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Current cancer drug targets*, **7**: (3) 217-28.
- [65] Semov, A., Moreno, M.J., Onichtchenko, A., Abulrob, A., Ball, M., Ekiel, I., Pietrzynski, G., Stanimirovic, D., Alakhov, V. (2005) Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem*, **280**: (21) 20833-41.
- [66] Orre, L.M., Panizza, E., Kaminsky, V.O., Vernet, E., Graslund, T., Zhivotovsky, B., Lehtio, J. (2013) S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene*, **32**: (49) 5531-40.
- [67] Katsuragawa, Y., Yanagisawa, M., Inoue, A., Masaki, T. (1989) Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Identification of a novel gene family of vertebrate non-sarcomeric myosin heavy chains. *European journal of biochemistry*, **184**: (3) 611-6.
- [68] Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R., Adelstein, R.S. (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*, **279**: (4) 2800-8.
- [69] Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E.V., Sellers, J.R. (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem*, **278**: (30) 27439-48.
- [70] Rosenfeld, S.S., Xing, J., Chen, L.Q., Sweeney, H.L. (2003) Myosin IIB is unconventionally conventional. *J Biol Chem*, **278**: (30) 27449-55.
- [71] Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., Sellers, J.R. (2003) Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem*, **278**: (40) 38132-40.

- [72] Saitoh, T., Takemura, S., Ueda, K., Hosoya, H., Nagayama, M., Haga, H., Kawabata, K., Yamagishi, A., Takahashi, M. (2001) Differential localization of non-muscle myosin II isoforms and phosphorylated regulatory light chains in human MRC-5 fibroblasts. *FEBS letters*, **509**: (3) 365-9.
- [73] Beach, J.R., Hussey, G.S., Miller, T.E., Chaudhury, A., Patel, P., Monslow, J., Zheng, Q., Keri, R.A., Reizes, O., Bresnick, A.R., Howe, P.H., Egelhoff, T.T. (2011) Myosin II isoform switching mediates invasiveness after TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: (44) 17991-6.
- [74] Beach, J.R., Shao, L., Remmert, K., Li, D., Betzig, E., Hammer, J.A., 3rd (2014) Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Current biology: CB*, **24**: (10) 1160-6.
- [75] Sandquist, J.C., Swenson, K.I., Demali, K.A., Burrridge, K., Means, A.R. (2006) Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem*, **281**: (47) 35873-83.
- [76] Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., Yamada, K.M. (2007) Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nature cell biology*, **9**: (3) 299-309.
- [77] Ma, X., Adelstein, R.S. (2014) The role of vertebrate nonmuscle Myosin II in development and human disease. *Bioarchitecture*, **4**: (3) 88-102.
- [78] Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A., Yazawa, M. (2005) Critical regions for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. *Biochemistry*, **44**: (1) 174-83.
- [79] Rosenberg, M.M., Ronen, D., Lahav, N., Nazirov, E., Ravid, S., Friedler, A. (2013) High resolution characterization of myosin IIC protein tailpiece and its effect on filament assembly. *J Biol Chem*, **288**: (14) 9779-9789.
- [80] Ford, H.L., Silver, D.L., Kachar, B., Sellers, J.R., Zain, S.B. (1997) Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry*, **36**: (51) 16321-7.
- [81] Li, Z.H., Spektor, A., Varlamova, O., Bresnick, A.R. (2003) Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*, **42**: (48) 14258-66.
- [82] Kiss, B., Kalmar, L., Nyitray, L., Pal, G. (2016) Structural determinants governing S100A4-induced isoform-selective disassembly of nonmuscle myosin II filaments. *FEBS J*, **283**: (11) 2164-80.
- [83] Beach, J.R., Hammer, J.A., 3rd (2015) Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems. *Experimental cell research*, **334**: (1) 2-9.
- [84] Gerke, V., Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiological reviews*, **82**: (2) 331-71.
- [85] Drust, D.S., Creutz, C.E. (1988) Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature*, **331**: (6151) 88-91.
- [86] Xu, X.H., Pan, W., Kang, L.H., Feng, H., Song, Y.Q. (2015) Association of annexin A2 with cancer development (Review). *Oncology reports*, **33**: (5) 2121-8.
- [87] Gerke, V., Weber, K. (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *The EMBO journal*, **3**: (1) 227-33.
- [88] Zalon, M.L. (1991) A second look at evaluation for adult learners. *The Pennsylvania nurse*, **46**: (6) 11-2.
- [89] Ayala-Sanmartin, J., Zibouche, M., Illien, F., Vincent, M., Gallay, J. (2008) Insight into the location and dynamics of the annexin A2 N-terminal domain during Ca(2+)-induced membrane bridging. *Biochimica et biophysica acta*, **1778**: (2) 472-82.
- [90] Drucker, P., Pejic, M., Galla, H.J., Gerke, V. (2013) Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *J Biol Chem*, **288**: (34) 24764-76.
- [91] Tereshko, V., Uysal, S., Koide, A., Margalef, K., Koide, S., Kossiakoff, A.A. (2008) Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **17**: (7) 1175-87.
- [92] Bornhorst, J.A., Falke, J.J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, **326**: 245-54.
- [93] Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E., LaBaer, J. (2002) Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: (5) 2654-9.
- [94] Smith, D.B. (2000) Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods in enzymology*, **326**: 254-70.
- [95] LaVallie, E.R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., McCoy, J.M. (2000) Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli. *Methods in enzymology*, **326**: 322-40.
- [96] Stevens, R.C. (2000) Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, **8**: (9) R177-85.
- [97] Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current opinion in biotechnology*, **10**: (5) 411-21.

- [98] Waugh, D.S. (2016) Crystal structures of MBP fusion proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **25**: (3) 559-71.
- [99] Jin, T., Chuenchor, W., Jiang, J., Cheng, J., Li, Y., Fang, K., Huang, M., Smith, P., Xiao, T.S. (2017) Design of an expression system to enhance MBP-mediated crystallization. *Sci Rep*, **7**: 40991.
- [100] Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., Kobilka, B.K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, **318**: (5854) 1266-73.
- [101] Kobilka, B. (2013) The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie*, **52**: (25) 6380-8.
- [102] Thorsen, T.S., Matt, R., Weis, W.I., Kobilka, B.K. (2014) Modified T4 Lysozyme Fusion Proteins Facilitate G Protein-Coupled Receptor Crystallization. *Structure*, **22**: (11) 1657-64.
- [103] Tamura, R., Oi, R., Akashi, S., Kaneko, M.K., Kato, Y., Nogi, T. (2019) Application of the NZ-1 Fab as a crystallization chaperone for PA tag-inserted target proteins. *Protein science: a publication of the Protein Society*, **28**: (4) 823-836.
- [104] Clifton, M.C., Dranow, D.M., Leed, A., Fulroth, B., Fairman, J.W., Abendroth, J., Atkins, K.A., Wallace, E., Fan, D., Xu, G., Ni, Z.J., Daniels, D., Van Drie, J., Wei, G., Burgin, A.B., Golub, T.R., Hubbard, B.K., Serrano-Wu, M.H. (2015) A Maltose-Binding Protein Fusion Construct Yields a Robust Crystallography Platform for MCL1. *PLoS One*, **10**: (4) e0125010.
- [105] Gogl, G., Biri-Kovacs, B., Poti, A.L., Vadaszi, H., Szeder, B., Bodor, A., Schlosser, G., Acs, A., Turiak, L., Buday, L., Alexa, A., Nyitray, L., Remenyi, A. (2018) Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *FEBS J*, **285**: (1) 46-71.
- [106] Cousido-Siah, A., Carneiro, L., Kostmann, C., Ecsedi, P., Nyitray, L., Trave, G., Gogl, G. (2022) A scalable strategy to solve structures of PDZ domains and their complexes. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, **78**: (Pt 4) 509-516.



Ecsédi Péter az ELTE Biokémiai Tanszékén dolgozik Kovács Mihály Motorenzimológiai Kutatócsoportjában. PhD tanulmányait is a tanszéken végezte az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában, ahol 2019-ben szerzett fokozatot Nyitray László témavezetésével. 2023-ban nyerte el az ELTE Ígéretes Kutatója díjat, majd 2024-ben az Ifjúsági Akadémiai Díjat. 2024 óta az elnyert PD OTKA (PD-146123) vezető kutatója és EKÖP ösztöndíjas (EKÖP-24-4-II-ELTE-92). Jelenleg a genomkarbantartás egyik fontos tagjának, az egyszálú DNS kötő (SSB) fehérjének folyadék-folyadék fázisszeparációs képességét, annak funkcióját és fontosságát kutatja.

Új, automatizált *in vitro* modellek terápiás szerek fejlesztésében: a „Szöveti modellek Laboratórium” bemutatása

Tárnoki-Zách Júlia^{1,2}, Bősze Szilvia^{3,4}, Czírók András^{1,2}

¹ELTE Fizikai Intézet, Biológiai Fizika Tanszék,

²BioPhys-Concepts Kft.,

³HUN-REN ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport,

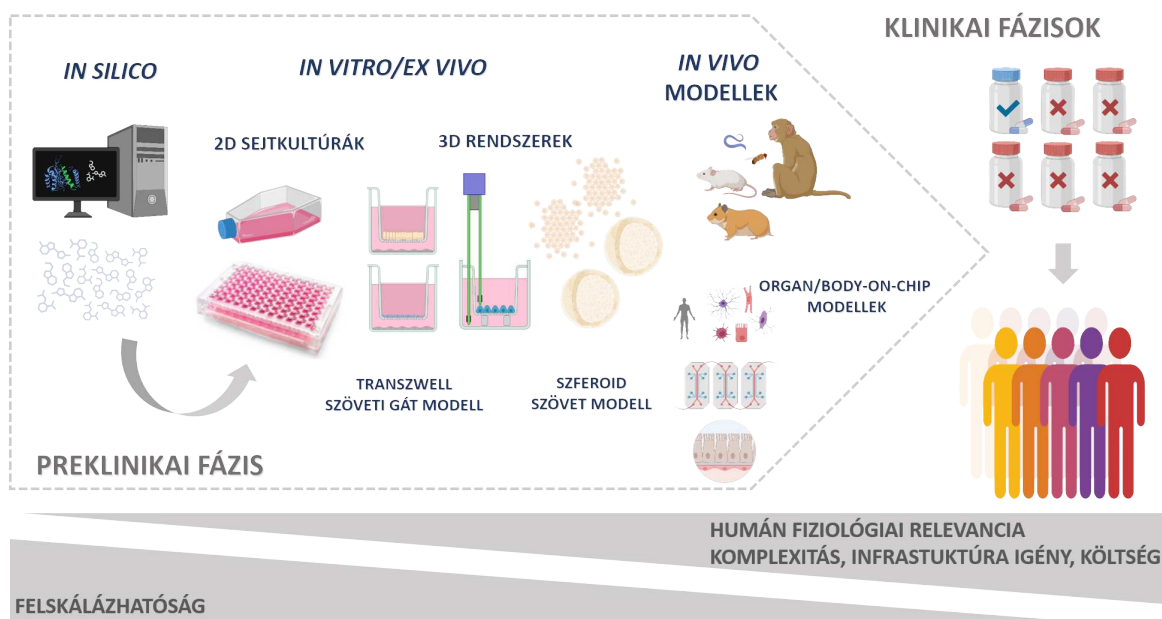
⁴Semmelweis Egyetem Genetika, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

julia.tarnoki-zach@ttk.elte.hu, biophys.concepts@gmail.com

szilvia.bosze@ttk.elte.hu, bosze.szilvia@semmelweis.hu, czirok.andras@ttk.elte.hu

Szövetmodellek jelentősége a preklinikai vizsgálatokban

A különböző onkológiai, fertőzőes, autoimmun megbetegedések elleni terápiás szerek (gyógyszerek, gyógyszerhordozók, képpalkotó eljárásokban alkalmazható vegyületek, stb.) fejlesztése az orvosbiológiai kutatások egyik legfontosabb és rendkívül időigényes területe.

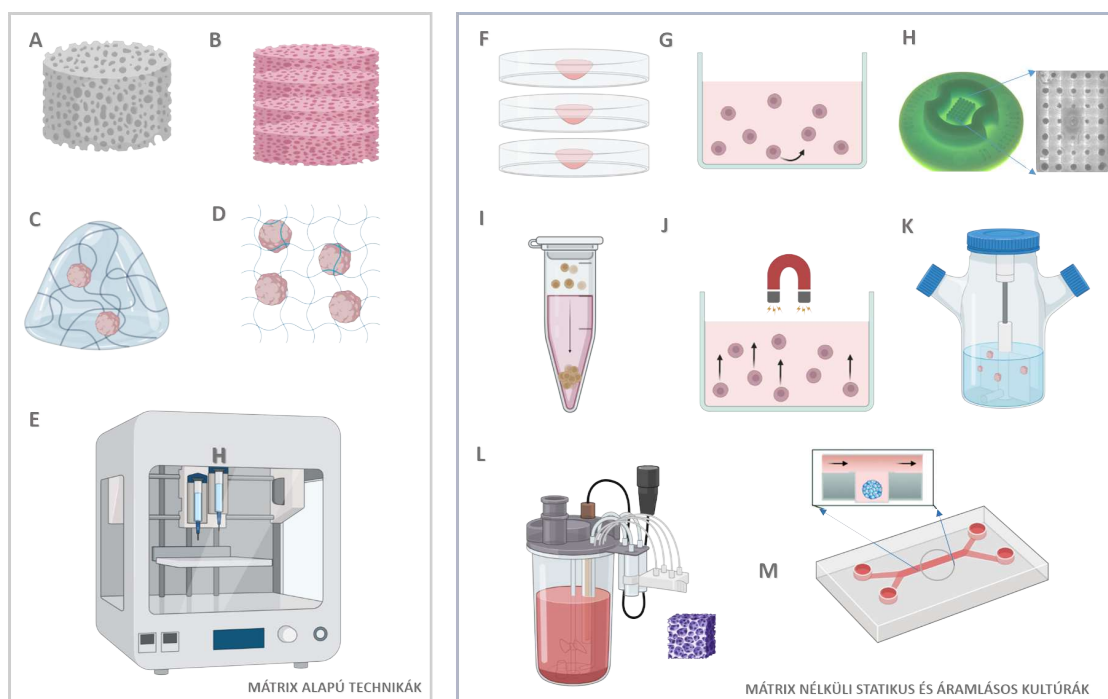


1. ábra. Preklinikai és klinikai vizsgálati fázisokban leggyakrabban szereplő *in silico*, *in vitro/ex vivo*, *in vivo* kísérleti platformok. A preklinikai vizsgálatok egy terápiás szer jelölt biztonságosságának és hatékonyságának *in silico* (számítógépes), *in vitro* (sejtalapú, mikrofiziológiai rendszerek, 3D transzwell, szferoid és organoid rendszerek), és állati modelleken történő tesztelését jelentik, amely tesztek a klinikai vizsgálati szakasza előtt történnek. A jelenlegi ajánlások szerint ezen vizsgálatok során nagy hangsúlyt kell fektessünk a mesterséges mikroszövet platformokra (transzwell rendszerek, szferoidok, organoidok, mikrofluidikai organ/body-on-a-chip rendszerek). Ezek a rendszerek egyszerűsített humán szövetspecifikus funkcionális és/vagy szöveti szerkezetet mimikáló környezetet biztosítanak, amely sajátosságok a 2D sejt kultúrákban nem modellezhetőek. A szferoid és organoid mesterséges mikroszövetek nagyobb mértékű skálázhatóságot tesznek lehetővé, mint az *in vivo* modellek. Az ábra a következő források alapján készült: [1, 11-13] (Biorender.com).

A terápiás szer jelöltek fejlesztésének kezdeti szakaszában kulcsfontosságúak a preklinikai vizsgálatok: *in silico* és *in vitro* elemzések, valamint állatkísérletek. Ezek a preklinikai elemzések a humán terápiás alkalmazás vizsgálata során rávilágíthatnak olyan lehetséges klinikai kockázatokra mint a toxicitás, vagy a nem megfelelő szelektivitás. A preklinikai fejlesztés

későbbi szakaszában farmakokinetikai, biodisztribúciós és biohasznosulási vizsgálatokat végeznek.

Sajnos számos esetben a preklinikai vizsgálatokon ígéretesnek bizonyult jelöltek nem váltják be a hozzájuk fűzött reményeket a fejlesztési folyamat későbbi, klinikai fázisaiban. Kiderült, hogy egyes állatmodellek preklinikai zsákutcát jelentenek. Emiatt, valamint állatvédelmi megfontolások miatt a preklinikai vizsgálati platformok fejlesztését mind az európai (European Medicines Agency – EMA), mind az amerikai (U.S. Food and Drug Administration – FDA) gyógyszerügyi hatóság sürgeti (<https://www.congress.gov/bill/117th-congress/senate-bill/5002>; [1]). Modernizációs céljaik között szerepel az állatkísérletek számának csökkentése és azok *in vitro* vagy *ex vivo* alternatíváinak kidolgozása (1. ábra). Az állatkísérletek helyettesítésének egy kézenfekvő módja a humán fiziológiát jobban modellező preklinikai platformok fejlesztése. Az új lehetőségek közül ígéretesek a humán sejteket alkalmazó három dimenziós (3D) szövettenyésztési technikák, amelyek megfelelő automatizálással felskálázhatóak: nagyszámú párhuzamos vizsgálatot tehetnek lehetővé.



2. ábra. Szferoidok előállítására alkalmazható módszerek. Mátrix alapú technikák: (A) decellularizált mátrix: ECM sejtek eltávolítását követően, (B) nanorészecske alapú mátrix rendszer, (C) hidrogél (alginát, agaróz, fibrin, hialuronsav, kollagén, zselatin, valamint szintetikus polipeptidek: polietilén-glikol, pluronic, akrilamid) mátrixok, (D) Fibrózus mátrix, (E) Különböző technológiákat használó (biotintasugaras, extrúziós, lézeres, sztereolitográf) bionyomtató. Mátrix-nélküli, statikus és áramlási aggregációs technikák: (F) függőcsepp (hanging drop) módszer, (G) alacsony sejtheadhéziós sajátosságú, vagy repellens ágenssel kezelt lemezek, (H) agar vagy agaróz öntött mikrolemezek (micromolding), (I) centrifugálás különböző tenyésztő csövekben, (J) aggregáció sebességét növelő mágneses, vagy akusztikus módszerek, (K) keveréses tenyészetek (spinner flask), (L) bioreaktorok, önmagukban és kombinálva mátrix alapú rendszerekkel, (M) mikrofluidika rendszerek. Az ábra a következő források alapján készült: [11, 12, 16-21] (Biorender.com).

Az itt röviden bemutatásra kerülő „Szöveti modellek Laboratórium” munkatársaiként előzetes eredményeinkre alapozva [2-10], a preklinikai vizsgálati rendszerekre vonatkozó legújabb ajánlásoknak megfelelően transwell- és szferoid alapú, automatizált kísérleti rendszereket fejlesztünk. Különböző humán szövetmodell környezetben további preklinikai vizsgálatokban alkalmazható gyógyszer- és gyógyszerhordozó jelölteket vizsgálunk.

Háromdimenziós *in vitro* kultúrák - szferoidok

A korai preklinikai vizsgálatok során első szűrőként nagyon gyakran alkalmaznak kétdimenziós (2D) sejtrétegeket, ún. monorétegeket. Egyszerűségükből következően könnyen párhuzamosítható, felskálázható kísérleteket tesznek lehetővé. Ugyanakkor hátrányuk, hogy a mechanikailag merev, nem folyadékáteresztő tenyésztőfelület (aljzat) jelentősen megváltoztatja többek között a sejt-aljzat és sejt-sejt adhézió, sejt-váz szerveződés, sejtosztódás, az apikális-bazális sejt-polaritás, valamint a transzcelluláris transzport mechanizmusait [14, 15]. A 2D rendszer megszorításai nem teszik lehetővé a terápiás szerek szöveten belüli terjedésének, térbeli eloszlásának, vagy szervezeten belüli útjának modellezését.

A legegyszerűbb térbeli szöveti szerveződést modellező kultúrák a szferoidok. Ezek normál, vagy tumoros eredetű sejtekből álló, a sejtek aggregációjával létrejövő klaszterek a szöveti szerveződés több aspektusát képesek modellezni. A sejtek térbeli rendeződése a heterogén sejt morfológiák, és metabolikus aktivitás megőrzését teszi lehetővé, a szöveti sejtekre jellemző sejt-váz, sejt-polaritás, valamint sejt-sejt adhéziós struktúrák kialakulása mellett.

A szferoidok előállítására számos módszert javasolnak (2. ábra). A mátrixban növesztett szferoidok előállítása során használt természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű hidrogélek a szövet extracelluláris mátrix (ECM) vázát modellezik, lehetővé téve a sejtek 3D növekedését egy térhálón belül. A sejtszuspenzió és a mátrix adagolását gyakran bionyomtatók végzik. Általában a kiindulási sejtszuspenzióból így kisebb, heterogén méreteloszlású „aggregátum klónok” alakulnak ki a térháló különböző pontjaiban.

A mátrix nélküli módszerek esetében a sejteket ECM fehérjék, vagy természetes eredetű és szintetikus polimerek hozzáadása nélkül „nem-adhezív” felületekre helyezik. A sejt-aljzat adhézió hiánya bizonyos sejt-típusok esetében elősegíti a sejtek egymáshoz való tapadását. A sejt-aljzat adhézió gátlását speciális bevonatokkal (pl. poly-HEMA, agaróz), függőcseppekben vagy kevert bioreaktorokban történő tenyésztéssel lehet elérni. Ezekben a rendszerekben a kezdő sejtszám alkalmas megválasztásával jól szabályozható a kialakuló aggregátumok mérete. A lassú sejtaggregáció felgyorsítható különböző centrifugális, mágneses, vagy akusztikus technikák alkalmazásával [11, 12, 16-21].

Szöveti határréteg – barrier - modellek

Ahhoz, hogy a terápiás szerek kifejthessék hatásukat, át kell jutniuk a szervezet különböző védő- (barrier) rétegein, például az erek belső falát borító endotél sejtrétegen, valamint a szerveket fedő epitéliumon. Ezekben a rétegekben a sejtek közötti paracelluláris utat a sejtek membránjában található szoros sejtkapcsolatok (tight junction) zárják le. A szoros sejtkapcsolatoknak többféle szerepe van. Egyrészt hozzájárulnak a sejtréteg mechanikai stabilitásához, másrészt a sejtmembránt is két részre, apikális és bazális félre osztják, megakadályozva a membránfehérjék szabad mozgását. Ez a sejt-polarizáció teszi lehetővé a bazális és apikális membránok eltérő biokémiai tulajdonságait, és így az irányított transzcelluláris anyagáramlást. A szoros sejtkapcsolatok diffúziós gátként is működnek, amely az epitélium típusától függően korlátozza a nagyobb vízdékony molekulák és ionok paracelluláris útját, ezzel elektromos szigetelő réteget is képezve [22].

A terápiás szerek szöveti koncentrációjának időbeli változását (kinetikáját) jelentős mértékben

befolyásolják a barrierrétegek molekulaszpecifikus transzport tulajdonságai. A gyógyszer-fejlesztés preklinikai szakaszában nemcsak a hatóanyag célszövetre gyakorolt hatásának vizsgálata szükséges, hanem olyan modellek kidolgozása és alkalmazása is, amelyek lehetővé teszik a hatóanyag célszövetet védő biológiai barrieren történő átjutásának tanulmányozását.

Az *in vitro* modellek megbízható, költséghatékony és felskálázható (high-throughput) megoldást kínálnak a lehetséges hatóanyagok szűrésére a fejlesztés korai szakaszában, csökkentve, és bizonyos esetekben helyettesítve a bonyolultabb és drágább állatkísérleteket [23-26]. Az *in vitro* barrier modellek egyik leggyakrabban alkalmazott típusa a transwell kamra. Ebben a kamrában egy folyadékáteresztő membránra epitél sejteket ültetnek, amelyek megfelelő érési folyamat után biológiai barrieret képeznek, így a transwell kamra belső apikális folyadékterét a külső bazolaterális folyadékterétől elkülönítik. A transwell tenyészetek fenntartásához és hatóanyagok teszteléséhez úgy kell lecserélni az apikális vagy bazális folyadékterben lévő tápfolyadékot, hogy a sejtréteg ne sérüljön. Ehhez a pipetták precíz pozícionálása szükséges, ami megnehezíti nagy számú párhuzamos tenyészet egyidejű fenntartását.

Az *in vitro* barrier modellek minőségét alapvetően az alkalmazott sejtréteg integritása határozza meg. Elengedhetetlen egy olyan kísérleti módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi ennek az időben változó tulajdonságnak a folyamatos nyomon követését. A transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése az ionáramlás vizsgálatával, a modellrendszer sérülése nélkül, nem invazív módon biztosít információt a barrier sejtréteg záródásáról. A TEER értékek nagysága és azok időbeli alakulása egyedileg jellemzi az egyes sejtvonalakat. Ezek az értékek tehát segítenek meghatározni, mikor éri el a barrier réteg a szükséges érettséget, és így mikor lehetséges a transzport kísérletek elvégzése [9, 27].

„Szöveti modellek Laboratórium” legújabb kutatási és fejlesztési irányjai

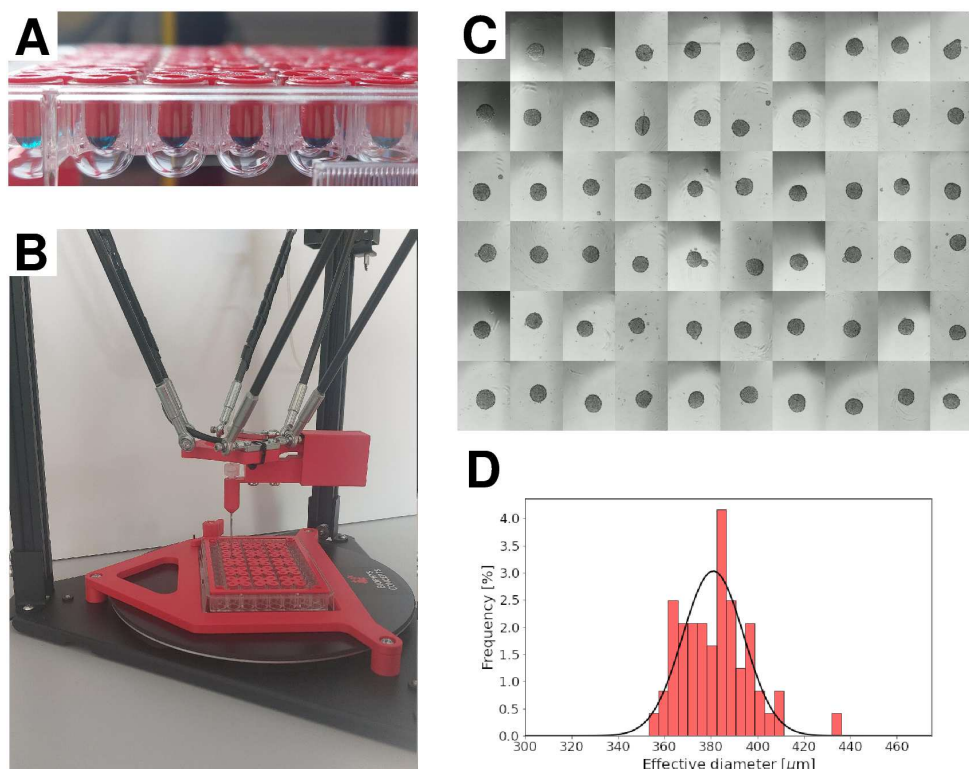
Automatizált *in vitro* módszerek

Biológiai kísérletek során gyakran szükséges folyadékminták, sejtszuspenziók, kísérleti reagensek és sejttenyészetek reprodukálható és gyors kezelése. Nagyszámú párhuzamos minta manuális létrehozása és jellemzése repetitív, monoton, hosszú idejű koncentrációt igénylő, megterhelő munka. Ennek a problémának a megoldására a kutatócsoportunk, részben a Biophys Concepts KFT keretei között, többféle folyadékkezelő és TEER mérő automatát fejlesztett ki.

Szferoid szöveti modellek

A BioPhys Concepts Kft. (biophys-concepts.com) által kifejlesztett SpheroMaker rendszer konfigurálásától függően 3D sejttenyészetek függőcseppekben történő létrehozására és fenntartására, valamint előre programozható steril laboratóriumi folyadékadagolásra alkalmas. A rendszer előre elkészített sejtszuspenzióból egy 96 kutas (96-well) sejttenyésztőlemez belső 60 pozíciójába helyezett cseppképző betétekbe adagol sejteket. Az aggregálódó sejtek - sejt-típustól függően - szferoidokat képeznek, melyek mérete jól kontrollálható a sejtszuspenzió gondos reszuszendálásának és az injektált térfogat precíz beállításának köszönhetően. A párhuzamos sejttenyészetek így közel azonos időpontban (15 percen belül) és pontosan meghatározott sejtsűrűséggel hozhatók létre. A rendszerrel lehetséges a hosszú idejű tenyésztés során a függő cseppkultúrát alkotó tápfolyadék részleges cseréje, valamint kísérleti hatóanyagok hozzáadása. A szferoidok kialakulása és fejlődése nyomon követhető a függőcseppekben egy kis fényerejű (4x) objektívvel felszerelt inverz mikroszkóp segítségével. A szferoidokat a függő cseppkultúrában történő növesztés befejezésekor a sejttenyésztő lemez U-

aljú kútjaiba juttatjuk a folyadékadagoló robot segítségével. Az így elkülönített szferoidok ezután további egyedi vizsgálatoknak és kezeléseknak vethetők alá (3. ábra).



3. ábra. Automatizált függőcsepp szferoid tenyésztő rendszer. (A) A függőcseppeket 96 kutas tenyésztőlemezbe helyezett cseppképző betétek tartják. (B) A sejtszuspenziót és a tenyésztőfolyadékot a SpheroMaker robot kezeli és osztja szét a tenyésztőlemez U aljú kútjaiban történt összegyűjtés után. (C) Függőcseppekben egy nap alatt létrejött HEK (humán embrionális vesesejt) szferoidok, a tenyésztőlemez U aljú kútjaiban történt összegyűjtés után. (D) A HEK szferoidok átmérőinek eloszlása, a mikroszkópos képekből meghatározva.

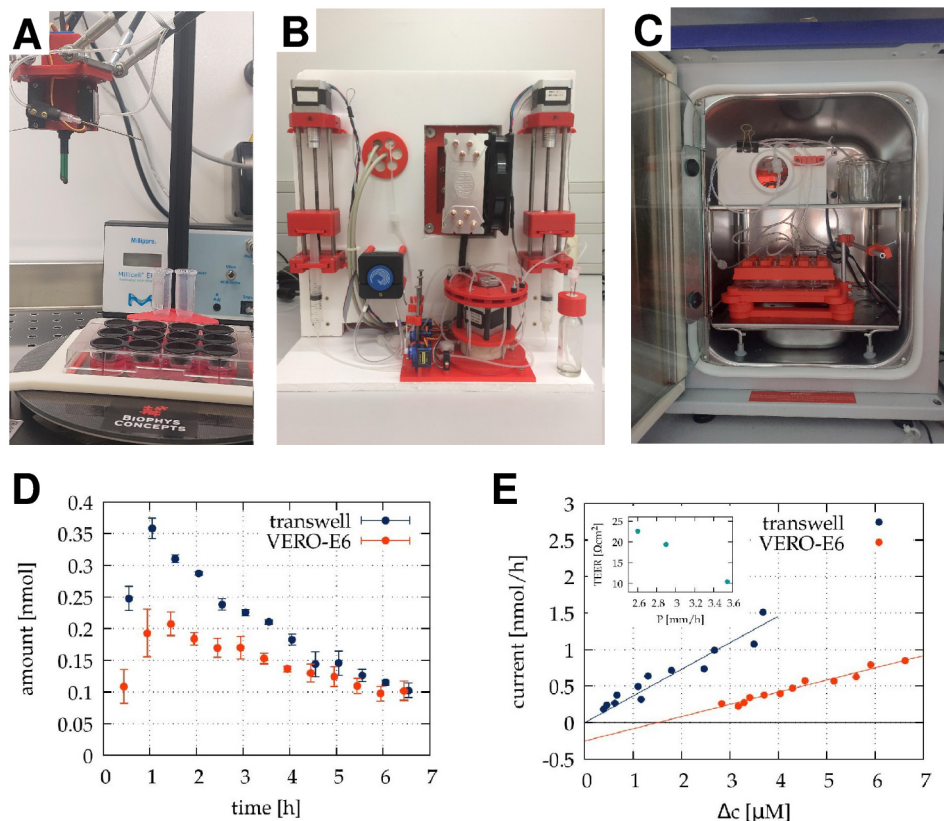
Eddigi vizsgálatainkban - a rendszer tesztelése során különböző sejtvonalakból (epidermoid karcinóma, vese karcinóma, mesothelioma, immortalizált neuroepitélium) alakítottunk ki szferoidokat, melyeket több napon át tartottunk függőcseppekben, szükség szerint részleges tápcserék automatizált elvégzésével. A szferoidok méreteloszlásának jellemzésére meghatároztuk az effektív átmérőjüket, azaz annak a körnek az átmérőjét, amelynek a területe ugyanakkora, mint a szferoid képének területe. A teszt kísérletek során 4000 sejtet adagoltunk az egyes cseppekbe. A kialakuló szferoidok átmérői meglehetősen stabilnak bizonyultak, sejtvonalra jellemzően: $399 \pm 14 \mu\text{m}$ (epidermoid karcinóma, 3 nap), $404 \pm 33 \mu\text{m}$ (vese karcinóma, 3 nap) illetve $536 \pm 33 \mu\text{m}$ (mesothelioma, 5 nap) effektív átmérőt mértünk, minden esetben 10% alatti szórással.

Transwell alapú barrier modellek

Laboratóriumunk kifejlesztett egy TEER méréseket és barrier tenyészetek folyadékcserejét automatikusan végrehajtó robotot, valamint egy transzport méréseket automatizáló mintaadagoló és -gyűjtő rendszer prototípust. A rendszer komponensei külön-külön programozhatóak.

Ezek az automata rendszerek 12 kutas (12 well) tenyésztőlemezekben elhelyezett transwell sejttenyészeteket kezelnek. A TEER értékét egy 4 pontos „chopstick” elektróda segítségével határozza meg. A tápcserék során az apikális illetve bazális táfogatokat két forgatható, adott

szögben beállítható injekciós tű éri el. Ezeket egy delta robot mozgatja és az adagoló tűk egy alkalmas, folyadékadagolást biztosító pumparendszerhez kapcsolódnak. Az így fenntartott és érési folyamatában nyomon követett barrier tenyészeteken automatizált transzport méréseket végzünk.



4. ábra. Automatizált szöveti barrier transzport mérő rendszer. (A) A szöveti barrier tenyészetek tápcseréit és érési folyamatának TEER mérésekkel történő nyomon követését végző robot. (B) A transzportmérés folyadékcseréit végző millifluidikai adagolóegység. (C) A barrier tenyészetek egy szövettenyésztő inkubátor belsejében egy rázógépen helyezkednek el. Az apikális és bazolaterális folyadéktérfogatok adagolását és cseréjét egy, a millifluidikai adagolóegységhez kapcsolódó szeleprendszer végzi. A folyadéktérfogatokat a tenyésztőlemez tetejébe épített, megfelelően pozícionált injekciós tűk érik el. (D) A dihidrobenzofurán típusú antimikrobiális vegyület transzport kinetikájának kísérleti meghatározása transwell rendszerben. Az apikális és bazolaterális folyadéktérter elválasztó sejtréteg barrier szerepe az átjutott maximális hatóanyag koncentráció készletelésében nyilvánul meg. (E) A mérési adatokból kiszámoltuk a barrier rétegekre jellemző koncentráció különbség -- fluxus összefüggést. Az ezekre illesztett egyenesek jellemzik a diffúzív áteresztőképességét illetve a sejtek hatóanyagot lebontó aktivitását.

A transzport mérések során a mintaadagoló és gyűjtő millifluidikai rendszer hatóanyagot adagol az apikális kompartmentbe, sorozatos mintavételt végez a bazolaterális kompartmentből. Az egyes transzport méréseket követően ismételt TEER mérésekkel számszerűsítjük a hatóanyagjelölt barrier rétegre kifejtett akut, vagy hosszú távú citoxikus hatását. A mintaadagoló és -gyűjtő rendszert az apoláris dihidrobenzofurán típusú antimikrobiális modellvegyület [28] segítségével teszteltük.

A transzportmérések során összegyűjtött mintákban a vegyület koncentrációját abszorpciós spektroszkópiával határoztuk meg. A VERO E6 barrier sejtrétegeken és a szérum fehérjékkel telített membránokon mért időfüggő koncentráció profilokat összehasonlítva, a sejtek barrier szerepére egyrészt a koncentrációprofil maximumának időbeli eltolódása, másrészt a transzport kinetika lassabb lecsengése utal (4 ábra). A kísérleti koncentrációprofilokra egy általunk kidolgozott elméleti modellszimuláció illeszthető. Az illesztett paraméterek alapján a

sejtrétegben egy nagyságrenddel kisebb a hatóanyag diffúziós állandója, mint a médiumban. A matematikai modell a hatóanyag sejtmembránra vonatkozó affinitására ($K \sim 700$), valamint a hatóanyag sejtréteg általi metabolizálásának mértékére (0.15 nM/h) is becslést ad. Az adatokból számolható a barrier rétegen áthaladó hatóanyag fluxusa a barrier két oldalán mérhető koncentrációkülönbség függvényében. A két mennyiség a szérumszinttel telített membrán esetén arányos egymással, míg a sejtek esetén az egyenes arányosságot korrigálni kell a sejtek által metabolizált anyagmennyiséggel, ami a negatív fluxushoz tartozó tengelymetszetet okozza. A barrier réteg esetén az illesztett egyenes kisebb meredeksége a sejtek diffúziós akadály szerepére utal [9].

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak Csiszér Miklós kollégájuknak (az ELTE Fizikai Intézet, Biológiai Fizika Tanszék és a BioPhys-Concepts Kft. munkatársának). Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) OTKA-ANN 132225, OTKA 142904, valamint az EFOP-1.8.0-VEKOP-17-2017-00001, az ELTE Innovációs Hivatal (EKA), az ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1157-8/2019-DT; Emberi Erőforrások Minisztériuma), az ELTE Tematikus Kiválósági Program (2018-1.2.1-NKP-2018-00005 HunProtEx, Innovációs és Technológiai Minisztérium), a VEKOP-2.3.3-15-2017-00020 (Széchenyi Program) támogatta.

Irodalomjegyzék

- [1] Zushin, P.H., Mukherjee, S., Wu, J.C. (2023) FDA Modernization Act 2.0: transitioning beyond animal models with human cells, organoids, and AI/ML-based approaches. *J Clin Invest*, **133**: (21).
- [2] Baranyai, Z., Biri-Kovács, B., Krátký, M., Szeder, B., Debreczeni, M.L., Budai, J., Kovács, B., Horváth, L., Pári, E., Németh, Z., Cervenak, L., Zsila, F., Méhes, E., Kiss, É., Vinšová, J., Bősze, S. (2021) Cellular Internalization and Inhibition Capacity of New Anti-Glioma Peptide Conjugates: Physicochemical Characterization and Evaluation on Various Monolayer- and 3D-Spheroid-Based in Vitro Platforms. *J Med Chem*, **64**: (6) 2982-3005.
- [3] Berta, J., Török, S., Tárnoki-Zách, J., Drozdovszky, O., Tóvári, J., Paku, S., Kovács, I., Cziráok, A., Masri, B., Megyesfalvi, Z., Oskolás, H., Malm, J., Ingvar, C., Markó-Varga, G., Döme, B., László, V. (2021) Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis. *Sci Rep*, **11**: (1) 5798.
- [4] Borbála Horváth, L., Krátký, M., Pflégr, V., Méhes, E., Gyulai, G., Kohut, G., Babiczky, Á., Biri-Kovács, B., Baranyai, Z., Vinšová, J., Bősze, S. (2022) Host cell targeting of novel antimycobacterial 4-aminosalicylic acid derivatives with tuftsin carrier peptides. *Eur J Pharm Biopharm*, **174**: 111-130.
- [5] Horváth, L., Biri-Kovács, B., Baranyai, Z., Stipsicz, B., Méhes, E., Jezsó, B., Krátký, M., Vinšová, J., Bősze, S. (2024) New Salicylanilide Derivatives and Their Peptide Conjugates as Anticancer Compounds: Synthesis, Characterization, and In Vitro Effect on Glioblastoma. *ACS Omega*, **9**: (15) 16927-16948.
- [6] Horváti, K., Fodor, K., Pályi, B., Henczkó, J., Balka, G., Gyulai, G., Kiss, É., Biri-Kovács, B., Senoner, Z., Bősze, S. (2021) Novel Assay Platform to Evaluate Intracellular Killing of Mycobacterium tuberculosis: In Vitro and In Vivo Validation. *Front Immunol*, **12**: 750496.
- [7] Kovacs, I., Bugyik, E., Dezso, K., Tarnoki-Zach, J., Mehes, E., Gulyas, M., Czirok, A., Lang, E., Grusch, M., Schelch, K., Hegedus, B., Horvath, I., Barany, N., Megyesfalvi, Z., Tisza, A., Lohinai, Z., Hoda, M.A., Hoetzenecker, K., Pezzella, F., Paku, S., Laszlo, V., Dome, B. (2022) Malignant pleural mesothelioma nodules remodel their surroundings to vascularize and grow. *Transl Lung Cancer Res*, **11**: (6) 991-1008.
- [8] Szeder, B., Tárnoki-Zách, J., Lakatos, D., Vas, V., Kudlik, G., Merő, B., Koprivanacz, K., Bányai, L., Hámori, L., Róna, G., Cziráok, A., Füredi, A., Buday, A.L. (2019) Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells. *Cells*, **8**: (11).
- [9] Tárnoki-Zách, J., Bősze, S., Cziráok, A. (2023) Quantitative Analysis of a Pilot Transwell Barrier Model with Automated Sampling and Mathematical Modeling. *Pharmaceutics*, **15**: (11).
- [10] Tarnoki-Zach, J., Stockhammer, P., Isai, D.G., Mehes, E., Szeder, B., Kovacs, I., Bugyik, E., Paku, S., Berger, W., Thomas, S.M., Neufeld, Z., Dome, B., Hegedus, B., Czirok, A. (2020) Multicellular contractility contributes to the emergence of mesothelioma nodules. *Sci Rep*, **10**: (1) 20114.
- [11] Kabay, G., Manz, A., Dincer, C. (2022) Microfluidic Roadmap for Translational Nanotheranostics. *Small Methods*, **6**: (2) e2101217.

- [12] Mysior, M.M., Simpson, J.C. (2021) Cell3: a new vision for study of the endomembrane system in mammalian cells. *Biosci Rep*, **41**: (12).
- [13] Sánchez de la Nava, A.M., Gómez-Cid, L., Ríos-Muñoz, G.R., Fernández-Santos, M.E., Fernández, A.I., Arenal, Á., Sanz-Ruiz, R., Grigorian-Shamagian, L., Atienza, F., Fernández-Avilés, F. (2022) Cardiovascular Diseases in the Digital Health Era: A Translational Approach from the Lab to the Clinic. *BioTech (Basel)*, **11**: (3).
- [14] Duval, K., Grover, H., Han, L.H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., Chen, Z. (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, **32**: (4) 266-277.
- [15] Pedersen, J.A., Swartz, M.A. (2005) Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng*, **33**: (11) 1469-90.
- [16] Abuwatfa, W.H., Pitt, W.G., Hussein, G.A. (2024) Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *J Biomed Sci*, **31**: (1) 7.
- [17] Benien, P., Swami, A. (2014) 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncol*, **10**: (7) 1311-27.
- [18] Khawar, I.A., Ghosh, T., Park, J.K., Kuh, H.-J. (2021) Tumor spheroid-based microtumor models for preclinical evaluation of anticancer nanomedicines. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **51**: (5) 541-553.
- [19] Kronemberger, G.S., Matsui, R.A.M., Miranda, G., Granjeiro, J.M., Baptista, L.S. (2020) Cartilage and bone tissue engineering using adipose stromal/stem cells spheroids as building blocks. *World J Stem Cells*, **12**: (2) 110-122.
- [20] Ro, J., Kim, J., Cho, Y.-K. (2022) Recent advances in spheroid-based microfluidic models to mimic the tumour microenvironment. *Analyst*, **147**: (10) 2023-2034.
- [21] Ryu, N.E., Lee, S.H., Park, H. (2019) Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, **8**: (12).
- [22] Deli, M.A. (2009) Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta*, **1788**: (4) 892-910.
- [23] Huh, D., Kim, H.J., Fraser, J.P., Shea, D.E., Khan, M., Bahinski, A., Hamilton, G.A., Ingber, D.E. (2013) Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc*, **8**: (11) 2135-57.
- [24] Tárnoki-Zách, J., Mehes, E., Varga-Medveczky, Z., Isai, D.G., Barany, N., Bugyik, E., Revesz, Z., Paku, S., Erdo, F., Czirok, A. (2021) Development and Evaluation of a Human Skin Equivalent in a Semiautomatic Microfluidic Diffusion Chamber. *Pharmaceutics*, **13**: (6).
- [25] Varga-Medveczky, Z., Kocsis, D., Naszlady, M.B., Fónagy, K., Erdő, F. (2021) Skin-on-a-Chip Technology for Testing Transdermal Drug Delivery-Starting Points and Recent Developments. *Pharmaceutics*, **13**: (11).
- [26] Walter, F.R., Valkai, S., Kincses, A., Petneházi, A., Czeller, T., Veszelka, S., Ormos, P., Deli, M.A., Dér, A. (2016) A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sensors and Actuators B-chemical*, **222**: 1209-1219.
- [27] Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J. (2015) TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, **20**: (2) 107-26.
- [28] Kósa, N., Zolcsák, Á., Voszka, I., Csík, G., Horváti, K., Horváth, L., Bősze, S., Herenyi, L. (2021) Comparison of the Efficacy of Two Novel Antitubercular Agents in Free and Liposome-Encapsulated Formulations. *Int J Mol Sci*, **22**: (5).



Tárnoki-Zách Júlia, Az ELTE Fizikai Intézet munkatársa, valamint a Biophys Concepts Kft társalapítója és ügyvezetője. Tárnoki-Zách Júlia tanulmányait az Eötvös Loránd Tudományegyetemen végezte, ahol 2003-ban szerzett fizikus diplomát, majd orvosi sejtbiológia szakosító oklevelet szerzett a Leuveni Katolikus Egyetemen (UCL) 2005-ben. 2002-ben a Koppenhágai Egyetemen (KU) Erasmus ösztöndíjjal tanult, majd a Kansasi Orvosi Egyetemen (KUMC) szakmai gyakorlaton vett részt. A 2003-as Országos Tudományos Diákköri Konferencián második helyezést ért el. 2013-tól az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén dolgozik. 2021-2022-ben részt vett a Nemzeti Népegészségügyi Központ EFOP-1.8.0-VEKOP-17-2017-00001 E3 munkacsoportjának munkájában. Jelenleg sejttechnológia automatizálását célzó kutatásokban dolgozik.



Bősze Szilvia, HUN-REN-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Magyar Kutatási Hálózat, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Genetika, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, SE GSI. E3 munkacsoport vezető Nemzeti Népegészségügyi Központ, EFOP-1.8.0-VEKOP-17-2017-00001 pályázat, (2021-2022). Antibakteriális, antivirális, antitumor hatású vegyületek és peptid alapú diagnosztikai reagensek fejlesztésével foglalkozik. Munkája része a hatóanyagjelöltek szelektivitásának és biohasznosíthatóságának növelésére, hatóanyag-peptid konjugátumok, nanopartikulumok fejlesztése és azok funkcionális jellemzése *in vitro* és *in vivo* állat modelleken. Részt vesz analitikai módszerek és *in vitro* háromdimenziós szöveti modellek kidolgozásában és jellemzésében.



Czirok András, Az ELTE Fizikai Intézet munkatársa, valamint a Biophys Concepts Kft társalapítója és ügyvezetője. Az Eötvös Loránd Tudományegyetemen 1996-ban szerzett fizikus diplomát, majd 2000-ben PhD fokozatot. 2014 óta egyetemi docens az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Fizika tanszékén. 2014 és 2024 között részállású associate professor a University of Kansas Medical Center Anatómia és Sejtbiológia tanszékén. Kutatómunkájának fókuszában a szövetalkotás biofizikai és szövetmechanikai vonatkozásai vannak, különös tekintettel a sejtkontrakció, sejtmozgás és a sejt közötti állomány kölcsönhatásaira. Szövettenyészeteket automatizált mikroszkópiával, kvantitatív képanalízissel, mechanikai és elektromos mérésekkel vizsgálta, matematikai modelleket alkotott. Jelenleg sejttechnológia automatizálását célzó kutatásokban dolgozik.

Biológiai mechanizmusok mélyreható elemzése az újgenerációs interaktomika használatával

Zámbó Boglárka, Gógl Gergő

Département de Biologie Structurale Intégrative,
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC),
INSERM U1258/CNRS UMR 7104/Université de Strasbourg,
Illkirch, France

Összefoglaló

Az interaktomika célja a sejtek szövevényes kölcsönhatási hálójának feltárása, hogy ezáltal fényt deríthessünk alapvető biológiai mechanizmusokra. A hagyományos interaktomikai módszerek azonban csak kvalitatív betekintést nyújtanak a sejt hálózatokba, mivel nem képesek meghatározni a modellezéshez szükséges biofizikai paramétereket. Az újgenerációs interaktomika ma már példátlan pontossággal képes meghatározni ezeket a paramétereket, és segítségükkel feltárhatóak a komplex biológiai folyamatok kritikus komponensei. Jelen munkában bemutatjuk a klasszikus módszerek korlátait és összehasonlítjuk az elmúlt években megjelent innovatív technikákat, melyek a korábbi kihívásokat hivatottak leküzdeni. Részletezzük továbbá legújabb, nagy áteresztőképességű biofizikai módszereinket, amelyek mind az úgynevezett *holdup* technikán alapulnak, és amelyek lehetővé teszik a biofizikai paraméterek kvantitatív térképezését akár a teljes proteomon. Példákkal illusztrálva megmutatjuk, hogyan használhatóak ezek a technikák különféle kulcsfontosságú biológiai kérdések megválaszolására, mint a biológiai hálózatok architektúrájának feltárása és a betegségekhez köthető hálózati elemek azonosítása. Ugy véljük, hogy ezek az új eszközök hamarosan lehetővé fogják tenni a biológiai rendszerek pontos modellezését, mélyebb betekintést engedve sejt mechanizmusokba.

Kulcsszavak: interaktomika, hálózatok, kvantitatív, affinitás, betegség, holdup

Molecular insight into biological mechanisms with new-generation interactomics

Interactomics aims to decipher our cells' intricate web of interactions to shed light on fundamental biological mechanisms. However, traditional interactomics approaches provide mainly qualitative snapshots of cellular functions failing to precisely capture the biophysical parameters needed for accurate interaction network modeling. New-generation interactomics can now determine these parameters with unprecedented accuracy and can uncover critical factors in complex biological processes. In this work, we explore the limitations of classical methods and compare new strategies that have emerged in the past years to overcome these challenges. We present our recent high-throughput biophysical interactomics methods, based on the so-called *holdup* technique, which enable the comprehensive determination of quantitative parameters across the proteome. Through examples, we show how these techniques can answer key biological questions, such as decoding the fundamental architecture of biological networks and identifying key components linked to disease. We believe that these revolutionary tools will soon allow the precise modeling of biological systems, providing deep insights into cellular mechanisms.

Key words: interactomics, networks, quantitative, affinities, disease, holdup

Bevezetés

A sejtjeinkben zajló folyamatokat a jelenlévő molekulák nem-kovalens, átmeneti kölcsönhatásai irányítják. Ahhoz, hogy megértsük hogyan működik egy sejt, minél pontosabb képet kell kapnunk ezen molekulák kölcsönhatási hálózatáról. A molekulák kölcsönhatásait nagyskálán vizsgáló tudományterület az interaktomika. Noha a klasszikus interaktomika már több tízezer interakció jelenlétét sikeresen feltárta, véleményünk szerint nem alkalmas nagyfelbontású és reprodukálható adatot szolgáltatni sejtjeink működésének megbízható modellezéséhez.

Összehasonlítva a jelenlegi klasszikus interaktomikai adatbázisokat, azokban mindössze 25% átfedést találunk a már leírt interakciók között [1]. Ebben az összefoglaló cikkben részletezzük, hogy mik az okai ennek a különbségnek, és bemutatjuk, hogy az újgenerációs interaktomikai technikák, mint például az általunk fejlesztett különféle ún. *holdup* alapú módszerek hogyan képesek megoldást nyújtani a klasszikus interaktomika problémáira, és hogy milyen új dimenziókat nyithatnak ezek a kutatók számára a jövőben.

Az interaktomika módszertára hosszú évtizedekig viszonylag változatlan maradt és a klasszikus interaktomika lényegében két fő módszer típusra épült. Az első valóban interaktomikai módszerek a kettős-hibrid típusú rendszerek voltak, mint például az élesztő kettős-hibrid, ahol a megfelelő címkével ellátott interakciós partnereket ugyanabban a sejtben fejezzük ki és az interakció létrejötte egy riporter gén expressziójához vezet [2]. A módszer adaptálható nagyméretű kombinatorikus könyvtárakra is, lehetővé téve az interakciók feltérképezését akár a teljes fehérjekészleten (ún. proteom-szintű vizsgálatok) [3]. A másik fő módszer típus az úgynevezett *pull-down*, avagy lehúzásos kísérletek [4]. A *pull-down* kísérletek lényege, hogy egy csali molekulát specifikusan kihorgonyozunk egy szilárd hordozóra, ami általában egy valamilyen módon funkcionizált agaróz gyanta, majd mosási lépéseket követően a csalival együtt feldúsult fehérjéket, azaz a prédákat, azonosítjuk. A módszer legklasszikusabb képviselője az immunoprecipitáció, amely során egy antitesttel funkcionizált gyantát használunk, hogy a sejt-kivonatból az antitest által felismert fehérje kölcsönható partnereit azonosítsuk. Mivel minden egyes csali esetén külön antitestre lenne szükség az immunoprecipitáció kivitelezéséhez, ez a módszer alkalmatlan proteom-szintű interaktomikai munkákhoz. Ezt a korlátot kiküszöbölve fejlesztették ki az tömegspektrometria-kapcsolt affinitás tisztítást (affinity purification, coupled to mass spectrometry, AP-MS), ahol a csalifehérjéket egy adott címkével ellátva fejeznek ki a sejtben és a prédákat tömegspektrometria segítségével azonosítják, lehetővé téve a nagyskálás interaktomikai kísérletek elvégzését [5,6].

1. táblázat

| <i>Kísérlet</i> | <i>Mit mér?</i> | <i>Főbb limitáció</i> |
|---------------------------|--|---|
| kettős-hibrid | Fehérje párok közti intrinzik kölcsönhatást | A fehérjék koncentrációja és a kölcsönhatások detekciós határa ismeretlen |
| pull-down | Csali fehérjén keresztül kikötődő fehérjék mennyiségét | A mosási lépések nagymértékben befolyásolják a komplexek mennyiségét |
| ko-frakcionálás | Együtt szeparálható fehérjekomplexeket azonosít | Számos tranziens komplex a ko-frakcionálás során disszociál |
| proximitás jelölés | Csali környezetében előforduló fehérjéket azonosítja | Sok fehérjét partnerként azonosít, akik csak hasonlóan lokalizálódnak |
| fág-bemutató | Csalihoz kötődő peptid ligandumokat azonosítja | Tisztított csali fehérje szükséges a méréshez |
| holdup | Csali interakcióinak intrinzik affinitását | Tisztított csali fehérje szükséges a méréshez |

Mindkét módszer ugyanolyan típusú eredményre vezet, egy listát kapunk azokról a fehérjékről, akik „kötnek” egy bizonyos másik fehérjéhez, illetve jó esetben egy listát azokról a fehérjékről is, akik „nem kötnek”, egy bizonyos detekciós küszöbérték mellett. De mit is jelent az, hogy

„köt” vagy „nem köt”? Noha a két módszer esetén ugyanazt a kifejezést alkalmazzuk az észlelt interakciókra (A köti B-t, vagy A nem köti B-t), a két fő interaktomikai módszertípus természetükben eltérő eredményeket szolgáltat [7] (1-es táblázat). Egyrészt, míg a kettős-hibrid típusú kísérletek csupán a direkt interakciókat mutatják ki, addig a *pull-down* típusú kísérletekkel olyan indirekt kölcsönhatások is detektálhatóak, amik egy harmadik félen keresztül tudnak létrejönni. Másrészt, a két módszer az interakciók más tulajdonságait méri. A makromolekulák interakciói döntően reverzibilisek, gyenge kötési állandókkal és gyors kötési kinetikával rendelkeznek. Ennek következményeképpen a legtöbb sejtes interakció nem sztöchiometrikus, hanem a tömeghatás törvénye határozza meg a létrejövő komplexek koncentrációját, ami a partnerek koncentrációjától is függ. A kettős-hibrid módszerek esetén a partnerek koncentrációja nagyjából állandó értéken van tartva, és a riporter gén expresszió attól függ, hogy ebben a koncentráció tartományban létre tud-e jönni komplexképződés. Ezáltal, ezek a típusú kísérletek leginkább az interakciók *intrinzik* tulajdonságait vizsgálják. Ilyen *intrinzik*, a molekulák természetéből fakadó tulajdonság például az affinitásuk egymással szemben. Ezzel szemben a *pull-down* kísérletek a komplexek mennyiségét próbálják meghatározni, ami egy *extrinzik*, azaz az *intrinzik* tulajdonságok által befolyásolt, de időben, térben és más külső paraméterek mellett változó tulajdonság. Éppen ebből a sajátságából is fakadóan a tömegspektrometria-kapcsolt affinitás tisztítás módszere kevésbé reprodukálható, nagyban függ az adott sejtkivonat tulajdonságaitól, valamint a mosási lépések intenzitásától. Sajnos, általában egyik módszer esetén sincs információnk a detekciós küszöbértékről, mely fölött az adott interakciót létezőnek tekintjük (legyen akár szó affinitás küszöbértékről vagy a komplex koncentrációjának küszöbértékéről), és mivel mindkét módszer viszonylag kvalitatívnak számít, nem képesek pontos képet adni ezekről a különféle interaktomikai tulajdonságokról.

Újgenerációs interaktomikai módszerek

Az elmúlt évtizedekben számos új interaktomikai módszer látott napvilágot, melyek igyekeztek orvosolni a klasszikus interaktomika fentebbi hiányosságait. Ezek közül négy olyan módszert emelünk ki, amelyeket a leginkább izgalmasnak tartunk, és amelyek használata egyre szélesebb körben terjed el a területen.

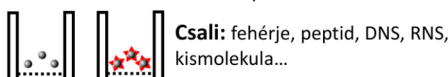
A ko-frakcionálási kísérletek során a sejtkivonatot egy elválasztástechnikai eljárással frakcionáljuk, mint például ioncserével vagy gélfiltrálással, majd a különféle frakciókat tömegspektrometria segítségével azonosítjuk [8]. A módszer elve, hogy az adott komplex komponensei együtt szeparálódnak arányosan a komplexek (*extrinzik*) koncentrációival. Például A és B molekula több csúcsban jelenhet meg egy gélfiltráció során, ahol az összes komplex csúcsban mind az A és B molekula is jelen van, ezáltal a fehérjék elúciós profiljai korrelálnak. A módszer fő előnye, hogy egyetlen mérésorozat képes a teljes interaktomról egy globális képet adni, a fő hátránya pedig, hogy a fehérjék elúciós profiljából nem triviális az egyes direkt, vagy akár indirekt interakciók azonosítása, illetve, hogy számos ismert komplex nem marad stabil a frakcionálás körülményei között.

A *pull-down*-alapú módszerek egyik nagy hátránya, hogy soklépcsős mosási lépések szükségesek ahhoz, hogy a háttér proteomból kiemelkedjenek a tényleges partnerek. A fehérje-fehérje interakciók gyors kötési kinetikája miatt viszont ugyanezek a mosási lépések drasztikusan csökkentik a kikötődött fehérjék mennyiségét, mivel a partnerek folyamatosan disszociálnak. Ezt a kritikus problémát küszöbölik ki a proximitás jelölési módszerek (angolul Proximity Labeling

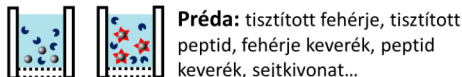
Assays), mint a BioID vagy az APEX [9]. Ezeknél a módszereknél a csalifehérjét egy olyan enzimmel címkézzük fel, ami a sejteken belül képes a közvetlen környezetében található további fehérjéket kovalensen megjelölni egy specifikus funkciós csoporttal. Ez a funkciós csoport rendszerint a biotin, vagy más olyan molekula, amit lehetséges kvantitatívan szeparálni a sejtkivonatokból a lassú disszociációs rátájának és erős affinitásának köszönhetően. A módszer fő hátránya, hogy a legtöbb azonosított partner nem direktén köt, csupán a csali fehérje környezetében volt található. Továbbá, mivel a jelölési reakció hosszú időn keresztül zajlik, a kapott szignál az idő során felgyülemelő molekulák mennyiségével arányos, ezért a proximitás jelöléssel kapott interakciók kvantitatív értelmezése nehézkes.

A holdup módszer alapjai

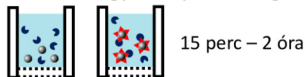
1. Gyanta telítése a csalival: $\sim 10 \mu\text{M}$



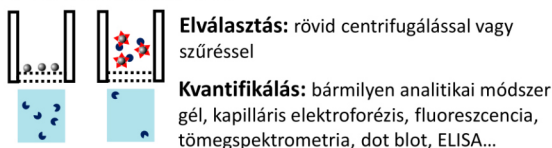
2. Prédát tartalmazó oldat hozzáadása:



3. Inkubálás az egyensúly eléréséig:



4. Elválasztás és kvantifikálás:



5. Affinitás kalkuláció

$$BI = 1 - \frac{C_{csali}}{C_{csali} + BI} \quad K_d = \frac{C_{csali} - C_{csali} * BI}{BI}$$

1. ábra. A holdup módszer alapjai. A holdup egy összehasonlító kromatográfiás retenció eljárás, mely a vizsgált reakciópartnerek teljes és nem kötött koncentrációját méri egyensúlyi állapotban, melynek aránya egyensúlyi disszociációs állandóvá konvertálható. A módszer alkalmazása során valamilyen szilárd gyantát kontroll és csalimolekulákkal telítünk, melyek lehetnek fehérjék, DNS, RNS, vagy akár kismolekula. Ezután ezt a gyantát összekeverjük egy préda fehérjét tartalmazó oldattal (fragmentomikai holdup esetén ez tisztított fehérje, míg natív holdup esetén ez sejtkivonat), majd inkubáljuk az egyensúly beálltáig. Ezután gyorsan szeparáljuk a szilárd és folyadék fázist, és valamilyen analitikai módszer segítségével számszerűsítjük a folyadék fázisban maradt potenciális préda fehérjéket. A kontroll és csali-szaturált gyantával kapott értékek összehasonlításával megkapjuk a kötött frakció értékeit (binding intensity, BI), melyeket az egyensúlyi kötési egyenlettel kötési állandókká (K_d) alakíthatunk.

Konzervatív becslések szerint a fehérje-fehérje interakciók közel 80%-a motívumokon keresztül történik. Motívumoknak nevezzük azokat a rövid fehérje fragmenseket, amik rendezetlen régiókban fordulnak elő és képesek más rendezett fehérjékkel, fehérjerészekkel kölcsönhatni. A motívum-alapú interakciók vizsgálatában a fág-bemutató (angolul phage display) egy kiemelkedően fontos interakciós módszerré vált napjainkra [10]. Ezekben a kísérletekben bakteriofágok felszínén mára lehetőségessé vált olyan méretű peptidkönyvtárakat bemutatni, amik képesek lefedni az összes rendezetlen humán fehérje régiót, egymással átfedő 15-mer szakaszokban. Ezeket a fág könyvtárakat egy hordozóra kikötött tisztított csali fehérjével összekeverve tulajdonképpen egy *pull-down* kísérletet lehet kivitelezni, ami kvalitatívan azonosítani tudja azokat a potenciális motívum szekvenciákat, amik a csali fehérjéhez kötődni tudnak, tehát mérhető *intrinik* affinitással rendelkeznek.

Végül, az általunk továbbfejlesztett ún. *holdup*-alapú módszerek megoldást jelenthetnek a klasszikus interakciók csaknem minden korábbi problémájára [11]. A *holdup* kísérletek

nagymértékben hasonlítanak a *pull-down* kísérletekhez, mivel mindkét esetben egy szilárd hordozóra kikötött csali fehérjét keverünk össze egy oldatbeli analit molekulával vagy molekulák halmazával. Azonban a *holdup* esetén ennek a csali molekulának a mennyisége nagyságrendekkel nagyobb, mint egy tipikus *pull-down* esetén, mely lehetővé teszi gyenge kölcsönhatások vizsgálatát is. Mivel a csali mennyisége a reakcióelegyben minden esetben nagyobb, mint a préda molekulák összemennyisége, ezért nincs kompetíció az elérhető csali molekulákért a prédák között, ezzel biztosítva az interakciók kvantitatív karakterizálását. A *pull-down* esetén használatos mosási lépések helyett, melyek rendszerint eltüntetik a tranziens interakciókat, a *holdup* esetén azt mérjük, hogy a kötési egyensúly közelében mekkora része tűnik el az analit molekulának az oldatfázisból a kontroll kísérlethez képest, ahol nem volt kikötve a csali molekulánk a szilárd hordozóra (1. ábra). A mosási lépések hiánya és az utolsó lépésben az oldat- és szilárdfázis gyors szeparációja miatt a kötési egyensúly mindvégig megmarad, így egy egyszerű kötési egyenletet használva ez a mért relatív analit koncentráció átalakítható *intrinzik* egyensúlyi kötési állandóvá a csali molekula koncentrációjának ismeretében.

Kvantitatív interaktomikai térképezés *holdup*-alapú módszerekkel

A *holdup* kísérleteket eredetileg Gilles Travé és munkatársai írták le a 2000-es évek közepén és azóta már közel egy tucat közleményben használták már a módszert valamilyen formában. [11–16, a teljesség igénye nélkül]. Kiemelendő, hogy a technika észszerűsége okán több helyen is függetlenül kidolgoztak hasonló alapokon nyugvó módszereket, mint például Martinek Tamás csoportjában (Szegedi Tudományegyetem) [17]. Noha rengeteg variációját dolgozták ki, a két fő típusát érdemes bemutatni. A fragmens-alapú *holdup* kísérletek lehetővé teszik nagy mennyiségű fehérje-peptid típusú interakció biofizikai tanulmányozását. Ezekben a kísérletekben biotinált peptideket immobilizálunk sztreptavidin gyantán és ezt keverjük össze egy tisztított fehérjét tartalmazó oldattal, és a kötési egyensúly eléréséig inkubáljuk a reakcióelegyet. Az inkubálást követően egy gyors szűréssel elválasztjuk az oldatfázist és a megmaradt analit fehérje koncentrációjának változását az intrinzik triptofán-fluoreszcenciáját kihasználva követjük. Ezekkel a kísérletekkel, amik akár 384-es formátumú mikrolemezeken is elvégezhetőek, akár napi több tízezer affinitás mérhető más biofizikai módszerekhez hasonlatos pontossággal és precizitással [14]. A *natív holdup* kísérlet ezzel szemben annyiban tér el, hogy a gyantára kötött csalit nem egy tisztított fehérjét tartalmazó analittal, hanem teljes sejtkivonattal keverjük össze és az egyes fehérjék relatív koncentrációját célzott analitikai módszerekkel határozzuk meg, mint például Western blottal vagy tömegspektrometriával [15]. Ezzel a módszerrel egyetlen kísérlet (reakciócső) elvégzésével több ezer látszólagos affinitás mérést lehet egyidőben végrehajtani (látszólagos, mivel a kötési módot feltételeznünk kell), ráadásul az összes analit fehérje teljes hosszúságú és közel natív állapotú.

A *holdup* alapú módszereknek két fő előnye van a többi interaktomikai módszerrel szemben. Egyrészt, lehetőséget adnak a proteom-szintű biofizikai kötődési állandók mérésére. Ahogy a nevük is sugallja, ezek valóban intrinzik fizikai állandók, ami drasztikus javulást eredményez a reprodukálhatóságban a klasszikus interaktomikai módszerekhez képest. Másrészt, mivel nincsenek mosási lépések a kísérletben, még a leginkább tranziens, gyenge affinitású interakciók sem vesznek el, meghökkentően mély interaktomikai betekintést engedve ezen interakciók hálózatába. A molekuláris interakciók biofizikai karakterizálását leggyakrabban drága, anyag és műszerigényes módszerekkel lehet elvégezni, mint például kalorimetria vagy

felszíni plazmon rezonancia. Ezzel szemben, a *holdup* egyetlen pipetta és egy centrifuga segítségével elvégezhető, és az analitikai módszer is szabadon választható. Ebből következően a *holdup* alapú módszerek széles körben hozzáférhetőek és reményeink szerint egy új korszakot nyithatnak az interaktomikában.

Betekintés biológiai mechanizmusokba a *holdup* segítségével

Mint korábban említettük, a *holdup* módszereket már számos biológiai mechanizmus vizsgálatára használták korábban. Itt szeretnénk bemutatni a legújabb és legizgalmasabb eredményeinket, melyek olyan nézőpontból képesek betekintést nyújtani a hálózatokba, ami más módszerekkel jelenleg nem lehetséges.

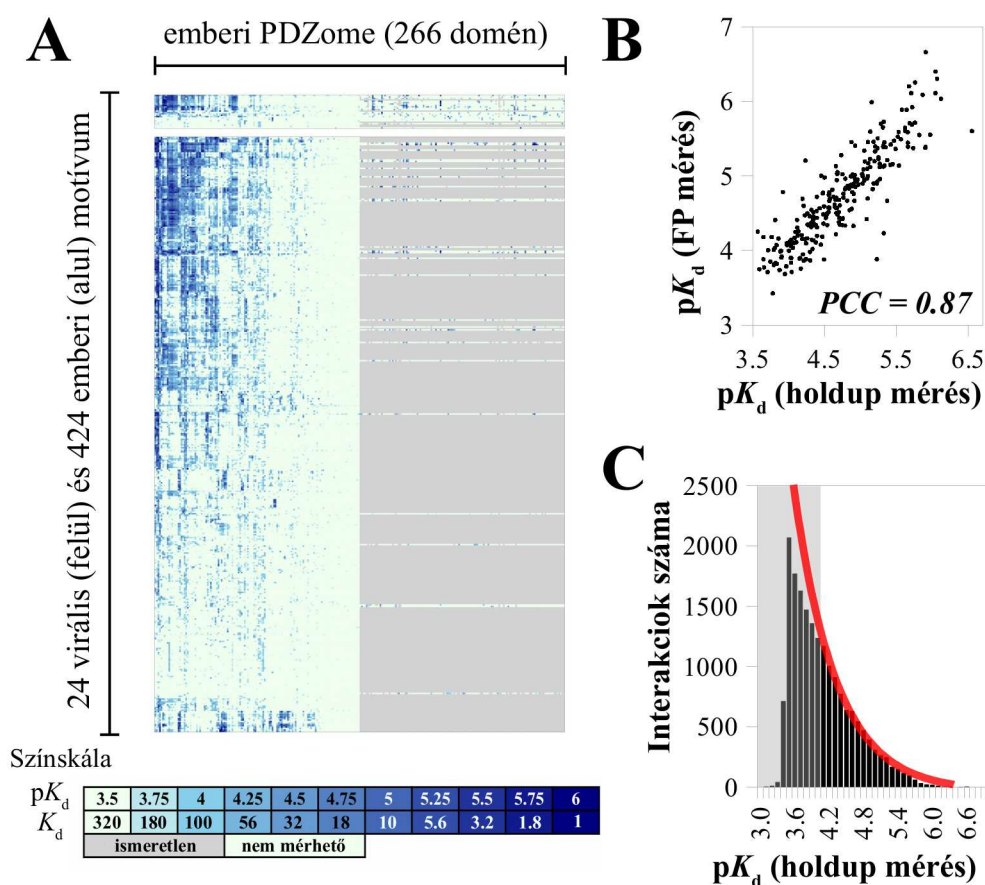
A domén-motívum hálózatok sajátosságainak megismerése a fragmentomikai *holdup* segítségével

A PDZ (postsynaptic density-95, discs-large, zona occludens 1) domének egy népes, fehérje-fehérje kölcsönhatást koordináló domén család, melyek számos jelátviteli folyamatban töltenek be fontos szerepet, például a fehérje transzportban, polarizációban, a sejtek metabolizmusában, vagy éppen a sejt-sejt kommunikációban. A humán proteom 130 PDZ domént tartalmazó fehérjéből és az ezekben megtalálható, összesen 266 PDZ doménből áll, valamint közel 5000 lehetséges PDZ kötő motívumból (PBM-ből), amelyek rendszerint a partner fehérjék extrém C-terminusán helyezkednek el. Kutatócsoportunk a *holdup* módszer alkalmazásával ebből a csaknem milliós nagyságrendű affinitást magában foglaló PDZ-PBM domén-motívum interaktomból közel 65.000 affinitást határozott meg [14] (2. ábra). Noha, ez csupán a teljes interaktom töredékét (~5%-át) fedi le, a motívumkönyvtárunkat úgy terveztük meg Zeke András (HUN-REN TTK) segítségével, hogy az jó közelítéssel lefedje bizonyos vírusokban (pl. a humán papillomavírusok E6 fehérjéjében) leggyakrabban megtalálható motívumokat, valamint a rák kialakulásában jelentős fehérjék motívumait. A kapott affinitásokat közel 400 fluoreszcencia polarizációs (FP) méréssel összevetve igazoltuk, melyek kiváló egyezést mutattak a *holdup* eredményeivel. Érdekességképp, a korábban szakirodalomban publikált affinitásokkal ellentétben, melyek normális eloszlást követnek, a mi általunk mért affinitások inkább hatványfüggvény-eloszlást mutattak, ami rávilágít arra, hogy a nagy számukhoz képest a gyenge interakciók mennyire alulreprezentáltak a szakirodalomban, és hogy valójában mennyire nagy számú interakciót tartalmaz ez a hálózat. Sikerült továbbá azonosítanunk egy olyan alhálózatot, mely leginkább célpontja lehet a vizsgált vírusoknak a kötési profilok hasonlósága alapján. Ez a nagyszámú mért affinitás azt is lehetővé teszi, hogy az egyes PDZ domének szekvencia alapú specificitási térképeit (logóit) korigáljuk a mért affinitásokkal, ezzel jobb betekintést engedve az egyes PDZ domének szekvencia preferenciájába. Összefoglalásként, ez a mérésorozat rávilágított, hogy az eddig leírtakhoz képest a domén-motívum interakciók valószínűleg sokkal degeneráltabbak és redundánsabbak, mint azt korábban gondoltuk.

Az SH3 domén hálózat szerepének feltárása a centronukleáris miopátiában

A centronukleáris miopátia egy ritka, a mozgást koordináló izmok gyengeségével és leépülésével járó örökletes vagy *de novo* mutációk okozta betegség. Számos különféle fehérje mutációja okozhatja, de leggyakrabban vagy a dynamin 2 (DNM2) vagy a Bridging Integrator 1 (BIN1) fehérje mutációja áll a háttérben. Erről a két fehérjéről ismert, hogy kölcsönhatásba tudnak lépni egymással a BIN1 fehérje SRC Homology 3 (SH3) doménjén keresztül, ami a DNM2 prolin-

gazdag régióját célozza (PRR). Csakúgy mint a PDZ domének, az SH3 domének is motívumokat kötnek, amik ismertén prolin-gazdag, jellemzően PxxP motívumok (PRM).

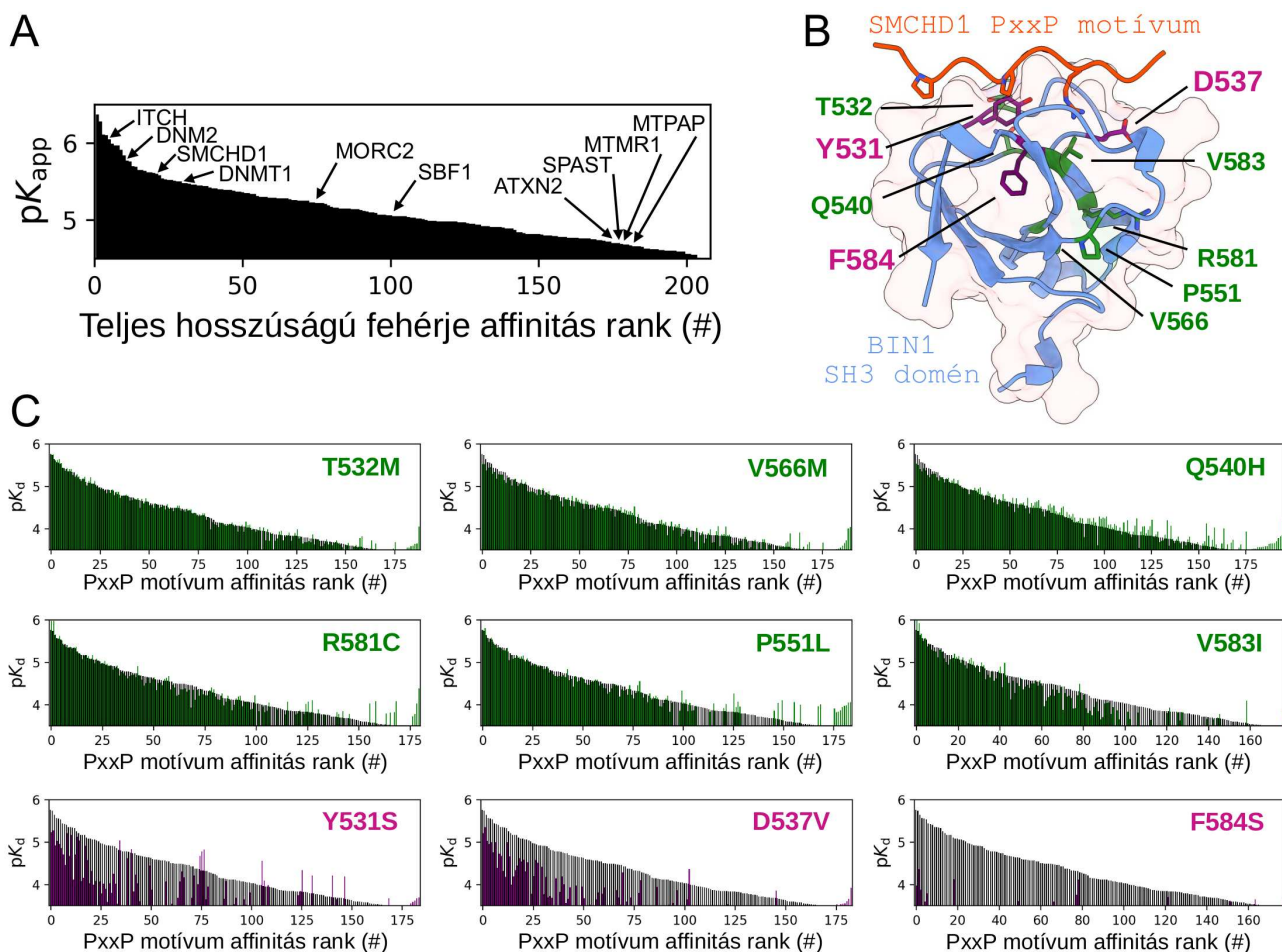


2. ábra. A PDZ-PBM hálózat vizsgálata fragmentomikai holdup segítségével. (A) Affinitás térkép 266 emberi PDZ domén és 424 PDZ kötő motívum között. A méréseink során közel 65.000 affinitást határoztunk meg, köztük virális fertőzésben és rákban fontos elemek affinitásait, melyek a teljes humán PDZ-PBM hálózat ~5%-át fedl le. **(B)** A mért értékek kiváló egyezést mutattak más módszerrel (fluoreszcencia polarizáció, FP) mért affinitás értékekkel. PCC : Pearson korrelációs koefficiens. **(C)** A holdup módszer szenzitivitása miatt képes meghatározni a hálózatok alapvető sajátosságait. A PDZ-PBM hálózat affinitás értékeire korábban leírt normál eloszlás helyett hatványfüggvény eloszlást kaptunk. (A szürke tartomány a méréseink detekciós határát jelöli.) Adaptálva a 14-es referenciából.

Kollégáink (Jocelyn Laporte és csoportja, IGBMC) és más kutatók korábban azonosítottak néhány recesszíven centronukleáris miopátiát okozó BIN1 mutációt, melyek az SH3 doménban helyezkednek el és meggátolják a DNM2 kötődését [18] (3. ábra).

Elképzelésük szerint a BIN1-DNM2 interakció kritikus az izomrostok sejtmembránjainak, mint például T-tubulusainak formálásában és ennek az interakciónak a hiánya vezet a betegség kialakulásához. Azonban számos kérdés továbbra is nyitott volt a betegség patomechanizmusával kapcsolatban, hiszen az SH3 domének szintén rendkívül promiszkusak. Hogy feltárjuk milyen más - a betegség szempontjából fontos - interakciói lehetnek a BIN1-nek a DNM2-n kívül, a *natív holdup* segítségével meghatároztuk a BIN1 SH3 doménjének interaktomját [16]. Rendkívül nagyszámú, összesen 206 kötőpartnert azonosítottunk, amik között a DNM2 a BIN1-nek valóban az egyik legnagyobb affinitással rendelkező partnerének adódott, de rajta kívül számos más nagy affinitású interakciót is azonosítottunk. Ráadásul, a kötőpartnerek között olyan fehérjék is szerepeltek, melyeket már korábban összefüggésbe hoztak különféle miopátiákkal. Hogy pontosan meghatározzuk ezekben a fehérjékben azokat a régiókat, ahova az SH3 domén közvetlenül kötődni tud, először feltérképeztük az összes

lehetséges PxxP motívumot ezekben a fehérjékben (összesen 133 fehérjében volt 448 motívum a partnerek közül), majd megszintetizáltuk és fragmens alapú *holdup* vizsgálattal a kötéseket a BIN1 SH3 doménjéhez.



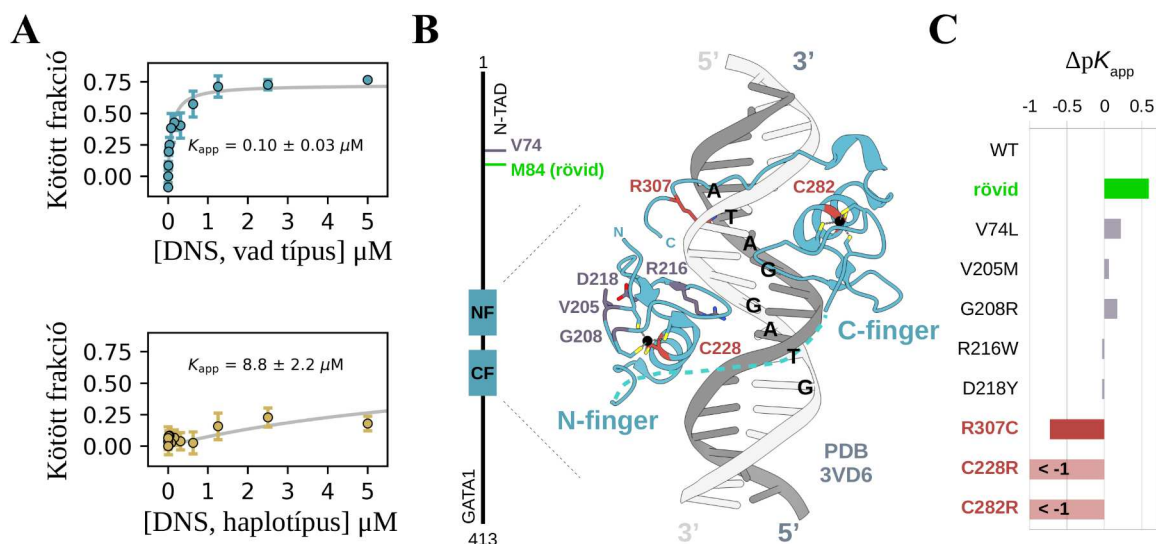
3. ábra. A különféle holdup technikák alkalmazása a centronukleáris miopátia patomechanizmusának megállapítására. (A) A centronukleáris miopátiában fontos BIN1 SH3 doménjével végzett natív holdup kísérlet eredménye, mely meglehetősen sok partnerét azonosította ennek a fehérjének. Ezek közül kiemeltük azokat, melyekről ismert, hogy más miopátiák kialakulásában jelentős szereppel rendelkeznek. **(B)** Ebben a doménben számos ritka mutációt azonosítottak, melyeknek jelentősége ismeretlen a miopátia szempontjából. **(C)** A fragmentomikai holdup segítségével - PxxP motívumkönyvtárát használva - feltártuk, melyek azok a mutációk, melyek jelentősen módosítják az SH3 domén interakcióját vagyis nagy valószínűséggel centronukleáris miopátiát okoznak. Adaptálva a 16-os referenciából.

Összesen 92 fehérjéből származó 176 motívum esetén sikerült azonosítanunk, hogy valóban képesek közvetlenül kötni a BIN1 SH3 doménjét. Több esetben a fehérjékben egyetlen funkcionális motívumot találtunk, amely hasonló affinitást mutatott a peptid-alapú kísérletben, mint teljes hosszúságú fehérjeként. Más esetekben viszont több alacsony affinitást mutató motívumot azonosítottunk, és ilyenkor a teljes hosszúságú fehérje affinitása összességében jóval nagyobbak adódtak, mint az egyes motívumok affinitása. Dosztányi Zsuzsanna és Pajkos Máttyás (ELTE Biokémia tanszék) segítségével feltártuk, hogy azok a direkt módon kötődő partnerek, amikben funkcionális motívumokat azonosítottunk szignifikáns dúsulást mutatnak sejtosztódáshoz kapcsolódó mechanizmusokban, amit további sejtes kísérletekkel igazoltunk, egy új biológiai mechanizmust feltárva a betegség hátterében. Lehetőségünk van különféle fehérjékkel mért affinitás interakciók precíz összehasonlítására, így további információt nyerve azok tulajdonságairól. Például azonosítottunk olyan SH3 doméneket, amik hasonló partnereket hasonló affinitásokkal, vagy hasonló partnereket eltérő affinitásokkal kötnek (a

partnerekre számolt $\Sigma|\Delta\Delta G|$ értékek kicsik vagy nagyok), illetve olyanokat is, akik teljesen eltérő partnereket ismernek fel. Továbbá, ezzel a módszerrel különféle ritka BIN1 variánsokat is jellemeztünk, és közülük azonosítottunk több olyat, amik interaktomikai perturbációt okoznak és sejtekben fenotípusos változásokhoz vezetnek, és ezzel potenciálisan hozzájárulnak a miopátia klinikai kórképéhez.

DNS-protein interakciók feltérképezése natív holduppal

Az interaktomika szinte kizárólagosan fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára korlátozódik, viszont a *holdup* kísérletek előnye, hogy egyéb molekuláris interakciók is tanulmányozhatóak velük. Erre egy példa legújabb kutatásunk, ahol DNS fragmensek kötődését vizsgáltuk transzkripciós faktorokhoz [19] (4. ábra). Korábbi kutatásaink során Sarkadi Balázs kutatólaborjában (Biomembrán Kutatócsoport, Molekuláris Élettudományi Intézet), Várady György és Enyedi Ágnes csoportjának elengedhetetlen közreműködésével azonosítottunk egy erythroid-specifikus promótert, mely a PMCA4b kalcium pumpa expressziójáért felelős vörösvérsejtekben [20]. Leírtuk továbbá ennek a promóternek egy gyakori haplotípusát, ami nagymértékben csökkenti a fehérje expresszióját.



4. ábra. A natív holdup alkalmazása egy kalcium pumpa expressziójának GATA1 általi szabályozásának vizsgálatára. (A) A kalcium pumpa génjében egy haplotípus található, mely módosítja a GATA1 fehérje kötését, melyet natív holdup segítségével tártuk fel úgy, hogy a gyantára különféle mennyiségű vad típusú vagy haplotípust tartalmazó DNS-t kötöttünk ki, és endogén GATA1-et tartalmazó sejt kivonattal inkubáltunk. A GATA1 mennyiségének a változását Western blotlal követtük. (B) A GATA1 DNS-el alkotott komplexének szerkezete. Munkánk során 6 anémiában vagy myeloproliferatív betegségben fontos természetes mutációt vizsgáltunk (rövid, V205M, G208R, R216W, D218Y, R307C), valamint két mesterséges mutációt, melyek vagy az N-terminális cink-ujjat (C228R), vagy a DNS-kötésben fontosabb C-terminális cink-ujjat teszik tönkre (C282R). (C) A natív holdup titrálásos eredmények azt mutatták, hogy két természetes mutáció esetén változik a fehérje DNS-el mutatott affinitása: a rövid variáns és az R307C esetén. Míg a rövid variáns esetén megnövekedett affinitást tapasztaltunk, mely egybecseng a myeloproliferatív klinikai manifesztációval, addig az R307C jelentősen csökkentette az affinitást, mely utóbbi variáns pedig anémiát okoz. ΔK_{app} : a vad típusú GATA1-hez viszonyított affinitás különbség. Adaptálva a 19-es referenciából.

Megfelelő módszerek hiányában a regulációért felelős transzkripciós faktort azonban direkt módon nem sikerült azonosítanunk. Natív holdupot használtunk ennek az enigmatikus transzkripciós faktornak az azonosítására úgy, hogy a kritikus SNP-ket (Single Nucleotide Polymorphisms) tartalmazó biotinált dupla szálú DNS fragmenseket kötöttük ki a gyantára, amit erythroid-jellegű K562 sejt kivonattal inkubáltuk és tömegspektrometria segítségével analizáltuk a kötőpartnereket. Meglepő módon nagy mennyiségű kötőpartnert detektáltunk a korábbi fehérje-fehérje interakciós vizsgálatainkhoz képest, és a partnerek döntő többsége ismert nukleinsav kötő tulajdonsággal bíró fehérje volt. Ráadásul, ezeknek a partnereknek a többsége

a kevert (scrambled) DNS kontroll szekvenciához is ugyanolyan mértékű kötődést mutatott, tehát feltételezhetően nem-szekvencia specifikusan kötődtek. A partnerek közül azonban kiemelkedett a GATA1 transzkripció faktor, ami egyértelműen szekvencia specifikusan kötődött és a legnagyobb affinitás változást mutatta az SNP-k jelenlétének a hatására. Ezzel összhangban korábbi indirekt riporter gén alapú kísérleteink is a GATA1 kötődését feltételezték a mechanizmus hátterében.

A GATA1 transzkripció faktor a mieloid progenitorok differenciációját irányítja a csontvelőben, és számos *de novo* mutációjáról ismert, hogy súlyos anémiát okoz emberekben. Habár ezen mutációk egy része feltételezhetően a DNS-kötést is befolyásolja, eddig nem állt rendelkezésre olyan technika, mellyel könnyen lehetett volna mérni ezt a paramétert teljes hosszúságú GATA1 fehérjén fiziológias körülmények között. A *natív holdup* ennek vizsgálatára is alkalmas, ugyanis lehetséges a sejtekben egy címke segítségével expresszálni ezeket a mutánsokat és egy ismert GATA1-felismerő DNS ellenében mérni az affinitásváltozásokat. Munkánk során hat, már korábban leírt mutációt hordozó GATA1-et vizsgáltunk ilyen módon, és kettő esetén eltérést tapasztaltunk a DNS kötésben. Az egyik ilyen mutáció esetén a fehérje N-terminális transzaktivációs doménje (N-TAD-ja) hiányzik, vagyis egy rövid izoformát eredményez (GATA1 short, GATA1s).

Érdekes, hogy ez a rövidebb variánst leginkább myeloproliferatív és leukémiás betegségekkel hozták összefüggésbe, vagyis a sejtek túlprodukciónak okozzák a sejtek hiánya helyett. Különböző sejt riporter esszéknél is megnövekedett aktivitást lehet tapasztalni a rövid variáns esetén a vad típushoz képest. A *natív holdup* kísérlet segítségével megmutattuk, hogy ez a fehérje négyszer erősebb affinitással képes kötni különböző DNS szubsztrátokat a teljes hosszúságú fehérjéhez viszonyítva. A másik mutáció, ahol különbségeket tapasztaltunk az az R307C mutáció volt. Ez az arginin közvetlenül a második, a DNS-kötésben leginkább résztvevő cink-ujj után helyezkedik el. Habár eddig úgy vélték, hogy egy nukleáris lokalizációs szignál (NLS) található ebben a pozícióban, szerkezeti munkák alapján ez az arginin mélyen benyúlik a kis árokba, valószínűleg szignifikánsan hozzájárulva a fehérje DNS kötéséhez. A *natív holdup* kísérleteinkben e mutáció ötszörös csökkenést okozott a szubsztrátok affinitásaiban. Vagyis a *natív holdup* képes - az egyébként *in vitro* nehezen előállítható és vizsgálható - transzkripció faktorok DNS kötési paramétereinek egyszerű és pontos meghatározására, új lehetőségeket nyitva a DNS-kötő fehérjék kutatásában.

Kitekintés

Az interaktomika az elmúlt években a tudományos közösségben vegyes megítélés alá esett. Ez döntően az interaktomikai módszerek nagyon alacsony reprodukálhatóságának köszönhető, másrészt az interaktomikai térképek jellege miatt. A klasszikus interaktomikai módszerek szinte kivétel nélkül irányítatlan és súlyozatlan gráfokként ábrázolják a feltárt hálózatokat. Ezekből gyakran komoly kihívást jelent azonosítani azokat a kölcsönhatásokat, melyek feltételezhetően egy adott biológiai mechanizmus hátterében állnak. A valóságban viszont az interakciók különbözőek a hálózaton belül, és mindegyik kölcsönhatás egy sor intrinzik vagy extrinzik fizikai paraméterrel jellemezhető. Munkánk során azon dolgozunk, hogy olyan újfajta módszereket fejlesszünk az interaktomika területén, melyek képesek nagyskálán ezeket a fizikai paramétereket meghatározni. Elképzelésünk szerint amennyiben sikerrel járunk, és egyszer képesek leszünk katalogizálni az összes lehetséges affinitást a sejtjeinkben előforduló összes

molekula között, az a különféle sejtes mechanizmusok olyan precizitású modellezését teszi lehetővé, ami egy új korszakot nyithat az élettudományok számára.

Irodalomjegyzék

- [1] Goll J & Uetz P (2006) The elusive yeast interactome. *Genome Biol* **7**, 223.
- [2] Fields S & Song OK (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- [3] Luck K, Kim DK, Lambourne L, Spirohn K, Begg BE, Bian W, Brignall R, Cafarelli T, Campos-Laborie FJ, Charlotheaux B, Choi D, Coté AG, Daley M, Deimling S, Desbuleux A, Dricot A, Gebbia M, Hardy MF, Kishore N, Knapp JJ, Kovács IA, Lemmens I, Mee MW, Mellor JC, Pollis C, Pons C, Richardson AD, Schlabach S, Teeking B, Yadav A, Babor M, Balcha D, Basha O, Bowman-Colin C, Chin SF, Choi SG, Colabella C, Coppin G, D'Amata C, De Ridder D, De Rouck S, Duran-Frigola M, Ennajdaoui H, Goebels F, Goehring L, Gopal A, Haddad G, Hatchi E, Helmy M, Jacob Y, Kassa Y, Landini S, Li R, van Lieshout N, MacWilliams A, Markey D, Paulson JN, Rangarajan S, Rasla J, Rayhan A, Rolland T, San-Miguel A, Shen Y, Sheykhkarimli D, Sheynkman GM, Simonovsky E, Ta'an M, Tejada A, Tropepe V, Twizere JC, Wang Y, Weatheritt RJ, Weile J, Xia Y, Yang X, Yeger-Lotem E, Zhong Q, Aloy P, Bader GD, De Las Rivas J, Gaudet S, Hao T, Rak J, Tavernier J, Hill DE, Vidal M, Roth FP & Calderwood MA (2020) A reference map of the human binary protein interactome. *Nature* **580**, 402–408.
- [4] Keilhauer EC, Hein MY & Mann M (2015) Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Mol Cell Proteomics* **14**, 120–135.
- [5] Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway BM, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T, Rad R, Pan J, Nusinow DP, Paulo JA, Schweppe DK, Vaites LP, Harper JW & Gygi SP (2021) Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* **184**, 3022–3040.e28.
- [6] Cho NH, Cheveralls KC, Brunner A-D, Kim K, Michaelis AC, Raghavan P, Kobayashi H, Savy L, Li JY, Canaj H, Kim JYS, Stewart EM, Gnann C, McCarthy F, Cabrera JP, Brunetti RM, Chhun BB, Dingle G, Hein MY, Huang B, Mehta SB, Weissman JS, Gómez-Sjöberg R, Itzhak DN, Royer LA, Mann M & Leonetti MD (2022) OpenCell: Endogenous tagging for the cartography of human cellular organization. *Science* **375**, eabi6983.
- [7] Weimer K, Zambo B & Gogl G (2023) Molecules interact. But how strong and how much? *BioEssays* **45**, 1–11.
- [8] Skinnider MA, Scott NE, Prudova A, Kerr CH, Stoyinov N, Stacey RG, Chan QWT, Rattray D, Gsponer J & Foster LJ (2021) An atlas of protein-protein interactions across mouse tissues. *Cell* **184**, 4073–4089.e17.
- [9] Qin W, Cho KF, Cavanagh PE & Ting AY (2021) Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Methods* **18**, 133–143.
- [10] Benz C, Ali M, Krystkowiak I, Simonetti L, Sayadi A, Mihalic F, Kliche J, Andersson E, Jemth P, Davey NE & Ivarsson Y (2022) Proteome-scale mapping of binding sites in the unstructured regions of the human proteome. *Mol Syst Biol* **18**, 1–27.
- [11] Charbonnier S, Zanier K, Masson M & Travé G (2006) Capturing protein-protein complexes at equilibrium: The holdup comparative chromatographic retention assay. *Protein Expr Purif* **50**, 89–101.
- [12] Vincentelli R, Luck K, Poirson J, Polanowska J, Abdat J, Blémond M, Turchetto J, Iv F, Ricquier K, Straub M-L, Forster A, Cassonnet P, Borg J-P, Jacob Y, Masson M, Nominé Y, Reboul J, Wolff N, Charbonnier S & Travé G (2015) Quantifying domain-ligand affinities and specificities by high-throughput holdup assay. *Nat Methods* **12**, 787–93.
- [13] Caillet-Saguy C, Durbesson F, Rezelj V V., Gogl G, Tran QD, Twizere JC, Vignuzzi M, Vincentelli R & Wolff N (2021) Host PDZ-containing proteins targeted by SARS-CoV-2. *FEBS J* **288**, 5148–5162.
- [14] Gogl G, Zambo B, Kostmann C, Cousido-Siah A, Morlet B, Durbesson F, Negroni L, Eberling P, Jane P, Nomine Y, Zeke A, Ostergaard S, Monsellier E, Vincentelli R & Trave G (2022) Quantitative fragmentomics allow affinity mapping of interactomes. *Nat Commun* **13**, 1–18.
- [15] Zambo B, Morlet B, Negroni L, Trave G & Gogl G (2022) Native holdup (nHU) to measure binding affinities from cell extracts. *Sci Adv* **8**, eade3828.
- [16] Zambo B, Edelweiss E, Morlet B, Negroni L, Pajkos M, Dosztanyi Z, Ostergaard S, Trave G, Laporte J & Gogl G (2024) Uncovering the BIN1-SH3 interactome underpinning centronuclear myopathy. *Elife* **13**, RP95397.
- [17] Tököli A, Mag B, Bartus É, Wéber E, Szakonyi G, Simon MA, Czibula Á, Monostori É, Nyitray L & Martinek TA (2020) Proteomimetic surface fragments distinguish targets by function. *Chem Sci* **11**, 10390–10398.
- [18] Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL & Laporte J (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* **39**, 1134–1139.
- [19] Zambo B, Morlet B, Negroni L, Mozner O, Sarkadi B, Trave G & Gogl G (2024) Identification and quantitative characterization of protein-DNA interactions with the native holdup assay: GATA1 regulation of the plasma membrane calcium pump. *bioRxiv*, 2024.08.26.609639.

- [20] Zámbó B, Várady G, Padányi R, Szabó E, Németh A, Langó T, Enyedi Á & Sarkadi B (2017) Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene. *Cell Calcium* 65, 73–79.



Zámbó Boglárka diákkörös hallgatóként az ELTE Biokémia Tanszékén Reményi Attila csoportjában kezdte kutatói munkásságát fehérje-fehérje interakciók sejtés vizsgálatával, a doktori munkáját pedig Sarkadi Balázs csoportjában (MTA Enzimológiai Intézet) folytatta, ahol a membránfehérjék proteomikai változásainak genetikai hátterét vizsgálta. Védését követően a franciaországi Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Strasbourg) intézethez csatlakozott, ahol „Fondation pour la Recherche Médicale” ösztöndíjasként a fragilis X szindróma molekuláris biológiáját kutatta Hervé Moine csoportjában. Jelenleg Gilles Travé kutatócsoportjában dolgozik, ahol újgenerációs fehérje-fehérje interakciós módszereket fejleszt ki. Jövőre, mint senior kutató csatlakozik Gógl Gergő újonnan alakuló csoportjához. Fő érdeklődési területe a különféle betegségekben fontos genetikai variánsok hatásainak holisztikus megértése nagyskálás módszerek segítségével, mint például az interaktomika, proteomika vagy különféle sejtbiológiai esszék.



Gógl Gergő kutatásait a KutDiák mozgalom keretében kezdte Friedrich Péter laboratóriumában az MTA Enzimológiai Intézetében, Alexa Anita témavezetésével, majd később az ELTE Biokémia Tanszékén Reményi Attila csoportjához csatlakozott. Doktori munkáját 2018-ban védte meg, amelyet Nyitray László és Reményi Attila kettős témavezetésével végzett. 2019 óta Franciaországban, a strasbourg-i IGBMC-ben dolgozik, korábban, mint ösztöndíjas kutató Gilles Travé kutatócsoportjában, majd önállóan, mint Inserm kutató. 2024 második felében indítja saját kutatócsoportját a Valrose-i biológiai intézetben (iBV, Nizza) az ATIP-Avenir fiatal csoportvezetői programjának segítségével. Kutatása a biológiai mechanizmusok molekuláris szintű megértése és modellezése újgenerációs kvantitatív interaktomika segítségével.

Fehérjekorona képződés az extracelluláris vezikulák felszínén vérplazmában

Dr. Tóth Eszter Ágnes

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola,

A humán molekuláris genetika és a géndiagnosztika alapjai program

e-mail: toth.eszter.agnes@semmelweis.hu

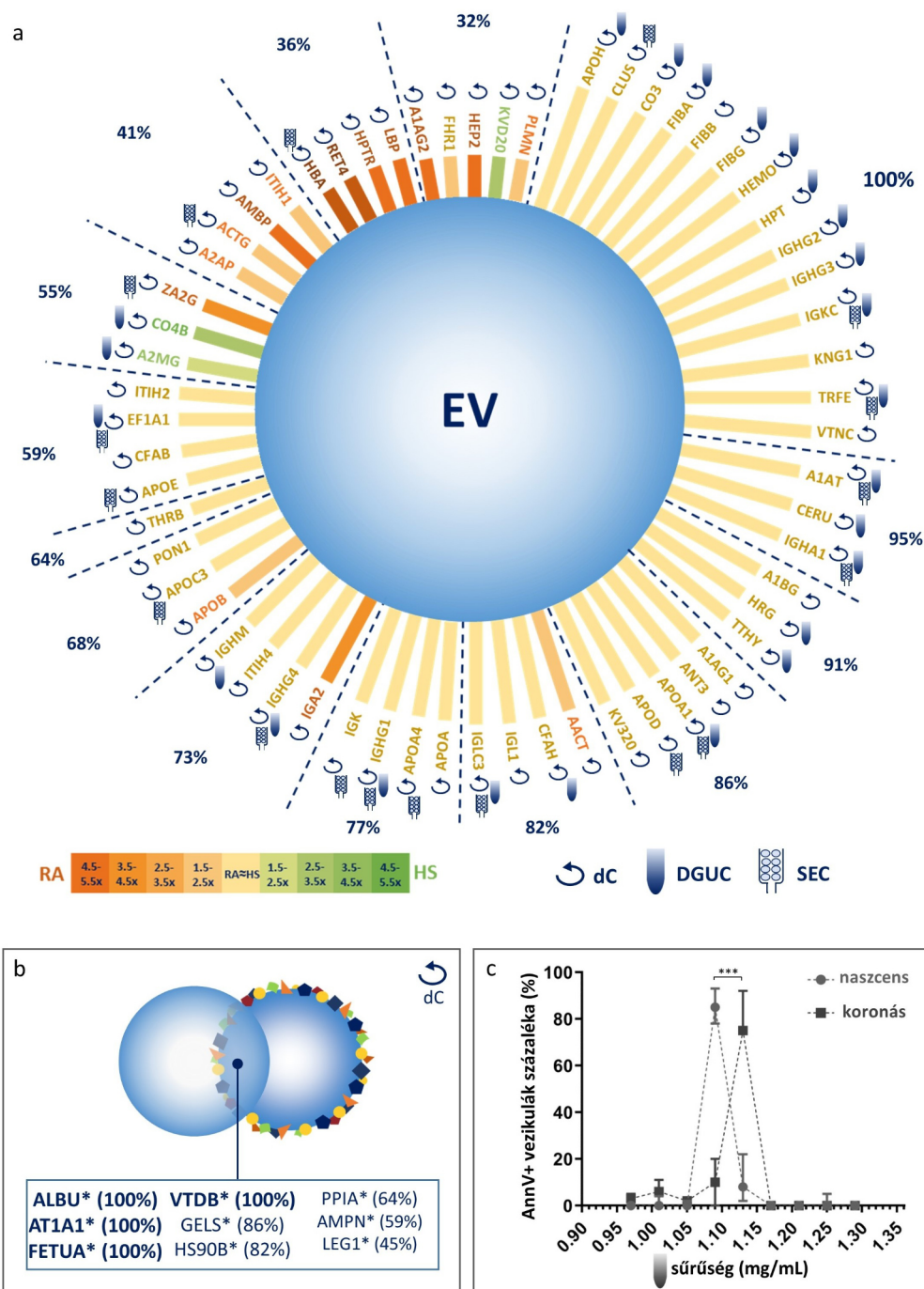
témavezetők: Dr. Horváthné dr. Szabó-Taylor Katalin Éva, Prof. Dr. Buzás Edit

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) szervezetünk sejtek közötti kommunikációs-hírközlő rendszerének aprócska (<1000 nm), kettős lipidmembránnal határolt egységei, melyek - lévén az összes sejt képes kibocsátásukra - minden testfolyadékunkban fellelhetőek [1]. Szerepük számos egészséges és kóros folyamatban ismert, a diagnosztikai és potenciális terápiás alkalmazásuk iránti érdeklődés pedig folyamatosan növekszik [1].

Az EV-k mérettartományába eső mesterségesen előállított nanopartikulumokat (NP-kat) az utóbbi évtizedekben a célzott orvoslás egyik ígéretes eszközeként próbálják különféle megbetegedések kezelésére felhasználni [2]. Nem sokkal azt követően, hogy mesterséges NP-kat különféle biológiai közegekbe helyezve kezdtek el vizsgálni, kiderült, hogy felszínükre fehérjék sokasága kötődik [3]. Ez az ún. fehérjekorona hatással van a NP-k biológiai hozzáférhetőségére, szervezeten belüli eloszlására: előfordulhat például, hogy elfedi a célzó molekulákat a NP-k felszínén, s így azok célt tévesztenek [4]. Míg az EV-k belsejébe zárt „csomagok” vizsgálatát számtalan kutatás célozza, az EV-k felszínéhez kötődő molekulákkal kapcsolatban a disszertációm alapjául szolgáló kutatásig mindössze minimális ismeretanyag állt rendelkezésünkre.

Célunk így az volt, hogy feltárjuk, vajon az EV-k felszínén is kialakul-e a NP-kéhoz hasonló gazdag fehérjekorona. Míg a mesterséges NP-k esetében aránylag egyértelműen elkülöníthetjük az újonnan a részecskék felszínéhez kötődő molekulákat a NP-k már meglévő összetevőitől, az EV-k esetében ez kihívást jelent, minthogy ezek maguk is változatos és sok tekintetben még ismeretlen összetételű képletek. Munkánk során azt a megközelítést alkalmaztuk, hogy THP1 monocita sejtvonal-eredetű közepes méretű (100-800 nm, sorozatos differenciál centrifugálással (dC) és gravitációs szűréssel elkülönítve) EV-ket szeparáltunk úgy, hogy az „anya sejteket” előzőleg egy éjszakán át szérumban tartottuk, ezáltal a közeg, melyből az EV-ket izoláltuk, amennyire lehetséges, nem tartalmazott szolubilis fehérjéket. Az EV-ket ezt követően olyan vérplazma mintákban inkubáltuk, melyekből előzőleg sorozatos centrifugálással, illetve szűréssel eltávolítottuk az EV-k nagyrészét (EV-depletált plazma, EVDP). Egyes EV mintákat egy gyulladásos reumatológiai megbetegedésben, reumatoid arthritisben (RA) szenvedő betegektől származó plazmamintákban inkubáltunk. Az inkubációs idő letelte után az EV-ket újra szeparáltuk, melyhez több megközelítést is alkalmaztunk: legnagyobb arányban dC-vel választottuk el újra a vezikulákat, de összehasonlításképpen az irodalomban „tisztábbként” leírt módszereket, így méretkizárásos kromatográfiát (size exclusion chromatography, SEC), denzitás grádiens ultracentrifugálást (DGUC), is alkalmaztunk egyes minták esetében. Annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk a fehérjekoronát „felöltő” EV-k tulajdonságait a

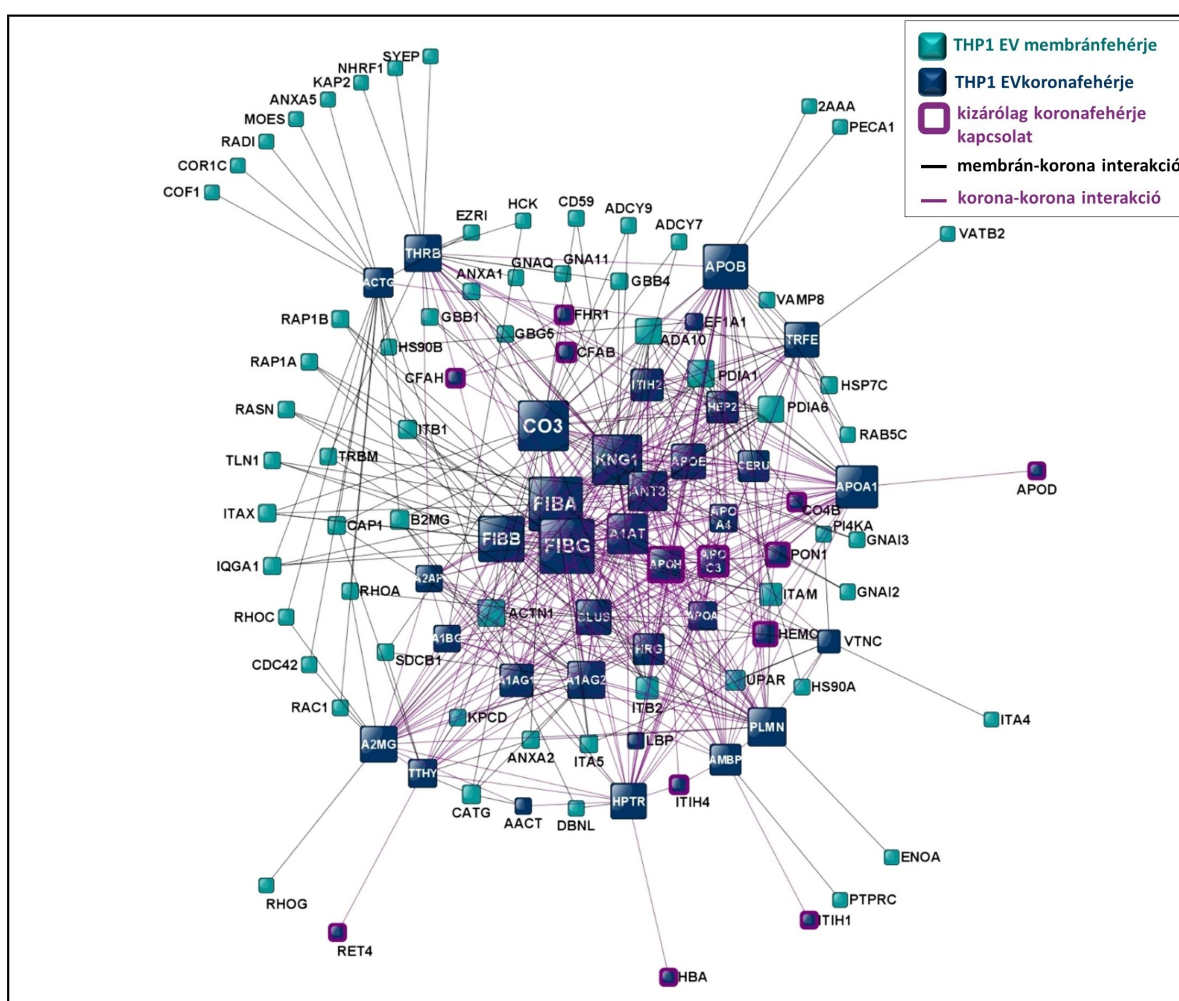
nascens, azaz keletkezését követően feltételezetten változatlan formában jelenlévő EV-kkel, pufferben is inkubáltunk vezikulákat, melyeket a vérplazmában inkubált társaikhoz hasonlóképpen izoláltunk utána újra.



1. ábra. THP1 EV-k felszínén fehérjekorona képződik vérplazmában. (a): szérum-mentesen tartott THP1 sejtek közepes EV-it izoláltuk, majd előzőleg egészségesektől, illetve reumatoid artritiszes betegektől (RA) származó EV-depletált vérplazmában (EVDP) inkubáltuk. Az EV-eket ezt követően i) dC-vel (egészséges n=12, RA n=10), ii) DGUC-vel (egészséges n=3, RA n=3), vagy iii) SEC-kel (egészséges n=3, RA n=3) újra szeparáltuk. A fehérje összetételt ezt követően tömegspektrometriával határoztuk meg. Kontrollként naszcens EV-eket használtunk. Az ábra azt a 61 koronafehérjét mutatja, mely a fehérjekoronás EV minták $\geq 30\%$ -ában jelen volt, de a naszcens mintákban nem. Azon fehérjéket, melyek a dC újraizolációs módszerrel nyert mintákon kívül a DGUC-s vagy SEC-es mintákban is jelen voltak, kis ikonokkal jelöltük. A fehérjék rövidítéseit azok UniProt ID-iből származtattuk a _HUMAN utótagot leahyva. (b) Az előzőekben bemutatott koronafehérjék között nem szerepelnek olyan fehérjék, melyek a naszcens EV mintákban is azonosíthatóak voltak, azonban tipikusan szecernált fehérjék. Ezeket tüntettük fel ezen az ábrapanelen. (c) Annexin V (AnnV) pozitív események áramlási citometriával kimutatva DGUC frakciókban naszcens (n=3), illetve fehérjekoronás (n=3) EV mintákban. A fehérjekoronás EV-k sűrűsége szignifikánsan magasabb, mint a naszcensé. $p < 0,001$ és $p < 0,01$; multiple t-teszt.

Mintáinkat tömegspektrometriával, áramlási citometriával, különféle transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) technikákkal, konfokális mikroszkópiával, kapilláris Western blot technikával vizsgáltuk, valamint funkcionális vizsgálatokat is végeztünk. Ezekből a hely szűke miatt egy-egy részletet mutatok be most.

További kontrollként EV-k hozzáadása nélküli EVDP mintákat is alávetettük ugyanezen izolációs eljárásoknak. Jellemzően tehát három párhuzamossal dolgoztunk: i) naszcens EV-k, ii) EVDP-ből származó minták (fehérje aggregátumként hivatkoztunk rájuk), iii) várhatóan fehérjekoronát viselő EV-k.

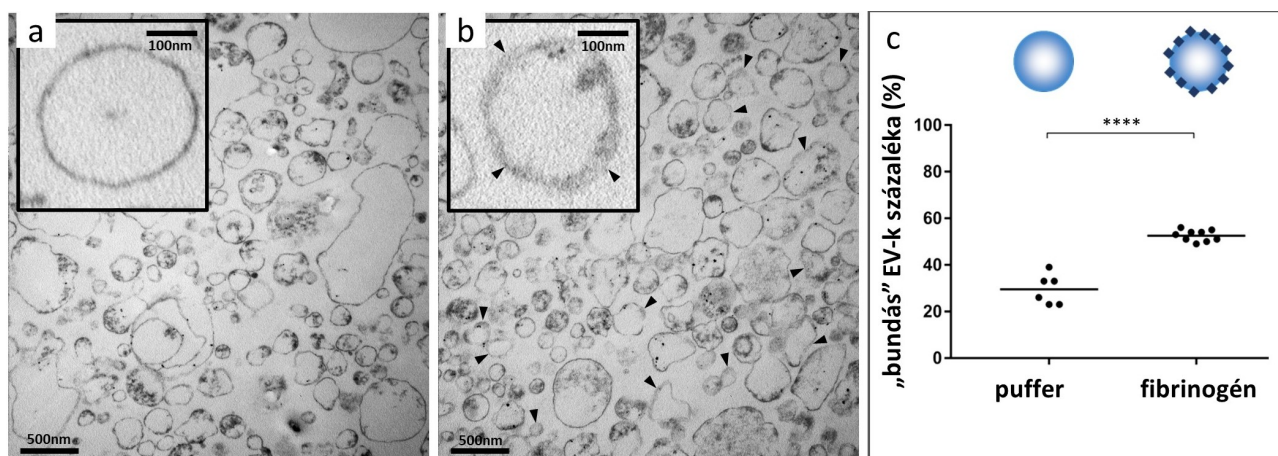


2. ábra. Koronafehérjék interakciós térképe EV felszíni fehérjékkel és más koronafehérjékkel. A STRING adatbázis (<https://string-db.org>) alkalmazásával magas konfidenciaszinttel (interakciós szint ≥ 0.700) meghatározott fehérje-fehérje interakciók a THP1-eredetű közepes méretű EV membránfehérjék (az UniProt adatbázis alapján prediktálva), illetve a koronafehérjék között. A STRING adatbázis nem foglalta magába a hisztonfehérjéket és immunglobulinokat. A 107 hálózati csomó közül 61 membránfehérjéket, míg 46 koronafehérjéket jelöl. Az 515 él közül 203 koronafehérje-membrán fehérje, míg 312 koronafehérje-koronafehérje kapcsolatot jelöl. 13 koronafehérje (lila szegéllyel jelölve) csak más koronafehérjékkel lépett kapcsolatba. Azon fehérjék, melyeknek nem azonosítottunk interakciós partnerét, nem kerültek feltüntetésre. Minden valószínűsített interakciót (beleértve az irodalmi alapokon vett, kísérletesen igazolt, adatbázisokban szereplő, ko-expressziós, szomszédsági, génfüziós és együttes előfordulási alapon vett fizikai és funkcionális asszociáció) belevettünk a vizsgálatba.

A tömegspektrometriás vizsgálatok esetében a fehérjekoronát alkotó fehérjék listáját úgy kaptuk meg, hogy az EVDP-ben inkubált (várhatóan fehérjekoronát viselő) EV-k fehérje listájából levontuk a naszcens EV-k fehérjelistáját. A kivonást követően a dC-vel izolált EV-k esetében 144 különféle fehérjét azonosítottunk így koronafehérjéként, melyek közül 20 a minták

(n=22) $\geq 90\%$ -ban, 61 pedig $\geq 30\%$ -ukban jelen volt. Utóbbiakból 42 egyenlő arányban volt megtalálható egészséges, és RA-s mintákban, míg 16 legalább 1,5-szer nagyobb arányban fordult elő az RA-s minták között. Ezt a 61 fehérjét (továbbiakban koronafehérjét) mutatja be az 1/a ábra.

Az ábrán színskála mutatja, hogy egy adott fehérje milyen arányban jelent meg az egészséges, illetve az RA-s mintákban: a vörös árnyalattal jelölt oszlopok az RA-s, míg a zölddel jelölt oszlopok az egészséges minták közt gyakrabban felbukkanó fehérjéket jelölik. Abban az esetben, ha egy fehérjét egyenlő arányban azonosítottunk a két halmazban, a fehérjét jelölő oszlop sárga színt kapott. Érdekesség, hogy további 66 olyan fehérjét azonosítottunk, mely mind a koronás, mind a naszcens EV-mintákban fellelhető volt, és ezek közé esett például az egyébként legnagyobb koncentrációban előforduló plazmafehérje, az albumin is, illetve néhány más tipikus plazmafehérje is (1/b ábra). A dC-vel újravezetett mintákhoz képest mind a SEC-vel, mind a DGUC-val elkülönített mintákban kisebb számú fehérjét azonosítottunk (1/a ábra). Ez részben a módszerek nagyobb tisztaságának, részben annak tudható be valószínűleg, hogy ezek a módszerek a minták nagyobb hígításával, így nagyobb EV-vesztéssel is járnak. A DGUC minták esetében szembevetendő volt, hogy a fehérjekoronás EV-k a naszcenshez képest nagyobb sűrűségű frakciókban lebegtek (1,15 mg/mL vs. 1,10 mg/mL frakció, Annexin V-FITC jelölés, áramlási citométerrel mérve – a fluoreszcens Annexin V a foszfatidil-szerin molekulákhoz köt, s ezáltal a közepes méretű EV-k egyik tipikus jelölő markere (1/c ábra) [1]).



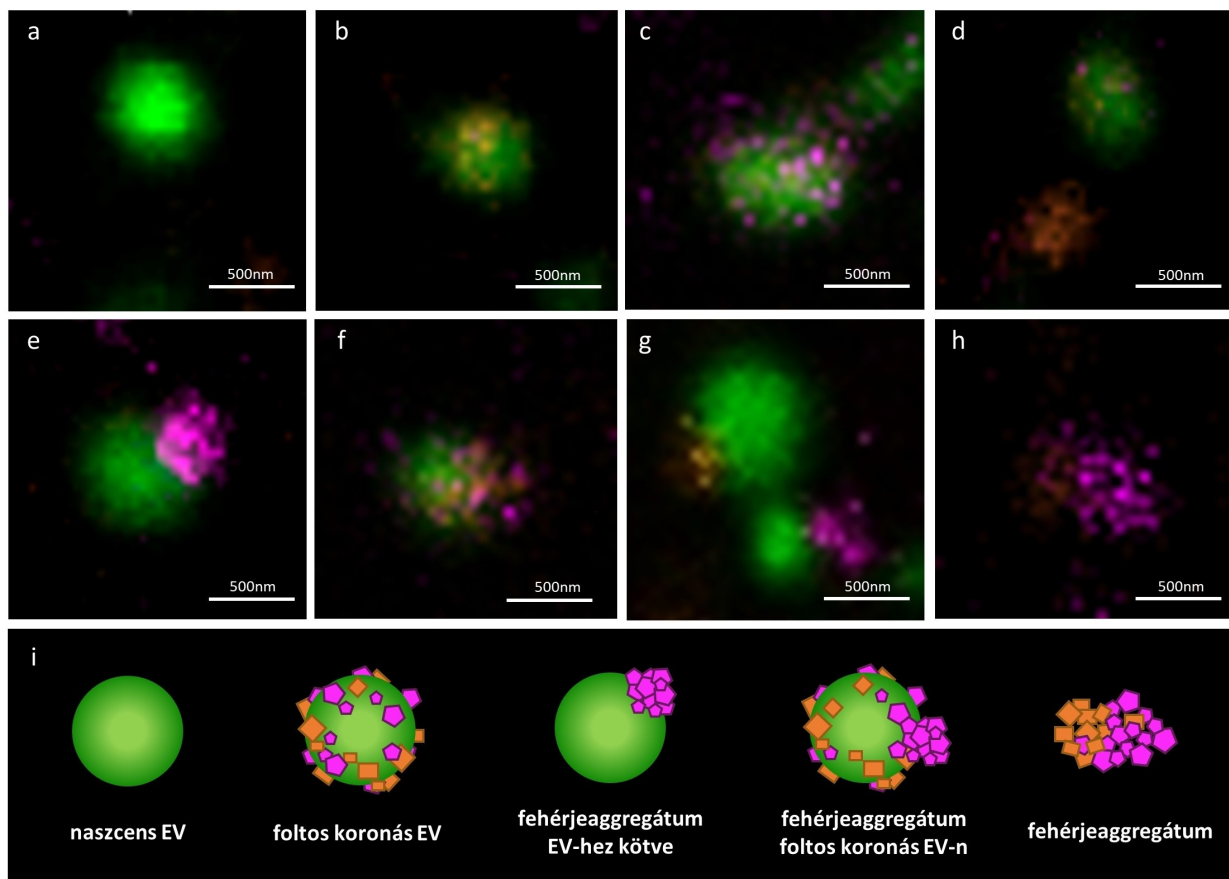
3. ábra. Fibrinogén-koronás EV-k elektronmikroszkópiás képei. Pufferben inkubált naszcens EV-k (a), vagy 1 mg/mL fibrinogénben inkubált EV-k (b) elektronmikrogramjai. A nyílhegyek a „bundás” EV-kre mutatnak. (c): A naszcens (6 független területen n=596 EV) és a fibrinogén-koronás (8 független területen n=838 EV) EV-k képein a „bundás” EV-k százaléka összehasonlítása. $P < 0,0001$, t-teszt.

Fehérje-fehérje interakciós vizsgálattal azt találtuk a 61 koronafehérje közül 13 esetében, hogy csak más koronafehérjével mutattak interakciót, de predikciós modell alapján a naszcens EV-k membránjába jószolt fehérjékkal nem (2. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a fehérjekorona több rétegben alakulhat ki az EV-k felszínén. Fluoreszcensen jelölt fibrinogén oldatban inkubálva, majd áramlási citometriával vizsgálva EV-inket azt találtuk, hogy növekvő sókoncentrációval a fibrinogén leválasztható az EV-k felszínéről.

Természetesen szeretnénk volna „látható” bizonyítékkal is szolgálni az EV-korona meglétére. Ultravékony metszetek TEM vizsgálatához egy egyszerűsített modellben fibrinogén jelenlétében inkubáltuk az EV-eket. A naszcens EV-khez viszonyítva a fehérjekoronás EV képeken

szignifikánsan nagyobb számban láttunk olyan EV-ket, melyek felszínén megfigyelhető volt egyfajta „bunda” (3.ábra). Konfokális mikroszkópiával készült képeken szembeötlő volt, hogy a diffúz-foltos korona megjelenés mellett egyes EV-khez aggregátum-jellegű struktúrák is kötődtek (4.ábra).

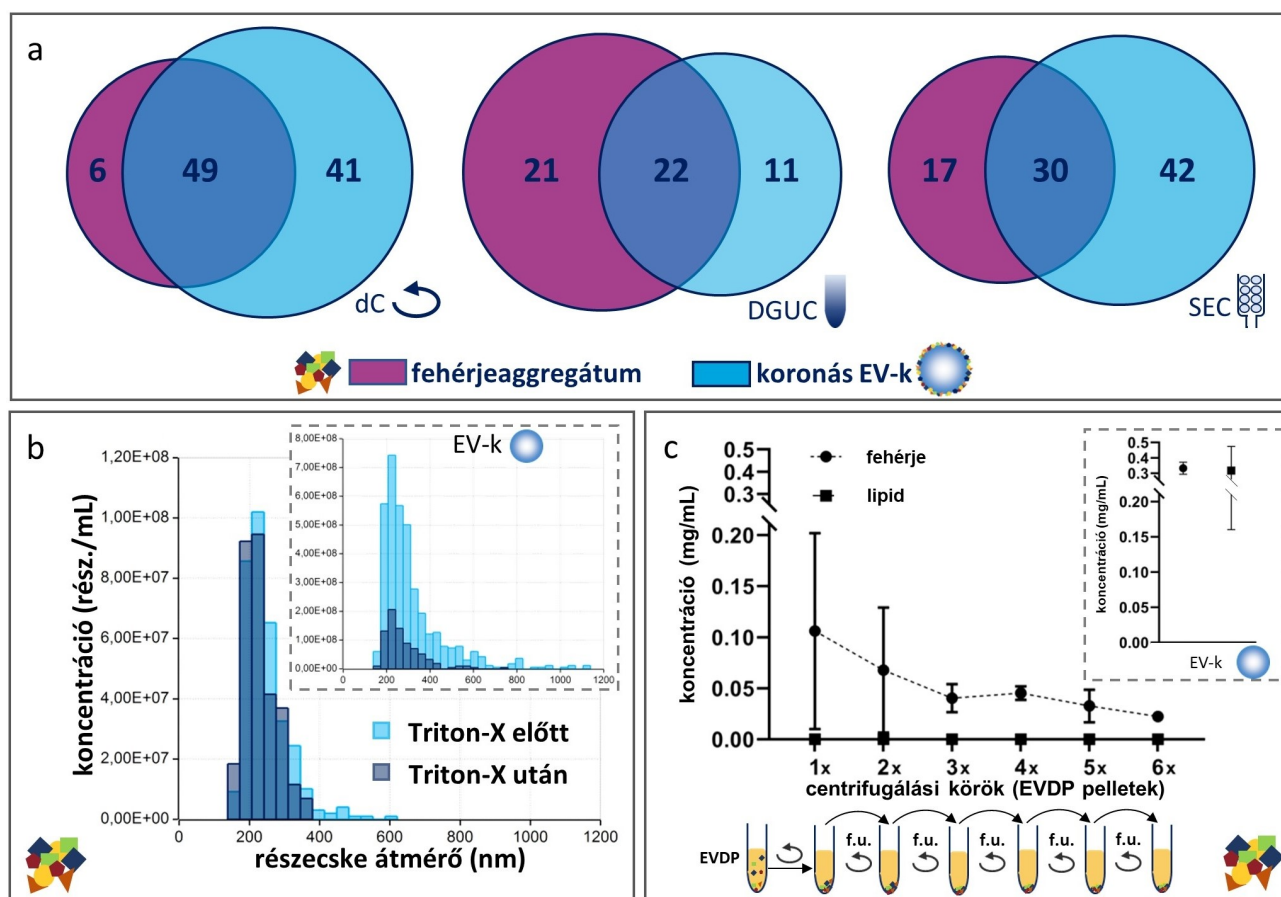
A munkánk egyik váratlan eredménye az volt, hogy az EV-k hozzáadása nélkül vizsgált EVDP minták EV-kkel azonos módon kinyert „izolátumaiban” (legyen az dC, DGUC, vagy SEC) igen nagy számú fehérjét azonosítottunk, melyek ráadásul nagymértékben átfedtek a koronafehérjék halmazával (5/a ábra). Az így pelletált képletek TRPS (Tunable Sensitive Pulse Sensing) alapján valóban a mi közepes EV-ink mérettartományába estek, azonban membrándetergens hozzáadására rezisztensek voltak (5/b ábra). A mintákat további sorozatos dC-nek alávetve és újra-meg-újra mérve a pelletek fehérje, illetve lipid tartalmát, míg lipideket már az első kör után sem tudtunk kimutatni a pelletekben, még a 6. kör centrifugálást követően is szignifikáns mennyiségű fehérje pelletálódott a mintákból (5/c ábra). Ez rámutat arra, hogy önmagában a sorozatos dC nem oldja meg a fehérjeaggregátumok eltávolítását a mintáinkból, és elképzelhető, hogy magával a centrifugálással is új aggregátumok kialakulását idéztük elő.



4. ábra. EV-depletált plazmamintákban inkubált EV-k konfokális mikroszkópiás felvételei. Vybrant DiO-jelölt THP1 sejtvonal-eredetű naszcens közepes méretű EV-k egészséges vérplazmában inkubálva, majd két mosást követően anti-fibrinogén α -lánc egér, illetve anti-komplement C3 nyúl primer antitesttel, illetve Alexa 647 anti-egér és Alexa 594 anti-nyúl szekunder antitesttel jelölve. **(a):** közepes méretű EV; **(b):** EV foltos komplement C3 koronával; **(c):** EV-k foltos fibrinogén koronával; **(d):** EV foltos fibrinogén és komplement C3 koronával, valamint C3 aggregátummal; **(e):** EV fibrinogén aggregátummal; **(f):** EV foltos fibrinogén és komplement C3 koronával és fibrinogén aggregátummal; **(g):** EV-k fibrinogén és C3 aggregátumokkal; **(h):** C3 és fibrinogén aggregátumok; **(i):** sematikus illusztráció a különféle kapcsolatokról.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy elsőként mutattunk be közvetlen bizonyítékot arra, hogy hasonlóképp a mesterséges NP-khoz és a vírusokhoz, az EV-k felszínén is kialakul fehérjekorona

biológiai közegekben. Amellett, hogy megfigyelhetőek voltak egyéni eltérések a koronafehérjék összetételében, jelentős hasonlóságok is mutatkoztak a különféle emberektől származó fehérjekoronák között. A fehérje-fehérje interakciós térképünk alapján feltételezhető, hogy a fehérjekorona több rétegben alakul ki az EV-k felszínén, és legalábbis részben a kialakulásért elektrosztatikus kölcsönhatások is felelnek. Konfokális mikroszkópiával készült felvételeink felvetették, hogy a fehérjék nem csupán diffúz-foltos bevonatot képezve tapadhatnak az EV-k felszínéhez, hanem aggregátum-jellegű képletek formájában is. Felmerült, hogy ez a jelenség részben legalábbis a minták *in vitro* feldolgozása során jön létre, mivel magukban az EV-k hozzáadása nélkül vizsgált EVDP mintákban is tapasztaltunk ilyen fehérje aggregációra utaló jeleket.



5. ábra. Plazmafehérje-aggregátumok jellemzése. (a): A koronafehérjék és a fehérje-aggregátumok fehérjéinek átfedése a különféle izolálási technikák függvényében. **(b):** Reprezentatív TRPS hisztogramok a kétszer mosott, dC-vel pelletált EVDP mintákból 0,1% Triton-X detergenslízis előtt és után. Összehasonlításképpen a kis ábra mutatja a detergens hatását naszcens EV-k esetében. **(c):** Egészséges EVDP mintákat ($n=3$) sorozatosan centrifugáltunk (12.500 g, 40 perc), majd mosást követően meghatároztuk a pelletek fehérje és lipidkoncentrációját minden centrifugálási kört követően. Míg a lipidkoncentráció végig a kimutathatósági limit alatt volt, még a hatodik centrifugálási kört követően is tudtunk fehérjét kimutatni a pelletben. Összehasonlításként, a kis ábra naszcens EV minták ($n=3$) fehérje és lipidkoncentrációját mutatja be.

Eredményeink rámutattak arra is, hogy a korábban kontaminációként leírt, a minták nem kellőképpen tiszta kezelésével magyarázott fehérjék megjelenése a különféle EV-mintákban lehetséges, hogy valójában az EV-k szerves része, felszíni „tartozéka”. Ugyan a kutatásban relatív kis számú mintát vizsgáltunk, így a munka klinikai relevanciáját mértéktartással érdemes keresni, de az RA-s és egészséges mintákból az EV-kre tapadó fehérjék közt látott apró különbözőségeket felvethetik, hogy a fehérjekoronának szerepe lehet egyes betegségek kialakulásában, illetve kimutatásuk biomarkerként segítheti a betegségek korai felismerését.

Publikációnk megjelenése óta egy egészen új és szerteágazó az EV-k fehérjekoronájával foglalkozó terület bontakozott ki, számos ilyen témájú publikáció született, melyek alapján mindinkább egyértelműnek látszik, hogy az EV-korona megismerése egy újabb lépéssel közelebb vihet minket az EV-k sikeres terápiás, illetve diagnosztikus felhasználásához is [6,7].

A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikáció:

Tóth, E. Á., Turiák, L., Visnovitz, T., Cserép, C., Mázló, A., Sódar, B. W., Försönits, A. I., Petővári, G., Sebestyén, A., Komlósi, Z., Drahos, L., Kittel, Á., Nagy, G., Bácsi, A., Dénes, Á., Gho, Y. S., Szabó-Taylor, K. É., & Buzás, E. I. (2021). Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *Journal of extracellular vesicles*, 10(11), e12140.

Irodalomjegyzék:

Az ábrák és ábrafeliratok a disszertációmban bemutatott ábrák alapján készültek magyar nyelvre fordítva.

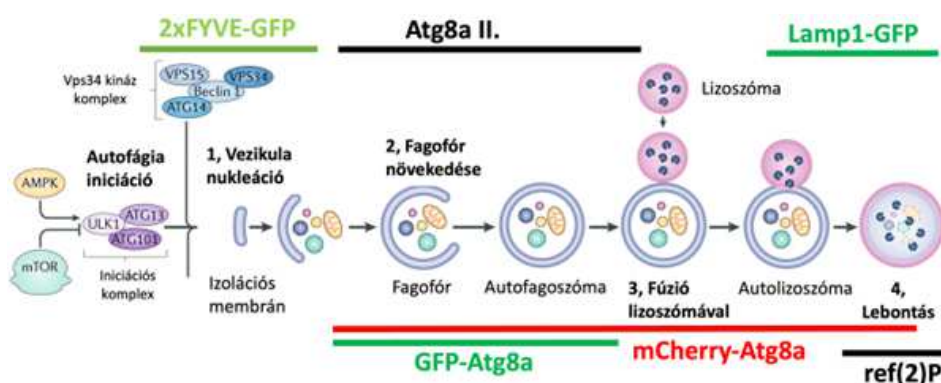
- [1] Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkinsop C, Bussolati B, Cai H, Di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu QL, Hill AF, Lenassi M, Lim SK, Mahoney MG, Mohanty S, Möller A, Nieuwland R, Ochiya T, Sahoo S, Torrecilhas AC, Zheng L, Zijlstra A, Abuelreich S, Bagabas R, Bergese P, Bridges EM, Brucalé M, Burger D, Carney RP, Cocucci E, Crescitelli R, Hanser E, Harris AL, Haughey NJ, Hendrix A, Ivanov AR, Jovanovic-Talisman T, Kruh-Garcia NA, Ku'ulei-Lyn Faustino V, Kyburz D, Lässer C, Lennon KM, Lötvald J, Maddox AL, Martens-Uzunova ES, Mizenko RR, Newman LA, Ridolfi A, Rohde E, Rojalin T, Rowland A, Saftics A, Sandau US, Saugstad JA, Shekari F, Swift S, Ter-Ovanesyan D, Tosar JP, Useckaite Z, Valle F, Varga Z, van der Pol E, van Herwijnen MJC, Wauben MHM, Wehman AM, Williams S, Zandrini A, Zimmerman AJ; MISEV Consortium; Théry C, Witwer KW. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of extracellular vesicles*, 13(2), e12404.
- [2] Gavas, S., Quazi, S., & Karpiński, T. M. (2021). Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale research letters*, 16(1), 173.
- [3] Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*, 11, 26.
- [4] Mirshafiee, V., Mahmoudi, M., Lou, K., Cheng, J., & Kraft, M. L. (2013). Protein corona significantly reduces active targeting yield. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 49(25), 2557–2559.
- [5] Ezzat K, Pernemalm M, Pålsson S, Roberts TC, Järver P, Dondalska A, Bestas B, Sobkowiak MJ, Levänen B, Sköld M, Thompson EA, Saher O, Kari OK, Lajunen T, Sverremark Ekström E, Nilsson C, Ishchenko Y, Malm T, Wood MJA, Power UF, Masich S, Lindén A, Sandberg JK, Lehtiö J, Spetz AL, El Andaloussi S. (2019). The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation. *Nature communications*, 10(1), 2331.
- [6] Buzas E. I. (2022). Opportunities and challenges in studying the extracellular vesicle corona. *Nature cell biology*, 24(9), 1322–1325.
- [7] Ónal Acet, B., Gül, D., Stauber, R. H., Odabaşı, M., & Acet, Ö. (2024). A Review for Uncovering the "Protein-Nanoparticle Alliance": Implications of the Protein Corona for Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 14(10), 823.

Az autofág kapacitás életkorfüggő szabályozása *Drosophila Melanogaster*ben

Szinyákovics Janka

Eötvös Lorand Tudományegyetem,
Biológia Doktori Iskola, Genetika Program
e-mail: szinyakovics.janka@gmail.com
témavezető: Dr. Vellai Tibor

Az autofágia (sejtes önmérsztés) egy lizoszómális lebontási útvonal az eukarióta sejtekben, amely a citotoxikus komponensek lebontásán keresztül sejtvédő mechanizmusként szolgál. A lizoszómával történő kapcsolódás alapján az autofágia három fő típusát különböztetjük meg: mikroautofágia, chaperone-közvetített autofágia és makroautofágia. A makroautofágia a legintenzívebben tanulmányozott folyamat, amely evolúciósan konzervált élesztőtől emlősökig. A makroautofágia (továbbiakban, mint autofágia fogom említeni) során a citoplazmában egy kettős membránnal rendelkező fagofór formálódik, amely körbeveszi a citoplazma egy részletét, körülhatárolva a lebontásra kijelölt komponenseket [1]. Záródásával jön létre az autofagoszóma, amely később lizoszómával fuzionálva létrehozza az autolizoszómát. A lizoszómából származó savas hidrolázok lebontják az autofagoszóma belső membránját és a körülzárt citoplazmatikus alkotókat (1. ábra). Az autofágia kapacitása azonban az élettartam előrehaladtával fokozatosan csökken. Ez a változás hozzájárulhat a különböző citotoxikus (pl. oxidálódott, letekeredett, oligomerizálódott vagy aggregálódott fehérjék) és felesleges sejtalkotók felhalmozódásához, amelyek a sejtek funkcióképtelenségét, végül a pusztulását okozhatja. Modellszervezeteken végzett kísérletek alapján a lecsökkent vagy hibásan működő autofágiát összefüggésbe hozták számos időskori betegséggel (pl. rák, neurodegeneratív elváltozások, szöveti atrófia és fibrózis, és immundeficienciák), míg az autofágia stimulációja erős öregedésgátló hatással rendelkezik [2,3].

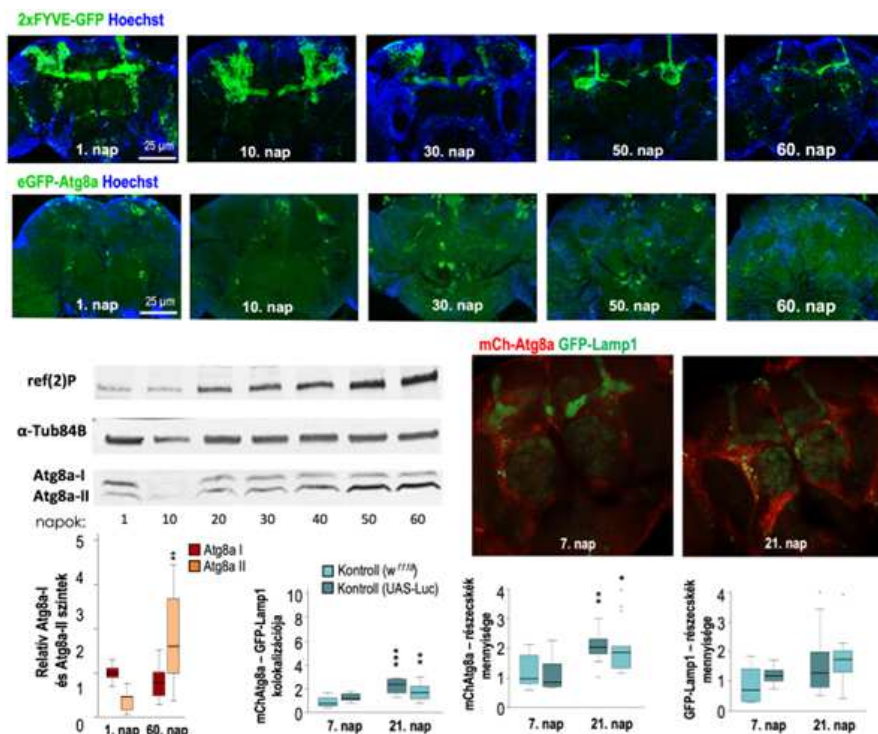


1. ábra. Makroautofágia folyamata a kutatáshoz használt autofág markerekkel. Az autofágia egyik kulcs markere az Atg8a fehérje. Két izoformája létezik a szolubilis Atg8a-I és a membránkötött Atg8a-II. Western blot során a kettő arányából nyomon követhető az autofág flux. Az Atg8a-II, a fagofór membránjához horgonyozódik, végig kísérve az autofágia folyamatát, lebontása az autolizoszómában történik. A fluoreszcens mCherry-jelölés az összes autofág struktúrát jelöli, míg a GFP érzékenyebb a lizoszóma lumenében uralkodó savas pH-ra, így hamar elveszíti fluoreszcenciáját. A Ref(2)P fehérje az autofágia szubsztrátja, mennyiségi változása ellentétesen korreál az autofág lebontás mértékével. A Lamp1 lizoszóma specifikus marker, mely ko-lokalizációs vizsgálatok során alkalmaztunk a lizoszóma és autolizoszómák jelöléséhez.

Az autofág lebontás sérülése leginkább a posztmitotikus sejtekben kritikus (pl. neuronokban), ugyanis ezek a sejtek nem képesek sejtosztódás révén kihígítani a citoplazmájukban

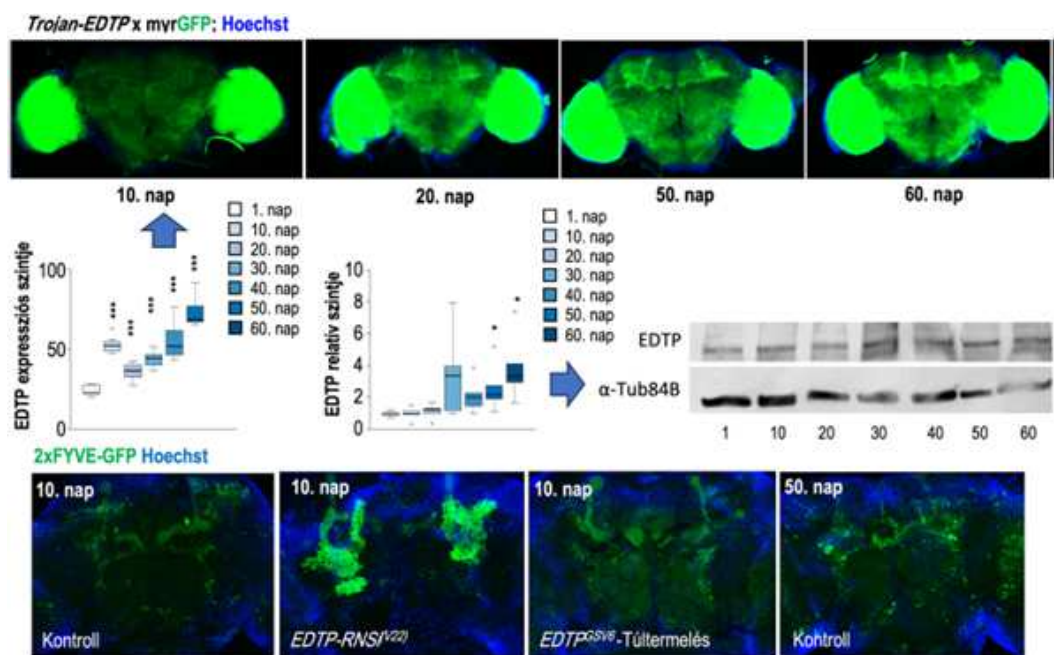
felhalmozódott molekuláris károsodásokat, valamint az elpusztult sejtek pótlására nincs lehetőség. Számos neurodegeneratív betegség jellemzője a fehérje aggregátumok képződése neuronokban, amelyek különböző idegrendszeri diszfunkciókhoz vezethetnek. Az öregkori neurodegeneratív betegségek potenciális kezelési módja lehet az autofágia aktivitásának fokozása idősebb életkorban. Kiemelt orvosbiológiai jelentősége ellenére azonban továbbra is feltáratlan maradt az autofágia kapacitás életkorfüggő hanyatlásának molekuláris háttere.

A doktori munkám fókuszába egy autofágia gátló fehérje az EDTP (*egg-derived tyrosine phosphatase*) került, amely miotubularin-szerű foszfatáz lévén képes gátolni az autofágia kezdeti lépését a vezikula nukleációt. Vezikula nukleáció során a Vps34 kináz-komplex PI3P jelöléssel látja el az omegaszóma membránját, ezzel autofág útvonalra terelve azt. Az EDTP PI3P-ből képes PI-t létrehozni, ezzel gátolva az autofágia kezdeti lépését [4]. Az autofágia útvonal konzervált a különböző állati fajokban ecetmuslicától (*Drosophila melanogaster*) emberig, így az autofágia tanulmányozása ecetmuslicában értékes betekintést nyújthat az autofágia emberben zajló mechanizmusaira, így kísérleteimet az ecetmuslica modellőlényen végeztem el. Tanulmányoztam az EDTP kifejeződését és szerepét az ecetmuslica központi idegrendszerében a felnőtt életkor során. Továbbá szerettem volna feltárni az öregedés során leírt autofág-kapacitás progresszív csökkenését az eddigieknél részletesebben, több mérési pont és módszer alkalmazásával.



2. ábra. Az élettartam során az autofágia kapacitás korai és késői szakaszai is sérülnek. Fluoreszcens mikroszkópos felvételeken (felső két kép sor) 2xFYVE-GFP, eGFP-Atg8a pozitív struktúrák láthatóak különböző korú állatokban. Western blot analízis során különböző korú white- állatok fejéből származnak a fehérje minták. A 2xFYVE-GFP a fagofórokat, az eGFP-Atg8a a fagofórt és autofagoszómaikat, míg a Ref(2)P az autofág lebontást jelöli. A 2xFYVE-GFP csökkenése (kevesebb fagofór képződése) figyelhető meg az életkor előrehaladtával. Az életkor előrehaladtával megnőtt a eGFP-Atg8a által jelölt struktúrák száma, vagyis több autofagoszóma képződik idősebb állatokban. A Western blot során tapasztalt Ref(2)P mennyiségének növekedése az autofág lebontás romlására utal. Az Atg8a esetében az Atg8a-I forma nem változott az életkor előrehaladtával, azonban az Atg8a-II izoforma életkor-függő növekedését figyelhettük meg. Így a fluoreszcens mikroszkópia által nyert eredményekhez hasonló adatokat kaptunk; az autofagoszómaik belátartalma nem tudott lebomlani. Ko-lokalizációs vizsgálat során az mCherry-Atg8a (autofág struktúrák, piros) és GFP-Lamp1 (lizoszóma, zöld) riporter rendszerek együttes lokalizációját láthatjuk 7 és 21 napos állatokban. Idősebb állatokban megnőtt az Atg8a- és Lamp1-pozitív struktúrák mennyisége és a két marker ko-lokalizációja. Ezen eredmény alapján megállapítható, hogy az autofagoszóma képes fuzionálni egy lizoszómával.

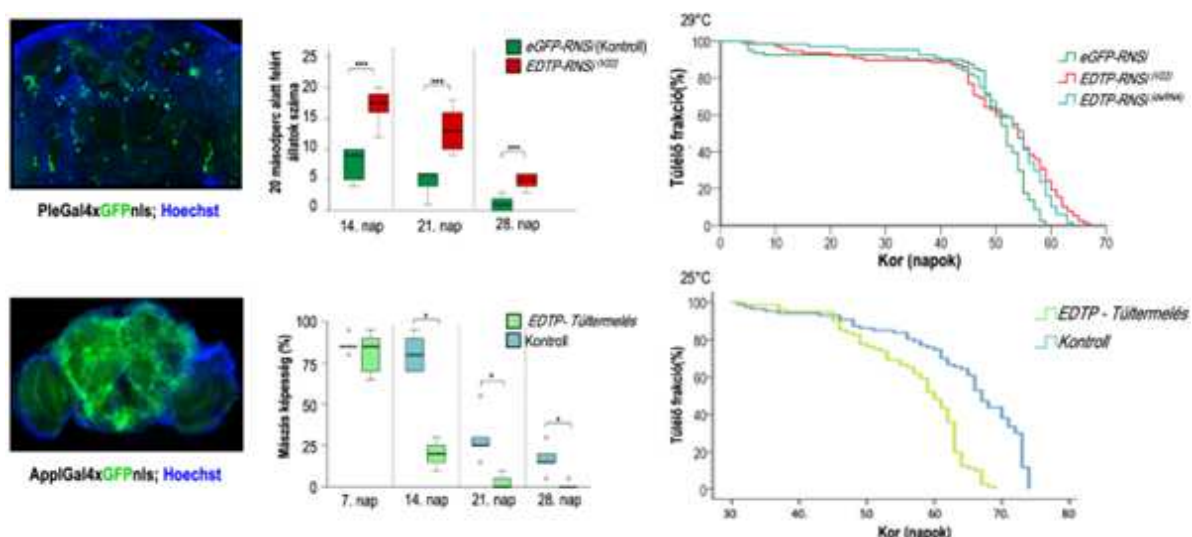
Ahhoz, hogy jobban megértsük, miért csökken az autofágia kapacitása az öregedés során, először a folyamat aktivitását tanulmányoztam különböző felnőtt életszakaszokban. Fluoreszcens mikroszkópia segítségével autofág markerekkel (2xFYVE-GFP, anti-Atg5) kapott eredmények rámutattak arra, hogy az öregedés során csökken az idegrendszerben a fagofór membrán képződése, vagyis az autofágia korai szakasza gátlődik idősebb állatokban (1. és 2. ábra). Az Atg8a és Ref(2)P markerek tanulmányozásával kimutattam, hogy az autofágia későbbi (Atg8 lipidizációját követő) lépései is gátlődnek idős állatokban. Atg8a és Lamp1 fehérjék kollokalizációs vizsgálata felfedte, hogy az említett probléma nem az autofagoszóma és lizoszóma sikertelen fúziójából ered (1. és 2. ábra). Feltehetően az elégtelen lebontás (kevés hidroláz enzim, nem megfelelő pH) okozhatja a problémát. Vagyis nem csupán az autofágia kezdeti lépései, de az autofág lebontás (késői szakasz) is sérül idős életkorban.



3. ábra. Öregedés során megfigyelhető az EDTP expressziójának növekedése. Felső fluoreszcens felvételek különböző korú Trojan-EDTPxmyrGFP állatok protocerebrum-áról készültek. Az állatokban a GFP riporter expressziója megegyezik az EDTP expressziós szintjével és mintázatával. Western blot gélkép EDTP fehérje szintjének vizsgálatáról az életkor előre haladtával. Belső háztartási kontrollként az α -Tub84B fehérje szolgált. Az alsó fluoreszcens képeken kontroll, EDTP csendesített és EDTP túltermeltetett háttérben a 2xFYVE-GFP pozitív struktúrákról készültek fiatal és idős állatokban. Míg az EDTP csendesítése megnöveli, az EDTP túltermeltetése csökkenti a 2xFYVE-GFP pozitív struktúrák mennyiségét, vagyis az EDTP idegrendszerben is képes gátolni a vezikula nukleációt.

Az autofágia kapacitásának életkor-függő hanyatlásához hozzájárulhat a miotubularin foszfatáz EDTP génjének az élettartam során megfigyelhető fokozatosan növekvő expressziója (3. ábra). Eredményeim bizonyították, hogy az EDTP zsrítesthez hasonlóan az idegrendszerben is képes negatívan szabályozni az autofágia aktivitását. Autofág markerek (Atg8a, Ref(2)P, Lamp1) tanulmányozása fényt derített arra is, hogy az EDTP képes az Atg8a lipidizációt követően is gátolni az autofágiát. Irodalmi adatok és eredményeim alapján elmondható, hogy az EDTP/MTMR14 lipid foszfatázok gátolják az autofágiát a vezikula nukleáció lépésénél és az Atg8a/LC3 lipidizációját követően [4]. Ezek alapján feltételezhető, hogy az MTMR14-nek az EDTP-hez hasonlóan a lizoszomális lebontásban is van szerepe. Együttműködő partnereink kimutatták, hogy az MTMR14 expressziós szintje is növekszik az élettartam során. Tehát az autofágia gátlás felerősödése az életkor előrehaladtával az EDTP/MTMR14 által konzerváltságot mutat Drosophilában, emberben és kutyákban.

Kutatásom célja olyan autofágia szabályozó pontok keresése, melyek alkalmasak az autofágia folyamatát specifikusabban (más sejtes folyamatot nem befolyásolva) indukálni. Az EDTP az autofágiát közvetlenül a vezikula nukleáció lépésénél gátolja, ezáltal alkalmas gyógyszer-célpont lehet az autofágia farmakológiai indukálására. Dopaminerg neuronokban végzett EDTP csendesítés növelte az állatok élettartamát a kontroll csoportokhoz képest. Dopaminerg neuronokban csendesített EDTP pozitív hatással volt az állatok mászás és túlélési képességére, míg az EDTP túltermeltetés rontotta az állatok mozgását és lerövidült a várható élettartamuk. Egy másik kutatócsoport szintén élettartam növekedést ért el az EDTP csendesítésével gliasejtekben. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az EDTP gátlása dopaminerg neuronokon kívül az idegrendszer más sejtjeiben is pozitív hatású lehet az állat túlélésében. Egy másik autofágiát negatívan szabályozó fehérjéről, a Rubicon-ról kimutatták *C. elegans*, *Drosophila* és egér szövetekben, hogy az életkor előrehaladtával mennyisége fokozatosan növekszik [5]. A Rubicon gén kiütése szintén növelte az állatok élettartamát *C. elegans* és *Drosophila* modellekben. A Vps34 kinázt tartalmazó komplexnek tehát fontos szerepe van az öregedési folyamat szabályozásában.



4. ábra. Az EDTP idegrendszeri gátlása meghosszabbítja az állatok élettartamát. A képeken a Ple-Gal4 (felső) és Appl-Gal4 (alsó) driver expressziós mintázata látható, előbbi kizárólag dopaminerg neuronokban, míg utóbbi a teljes protocerebrumban kifejeződik. Középen látható a negatív geotaxis teszt eredményei. Az EDTP csendesítése dopaminerg neuronokban (középen felül) javítja, az EDTP túltermelés (középen alul) pedig lerontja az állatok mászás képességét a kontroll állatokhoz képest. Jobb oldalon EDTP csendesített és túltermeltetett állatok élettartam görbéje látható. Dopaminerg neuronokban mindkét EDTP csendesítés szignifikánsan megnövelte az állatok élettartamát (jobb felső). A teljes protocerebrumban EDTP túltermeltetett állatok rövidebb ideig éltek a kontroll csoportnál (jobb alsó). A fenti ábrára a dolgozatban található legszignifikánsabb mászás és élettartam görbék kerültek.

A dolgozat alapjául szolgáló tudományos értekezések

Kovács, T., Szinyákovics, J., Billes, V., Murányi, G., Varga, V. B., Bjelik, A., Légrádi, Á., Szabó, M., Sándor, S., Kubinyi, E., Szekeres-Paracky, C., Szocsics, P., Lőke, J., Mulder, J., Gulyás, B., Renner, É., Palkovits, M., Gulya, K., Maglóczy, Z., & Vellai, T. (2022). A conserved MTMR lipid phosphatase increasingly suppresses autophagy in brain neurons during aging. *Scientific Reports*, **12(1)**: 1–18.

Komlós, M., Szinyákovics, J., Falcsik, G., Sigmond, T., Jezsó, B., Vellai, T., & Kovács, T. (2023). The Small-Molecule Enhancers of Autophagy AUTEN-67 and -99 Delay Ageing in *Drosophila* Striated Muscle Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **24(9)**: 8100.

Irodalomjegyzék

- [1] Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451(7182)**: 1069–1075.
- [2] Pyo, J. O., Yoo, S. M., Ahn, H. H., Nah, J., Hong, S. H., Kam, T. I., Jung, S., & Jung, Y. K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nature Communications*, **4(1)**: 1–9.
- [3] Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L., & Müller, F. (2003). Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, **426(6967)**: 620.
- [4] Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R. A., Tosch, V., Delgado, M. A., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., & Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *The EMBO Journal* (2009), **28(15)**: 2244–2258.
- [5] Nakamura, S., Oba, M., Suzuki, M., Takahashi, A., Yamamuro, T., Fujiwara, M., Ikenaka, K., Minami, S., Tabata, N., Yamamoto, K., Kubo, S., Tokumura, A., Akamatsu, K., Miyazaki, Y., Kawabata, T., Hamasaki, M., Fukui, K., Sango, K., Watanabe, Y., ... Yoshimori, T. (2019). Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nature Communications*, **10(1)**.



Beszámoló a Magyar Biokémiai Egyesület vándorgyűléséről Budapest, 2024. augusztus 29-31.

Vas Virág

HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont,
Molekuláris Élettudományi Intézet

A molekuláris biológiai kutatási területen dolgozó kollégák számára fontos eseményt, az MBKE vándorgyűlést idén az ELTE kampuszán, Budapesten rendezték meg. A TTK Északi tömbjében, a Gömb aula bőséges helyet biztosított a megbeszéléseknek, a posztereknek, fogadásoknak, valamint a cégek kiállításainak is. A konferencia elsődleges célja az volt, hogy fórumot teremtsen a biokémia, a szerkezetbiológia, a sejtbiológia, a fejlődésbiológia, a klasszikus és molekuláris genetika, az emberi betegségek molekuláris biológiája, a rendszerbiológia, a szintetikus biológia, biotechnológia, a genomika, a bioinformatika és a transzlációs medicina területeivel foglalkozó kutatók számára.

A csütörtök délutáni megnyitón Buday László professzor, a MBKE elnöke köszöntötte a konferencia 164 regisztrált résztvevőjét. A háromnapos program alatt 2 plenáris előadással, 2

támogatói céges előadással, 26 tudományos előadással és 66 poszterrel ismerkedhettek meg a résztvevők. Külön köszönet az arany fokozatú támogatóknak, a Kromat Kft.-nek (<https://kromat.hu>) és a Molnár-Institute-nak (<https://molnar-institute.com>), valamint az ezüst fokozatú támogatóknak, a ThermoFisher Scientific-nek (www.thermofisher.com) a közreműködésért. Köszönjük a kiállító cégek kitelepülését: Biocenter Kft., Bio-Science Kft., Kvalitex Kft., Eppendorf, Merck Life Science Kft.



1. kép. Tankó Béla életműdíj átadása. Balról jobbra a képen: Buday László, Keserű György Miklós, Lontay Beáta. Fotó: Thaler Tamás (Diamond Congress Kft.).



2. kép. Bio-Science díj átadása Szabó Áronnak a Bio-Science Kft. ügyvezetőjétől Tátrai Ágnesztől. Fotó: Thaler Tamás (Diamond Congress Kft.).

Az első plenáris előadást Keserű György Miklós professzor tartotta, „Mapping protein-protein interaction surfaces by photoactivable molecular fragments” címmel, majd átvehette az Egyesület legrangosabb tudományos kitüntetését, a Tankó Béla díjat.

A konferencián átadták a Bio-Science díjat is, mely elismerés az elmúlt évben egy rangos nemzetközi folyóiratban közzétett jelentős molekuláris biológiai témájú publikáció szerzői számára volt kiírva. A nyertes cikk címe: „LC3-associated phagocytosis promotes glial degradation of axon debris after injury in *Drosophila* models” és szerzőjét Szabó Áront jutalmazták a díjjal.



3. kép. Bemutatkozik a Junior HBS csapata. Balról jobbra a képen: Sánta Anna, Nagy-Kanta Eszter, László Loretta és Réthi-Nagy Zsuzsánna. Fotó: Thaler Tamás (Diamond Congress Kft).

A péntek délelőttöt Tózsér József professzor „Structure, function, inhibition and resistance development of sars-cov-2 main protease (MPRO). What is common with retroviral proteases?” című felkért előadása kezdte.

Ezután a MBKE vándorgyűlések hagyományainak megfelelően szombat délig, a szekció előadások az alábbi témakörökbe rendezve zajlottak, szekciónként négy öt előadással:

- *Jelátvitel, sejt-sejt kommunikáció, sejthalál és differenciáció* szekció elnöke Lipinszki Zoltán,
- *Génkifejeződés szabályozása, szabályozó RNS-ek, epigenetika* szekció elnöke Kovács Mihály,
- *Fehérjeszerkezet, funkció és modellezés* szekció elnöke Erdődi Ferenc
- *Bioinformatika, szintetikus biológia, genom szerkesztési technikák, biotechnológia* szekció elnöke Ivics Zoltán,
- *Betegségek és terápiájuk molekuláris alapjai, őssejtek, immunitás és gyulladásozó folyamatok* szekció elnöke Izsvák Zsuzsanna,
- *Transzlációs medicina, orvosi biokémia, gyógyszerfejlesztés* szekció elnöke Vereb György

A MBKE fiatal tagjainak külön szekció alakult az Egyesületen belül, a JuniorHBS tevékenységét Réthi-Nagy Zsuzsánna mutatta be a konferencián. A Junior HBS tagjainak milánói útbeszámolóit lapszámunkban közöljük.

Az idei évben a gála vacsora az Öböl Ház rendezvényközpontban a Kopaszi-gáton került megrendezésre. A MBKE vándorgyűlések egyik fénypontja, amikor gazdára találtak a fiatalok között a poszter díjak.

Idén

1. helyezett lett **Kovács Dávid** posztere: „Triglyceride acyl length drives lipolysis and adipocyte metabolism”,
2. helyezett lett **Nagy-Kanta Eszter** posztere: „Structural investigation of the multivalent complex of the GKAP scaffold and LC8 hub protein”,
3. helyezett lett **Ammar Darwish** posztere: „Silver-lipid nanoparticles shaped for targeted tumor therapy”, és **Jezsó Bálint** posztere: „Phase separation and cytoplasmic granulation by single-stranded DNA binding protein 1 (SSB1) delineate new mechanisms of cellular stress response”.

Ezúton is gratulálunk a díjazottaknak és várjuk tudományos írásaikat a BIODÉKA hasábjain!



4. kép. Poszter díj helyezettei. Balról jobbra a képen: Kovács Dávid, Nagy-Kanta Eszter, Ammar Darwish, Jezsó Bálint. Fotó: Thaler Tamás (Diamond Congress Kft).



5. kép. A BIODÉKA standja a vándorgyűlésen. Balról jobbra a képen: Alexa Anita, Vas Virág a szerkesztőségéből és Zámbo Boglárka, Gógl Gergő szerzőink. Fotó: Thaler Tamás (Diamond Congress Kft).

Végezetül megosztunk egy kis kulisszatitkot: a vándorgyűlésen volt alkalmunk mostani számunk tudományos cikkének szerzőivel is, Zámbó Boglárkával és Gógl Gergővel is találkozni, majd a cikkről egyeztetni.

A konferencia minden részletét és résztvevőjét Thaler Tamás fotós örökítette meg, és a képeket a konferencia honlapjára: <https://www.hbs-conference.hu/2024> fel is töltötte. Köszönjük az alapos dokumentálást!

A rendezvény lebonyolításában az immár 30 éves Dimanod Congress Kft. munkatársai segítették a szervezőket, kitűnő hozzáértéssel.

A konferencia szervezőbizottsága (Buday László, Kovács Mihály, Lontay Beáta, Lipinszki Zoltán, Micsonai András, Vas Virág) nevében ezúton köszönjük az ELTE TTK és a HUN-REN TTK hozzájárulását a konferencia megszervezéséhez nyújtott támogatásukért.

Találkozunk legközelebb a 2025 márciusában megrendezésre kerülő *Hungarian Molecular Life Sciences konferencián* Egerben!



48th FEBS Congress „Mining biochemistry for human health and well-being”

Lipinszki Zoltán

FEBS Member Society Representative
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet
<https://2024.febscongress.org/>

Az idei, sorrendben 23. FEBS Young Scientists' Forum (június 26-29.) és a 48. FEBS Kongresszus (június 29 - július 3.) Lombardia gazdasági és kulturális fővárosában, Milánóban került megrendezésre. A kongresszust szervező Olasz Biokémiai és Molekuláris Biológiai Társaság méltó helyszínt választott a rendezvény rangjához. A résztvevők nemcsak a gazdag tudományos és tudománynpszerűsítő programokon vehettek részt, hanem lehetőségük nyílt felfedezni Milánó építészeti remekeit, galériáit és múzeumait, valamint gasztronómiai és kulturális élményekkel is gazdagodhattak. A konferenciának az Allianz MiCo központ adott otthont, amely tágas tereivel és modern előadótermeivel ideális környezetet biztosított a poszterprezentációk, a FEBS-aktivitások, a kiállítói standok és a számos, párhuzamosan zajló szekcióelőadás zavartalan lebonyolításához.

Az idei kongresszuson az általános biotudományi szekciókon túl nagy hangsúlyt kaptak a korunk problémáit érintő témák is, mint például a környezeti biotechnológia, valamint az emberi jólétet, egészséget és betegségeket érintő biotechnológiai kihívások. A tudományos program öt helyszínen zajlott. A kiállítócsarnokban tekinthettük meg a posztereket, három napra lebontva, valamint itt kaptak helyet a FEBS standok is, ahol megismerkedhettünk a FEBS bizottságaival, aktivitásaival, játékos vetélkedőivel, a fiatal kutatók szekciójának tevékenységeivel, illetve a FEBS folyóiratainak (The FEBS Journal, FEBS OpenBio, Molecular Oncology és FEBS Letters) képviselőivel. A kongresszus eseményeit mobilalkalmazáson keresztül lehetett követni, amely rendkívül hasznos és felhasználóbarát segítőtárs volt a résztvevők számára.

Az előadások egy nagy előadóteremben és négy kisebb teremben zajlottak párhuzamosan. Az

öt nap alatt 15 plenáris előadást hallgathattunk meg, amelyek többsége valamilyen díjhoz vagy kitüntetéshez kapcsolódott, és minden esetben a tématerület legkiválóbb kutatói tartották. Emellett mintegy 30 szimpózium és 19 speciális szekció keretében 85 meghívott kutató előadását követhettük nyomon. Az 1560 beérkezett összefoglalóból kiválasztott 68 rövid előadás (15 perc) és 71 villámelőadás (3 perc) során a kutatók bemutathatták csoportjuk vagy saját munkájuk eredményeit. Emellett mintegy 40 előadást hallgathattunk meg különböző tudományos és tudományhoz kapcsolódó témákban a speciális szekciókban, mint például a „Tudomány és társadalom”, „Új kutatási lehetőségek” és a „Tudomány az utcán”. A konferencián 1400 poszter került kiállításra, amelyek közül a FEBS folyóiratainak szakmai zsűrije kiválasztotta és díjazta a legjobbkat.

A kongresszuson 2000 fő vett részt, több mint 60 országból, ami jelentős növekedést jelent az előző évi részvételi számokhoz képest. Magyarországot és a Magyar Biokémiai Egyesületet (MBKE) 30 fő képviselte, ami elmaradt a korábbi évek átlagától. A magyar résztvevők közül hatan felvételt nyertek a kongresszust megelőző háromnapos Young Scientists' Forumra (YSF) is (Onhausz Benita, Hana Kaci, Ungvári Ádám, Keller Ilka, Nagy Nikolett és Nagy-Kanta Eszter), amelyen 28 ország 106 fiatal kutatója vett részt. A magyar kutatóhelyekről érkező résztvevők közül 23-an poszter formájában mutatták be munkájukat, Hana Kaci (HUN-REN TTK) és Nagy-Kanta Eszter (PPKE) villámelőadást, Nagy Nikolett (HUN-REN TTK) és Nguyen Huu Huong (DE) pedig rövid előadást tartottak. Az MBKE által felterjesztett kutatók közül Kovács Mihály (ELTE, TTK), az MBKE alelnöke, meghívott előadóként kiváló prezentációval ismertette kutatócsoportja eredményeit, és emellett a szekció társelnökéként is szerepelt. A magyarok részvétele az idei kongresszuson bár szerényebb volt a korábbi évekhez képest, mégis jelentős és aktív maradt.



1. ábra. Balról jobbra: Miguel de La Rosa (FEBS Főtitkár), Fésüs László (DE), Joan J. Guinovart (IRB, Barcelona) és Jerka Dumić (a FEBS Integration and Networking Committee elnöke) az Israel Pecht-díj átadásán a 48. FEBS Kongresszuson Milánóban (a FEBS engedélyével).

Kiemelendő, hogy a FEBS egyik legrangosabb kitüntetését, az Israel Pecht-díjat elsőként vehette át Fésüs László professzor (DE) és Joan J. Guinovart professzor (IRB Barcelona) a kongresszus nyitóünnepségén (1. ábra). Ez az új díj, amelyet a FEBS 60. évfordulója alkalmából alapítottak,

olyan kutatók elismerésére szolgál, akik kiemelkedő erőfeszítéseikkel és elkötelezettségükkel jelentős mértékben hozzájárultak a FEBS tagszervezeteinek tevékenységéhez, valamint elősegítették a FEBS-szel való hatékony együttműködést. Fésüs professzort a Magyar Biokémiai Egyesület terjesztette fel a díjra. A magyarok elismerése azonban itt nem ért véget: idén Vértessy G. Beáta professzor kapta a FEBS Diplôme d'Honneur díját (2. ábra). Ezt a rangos elismerést a FEBS vezetősége olyan kiváló biokémikusoknak vagy molekuláris biológusoknak ítéli oda, akik kiemelkedő munkát végeztek a szervezet munkájában és elismertségének növelésében. Gratulálunk mindkét kitüntetett kollégánknak!

Beszámoló az MSR találkozóról:

A Kongresszus keretében megrendezésre került a FEBS tagszervezeteinek képviselőit (Member Society Representative, MSR) tömörítő zártkörű találkozó, amelyen 35 MSR vett részt. A találkozót Jerka Dumić, a FEBS Integrációs Bizottság elnöke koordinálta. Az idei évben, rendhagyó módon, a találkozó háromnaposra bővült, és számos érdekes feladat várt ránk. Az egyik újdonság az volt, hogy minden tagszervezetnek az egyesületét bemutató posztert kellett készítenie, majd ezt a posztert be kellett mutatnia a többi MSR-nek. Ez a kezdeményezés elérte a célját: konstruktív beszélgetések folytak a poszterek előtt, és az MSR-ek közelebbről is megismerhették egymás egyesületeinek működését, problémáit és kihívásait. Az MBKE poszterét Vas Virág, Réty Lilla és Takács Tamás készítette Szűcs Mária segítségével.



2. ábra. Vértessy G. Beáta 2024-ben, a milánói FEBS Kongresszuson vette át a Diplôme d'Honneur díjat Miguel de La Rosa-tól.

Az első MSR találkozón öt csoportra osztottak bennünket, és az MBKE a holland, olasz, izraeli, lett és litván csapathoz került. Első feladatunk az volt, hogy közösen megfogalmazzunk három olyan FEBS tevékenységet, amelyet hasznosnak ítélünk (például FEBS3+ találkozók, pályázatok, YSF), és három olyat, amelyet nehézkesnek vagy javítandónak tartunk (például bürokrácia, kommunikációs problémák, valamint pályázatok, amelyek gyakorlatilag elérhetetlenek a nem nyugat-európai országok számára). A FEBS arra volt kíváncsi, mely kezdeményezései működnek jól, és melyeken szükséges javítani. Ezt követően minden tagszervezet beszámolt arról, hogy mely tevékenységeiket emelnék ki, és melyeken javítanának. A legtöbb egyesület pozitívumként

említette a vándorgyűléseket, a fiatalok támogatását, az egyéb tudományos egyesületekkel való együttműködést, a FEBS3+ találkozók szervezését, valamint az egyesületi folyóiratok megjelenését. Ugyanakkor aggodalmukat fejezték ki a taglétszám csökkenése és a finanszírozási problémák miatt.

A második MSR meeting során ismét csoportokba rendeződve találkoztunk a FEBS Végrehajtó Bizottságának tagjaival, akiknek kérdéseket tehattünk fel. A Pénzügyi Bizottság részéről a Kincstárnok beszámolt arról, hogy míg az előző évben a FEBS bevételei teljes mértékben fedezték a szervezet tevékenységeit, az idei évben a csökkenő folyóirat-előfizetések, az open access terjedése és a predátor újságok megjelenése miatt a bevételek már csak az összköltségek 50%-át fedezik. Ezt úgy kívánják orvosolni, hogy a FEBS pénzt részvényekbe és más befektetési formákba helyezik, ugyanakkor várják a további javaslatokat is. Az Oktatási és Képzési Bizottság ismertette, hogy megalakították a FEBS Education and Training Academy-t és a FEBS Junior Section-t. Utóbbi vezetője, Irene Diaz-Moreno, külön kiemelte, hogy az MBKE Junior Szekciója az egyik legaktívabb és leghatékonyabb, és megdicsérte a tagok aktivitását mindennapi tevékenységeik során, valamint a YSF-en és a FEBS kongresszuson mutatott részvételükért. Ez különösen örömteli volt, mivel sok egyesület még nem is hallott a Junior Section nyújtotta lehetőségekről. Az Ösztöndíjbizottság bemutatta a FEBS pályázati rendszerét, kiemelve, hogy a Short Term Fellowship nagy népszerűségnek örvend, de sokan pályáznak a Summer Fellowship-re is (max. 3 hónap, 3500 EUR/hó), amelyhez nem feltétel a FEBS tagság. Az Africa Fellowship-re továbbra is kevés pályázat érkezik, főleg nem nyugat-európai országokból. Kiemelték továbbá az új Booster Fund-ot, amelyre fiatal, kutatócsoportot építő kollégák pályázhatnak, és 25.000 EUR támogatást nyerhetnek el. Végezetül bemutatták a PI-ok számára meghirdetett FEBS Excellence Award kiválósági támogatást (100.000 EUR). Ezzel kapcsolatban kisebb vita alakult ki, mivel többek szerint a nem nyugat-európai országok, ahol kevesebb az ERC-nyertes, sokkal kisebb eséllyel pályázhatnak. Nem biztos, hogy az ERC által támogatott kutatóknak ez a támogatás olyan nagy segítséget jelentene. A FEBS azonban határozottan állította, hogy örülnek annak, hogy ERC nyerteseket támogathatnak, és nem kíván változtatni a pályázati értékelésen. Ezután a Publikációs Bizottság aggodalmát fejezte ki a csökkenő árbevételek miatt, valamint attól tartanak, hogy a Wiley kiadó is visszaléphet a FEBS folyóiratok támogatásától. Felhívták az egyesületek figyelmét, hogy minél többen publikáljanak a FEBS folyóirataiban. Magyarországon erre ingyenes lehetőség is kínálkozik, mivel az EISZ program keretében kötött Open Access kvóták a Wiley kiadóra is kiterjednek, ami számos hazai kutatóintézetnek és egyetemnek biztosít költségmentes publikálási lehetőséget (bővebb információ itt: <https://eisz.mtak.hu/index.php/hu/open-access/open-access-megallapodasok.html>).

A harmadik MSR találkozón a FEBS folyóiratok szerkesztőbizottságával találkoztunk, akik bemutatták a folyóiratok profilját és az új publikációs formátumokat (például a FEBS OpenBio Research Protocol-t). Ez egy rövidebb találkozó volt, de az üzenet egyértelmű volt: publikáljunk a FEBS folyóirataiban! Érdekességként megjegyzendő, hogy bár a FEBS több alkalommal is felhívta a figyelmünket arra, hogy ne publikáljunk a „négybetűs” kiadó folyóirataiban, a kongresszuson ennek ellenére megjelent a kiadó standja, valamint szponzori támogatással is jelen voltak. Erről a FEBS nem kapott előzetes tájékoztatást, a konferenciaszervező céget pedig láthatóan nem zavarta a helyzet.

A Kongresszust követően tartotta meg a FEBS Council szokásos éves gyűlését, amelyen részt vett az MBKE elnöke, Buday László is. A Tanács többek között megválasztotta az új bizottsági tagokat, amelynek magyar vonatkozása, hogy Vértessy G. Beátát választotta meg a Pénzügyi Bizottság legújabb tagjának.

Végezetül tájékoztatom a tagságot, hogy a 2025. évi 49. FEBS Kongresszust (Bridging Continents to Advance Life Science) a Török Biokémiai Társaság szervezi Isztambulban, 2025. július 5-9. között, amelyre novembertől lehet jelentkezni (<https://2025.febscongress.org/>). Különösen felhívnam a fiatal kollégák figyelmét, hogy a kongresszust megelőző YSF-re 2024. december közepéig lehet pályázni (<https://2025.febscongress.org/ysf-applications>). A YSF kiváló lehetőséget biztosít PhD-hallgatóknak és kezdő posztdoktor kutatóknak, hogy részt vegyenek egy színvonalas tudományos fórumon, valamint az azt követő kongresszuson. A sikeres pályázók részvételi, szállás és utazási költségeit a FEBS finanszírozza.

A 2024. évi YSF és FEBS kongresszuson készült képek ezen a linken tekinthetők meg: <https://2024.febscongress.org/photo-galleries>

FEBS Young Scientists' Forum

Nagy-Kanta Eszter

Pázmány Péter Katolikus Egyetem,
Információs Technológiai és Bionikai Kar, Budapest
e-mail: nagy-kanta.eszter@itk.ppke.hu

A Fiatal Tudósok Fórumát (Young Scientists' Forum (YSF)) 2001 óta a FEBS Kongresszus előtti négy napban rendezik meg. Minden évben 100 PhD hallgató és fiatal posztdok jelentkezését fogadják el, nekik a szervezet a YSF és FEBS Kongresszus minden költségét szponzorálja (regisztráció díja + szállás, részben az utazás díja is). Az egyetlen „ára” ennek a nagyvonalú ajánlatnak, hogy minden résztvevő életében egyszer vehet részt ebben a programban.

A helyszín idén Pavia városa volt, Milánóhoz közel; az 1300-as években alapított egyetem falai között, különleges atmoszférában hallgathattuk az előadásokat és kóstolgathattuk az olasz kávékat és süteményeket. A környezetnek, a kis létszámnak és a szervezésnek köszönhetően valóban alkalom nyílt olyan inspiráló találkozásokra és beszélgetésekre, amik megalapozhatnak egy-egy hosszabb távú baráti vagy szakmai kapcsolatot.

A plenáris ülések előadói, kivétel nélkül, könnyen megközelíthetőek és megszólíthatóak voltak, és akár személyesebb, karrier úttal kapcsolatos kérdésekben is nyitottak voltak beszélgetésre. Az idén első alkalommal megszervezett mentor-program is ezt volt hivatott elősegíteni, ahol előzetes regisztráció után alkalmunk nyílt kötetlenül beszélgetni egy korábban FEBS Excellence díjat elnyert fiatal csoportvezetővel. Gyakorolhattuk az egyperces (ún. elevator pitch) bemutatkozás műfaját: minden résztvevőnek két percben kellett bemutatnia a poszterét a teljes közönség előtt a megszokott poszter szekciót megelőzően.

Az egyik legizgalmasabb programpont a négy szeminárium volt, ahol szenior, rutinos kutatók irányításával tömény összefoglalót kaptunk arról, hogy mi kerüljön bele minden labor jegyzőkönyvbe (a jó, a rossz és a csúf is!), hogy milyen szemüvegen keresztül érdemes önéletrajzot készíteni, hogy milyen praktikákat tudunk bevetni, amikor a 2000-es években született egyetemistákat oktatjuk, illetve hogy milyen sokkolóan magas arányban találhatóak nem megbízható cikkek a globális tudományos szakirodalomban, és mihez kezdhetünk ezekkel. Csupa olyan témát dolgoztunk fel gyakorlati példákon keresztül, ami önmagában is megért volna egy-egy napot. Mindenkinek a javára válhat az ott megszerzett tudás, akár az akadémiai szférában helyezkedik el hosszú távon, akár nem.

Az biztos, hogy ezt az „életben egyszer” megtapasztalható rendezvényt mindenkinek nagyon ajánlom, mindenki megtalálhatja benne azt, amiért érdemes részt venni, és amit kamatoztatni tud belőle a karrierje során.



A képen Réthi-Nagy Zsuzsánna az első, Nagy-Kanta Eszter az utolsó a sorban.

Élménybeszámoló a 2024-es FEBS kongresszusról

Réthy-Nagy Zsuzsanna

Magyar Molekuláris Kiválósági Központ (HCEMM), Szeged
e-mail: zsuzsanna.rethy-nagy@hcemm.eu

A FEBS Kongresszus minden évben egy kiemelkedő esemény a biokémiai és molekuláris biológiai kutatók számára. Idén Milánóban rendezték meg a kongresszust június 29 és július 3 között. Másodszer volt lehetőségem részt venni a FEBS éves kongresszusán, és idén sem bántam meg a részvételt. Mint a biokémia iránt elkötelezett kutató, izgatottan vártam, hogy részt vehessek ezen a rangos eseményen, amely új perspektívákat nyújtott kutatásaim számára. A kongresszus már a 48. alkalommal került megrendezésre, és minden alkalommal lenyűgöz az esemény sokszínűsége és nagysága (több, mint 2000 résztvevő regisztrált).

Hihetetlennek tartom, hogy a négy párhuzamosan zajló szekció valamelyikében ne találna az ember az érdeklődési köréhez közel álló tudományos előadást. Gyakran éreztem, hogy legszívesebben egyszerre két helyen lennék. A több száz előadás és poszter bemutató között járva ámulatba ejtett, milyen sokféle témával foglalkoznak a biokémia területén belül a kutatók. A szakmai beszámolókon túl a szervezők nagy hangsúlyt fektettek arra is, hogy bemutassák a FEBS munkásságát. Az érdeklődők előadásokat hallgathattak a kutatók számára elérhető karrier lehetőségekről, támogatásokról, pályázati, valamint a publikációs lehetőségekről. Hasznos tanácsokat kaptunk például arról is, hogyan tehetjük publikációinkat könnyen elérhetővé és érthetővé, vagy hogy milyen szempontokat érdemes figyelembe venni grafikus absztrakt készítése során.

Az idei rendezvény különleges volt, mert a FEBS idén, 2024-ben ünnepli fennállásának 60. évét. Ennek tiszteletére számos hagyományosan kiosztott rangos elismerés és díj átadása mellett új kezdeményezések is elindultak, például a Bio-art kép verseny, amire mikroszkópos fényképekkel lehetett nevezni, hogy „bemutassuk a szépséget a biológiai tudományok mögött”. A nyertes pályamunkát (címe: Yin és Yang emlődaganatban) Román Martí Díaz készítette, 500 euróval térhetett haza.

<https://www.febs.org/news/febs-60th-anniversary-bio-art-image-contest-results/>

A tudományos programok mellett a szervezők igyekeztek megismertetni bennünket az olasz életérzéssel is. A résztvevők előzetesen regisztrálhattak bor-, sajt-, és olasz ételkóstolókra, amelyek nemcsak ízletes élményt nyújtottak, hanem kiváló lehetőséget is adtak a kapcsolati háló építésére. Ezek az események születnek a legjobb kollaborációk.

A 2024-es FEBS Kongresszus nemcsak szakmai szempontból volt gazdagító, hanem új inspirációt is adott a jövőbeli kutatásaimhoz. Szívből ajánlom a 2025-ös, Isztambulban megrendezésre kerülő 49. FEBS kongresszust mindenkinek, de azoknak különösen, akik még nem vettek részt ezen a lenyűgöző rendezvényen.



FEBS Advanced Lecture Course: 5th Danube Conference on Epigenetics 28-31 October 2024, Budapest, Hungary

Invitation

Following the success of the previous Epigenetic Conferences in Budapest (2012, 2014, 2016, 2018 and 2022) we are delighted to announce that the next **Danube Conference on Epigenetics** will be held between **28-31 October, 2024** again in Budapest.

The following topics will be discussed in detail:

1. **Data visualisation**
2. **Epigenetics and transcription**
3. **Epigenetics and differentiation**
4. **Epigenetics and disease**
5. **Epigenetics and aging**
6. **Epigenetics and model organisms**
7. **Transgenerational inheritance**

Confirmed speakers

Keynote Lecturers

Kenneth Zaret, USA
Oded Rechavi, Israel

EMBO Keynote Lecturer

Maria-Elena Torres-Padilla, Germany

Confirmed Speakers

Julie Ahringer, UK
Cecilia Arraiano, Portugal
Petra Hajkova, UK
Kristian Helin, UK
Ian R Henderson, UK
Nicola Iovino, Germany
Helena Jambor, Germany
Rob Klose, UK
Tineke Lenstra, The Netherlands

Susan Mango, Switzerland
Celia Martinez-Jimenez, Germany
Eric Miska, UK
J. Andrew Pospisilik, USA
Claire Rougeulle, France
Peter Tessarz, The Netherlands
Laszlo Tora, France
Michiel Vermeulen, The Netherlands

Important dates

Submission of abstracts
30 June 2024

Payment of early registration fee
15 July 2024

Recommended date for hotel reservation
31 August 2024

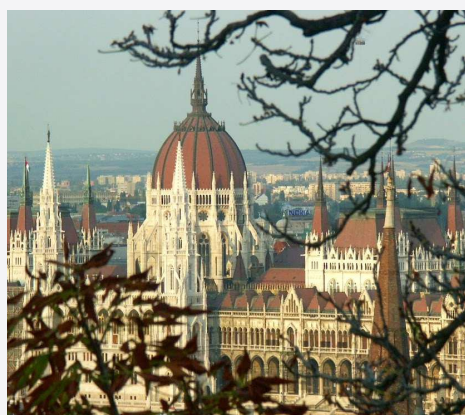
Cancellation of registration without penalty
10 September 2024

Scientific Organising Committee

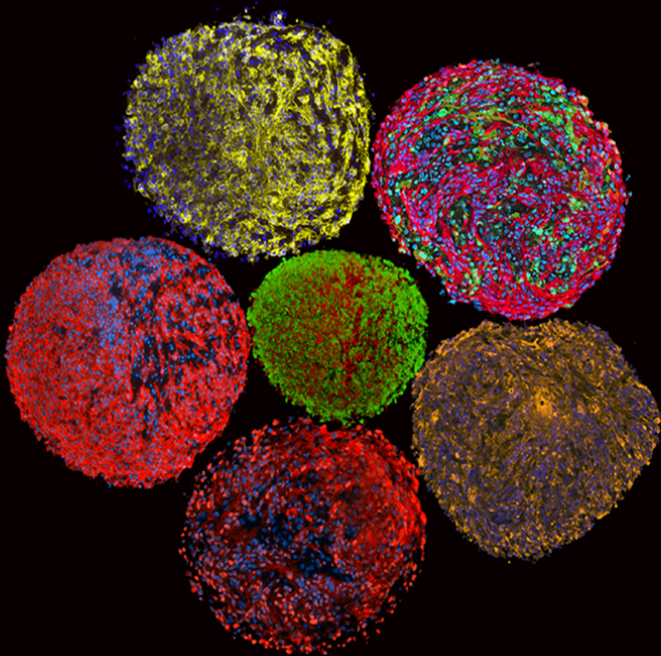
Tamas Aranyi, Hungary
Petra Hajkova, UK
Celia Martinez-Jimenez, Germany
Andrew Pospisilik, Germany
Lorant Szekvolgyi, Hungary
Laszlo Tora, France

SAVE THE DATE!
28-31 October 2024

<https://epigenetics2024.febsevents.org/>



VI. SEJT-, FEJLŐDÉS- ÉS ŐSSEJTBIOLÓGIA KONFERENCIA



2024. november 8.

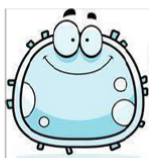
Helyszín:

Semmelweis Egyetem, ÁOK,
Anatómia, Szövet- és Fejlődéstan Intézet

Szervezők:

Nagy Nándor, Kocsis Katalin,
Fejlesztés Nóra, Dóra Dávid

Támogatók:



MAGE
Sejt- és
Fejlődésbiológiai
Tagozat



„Áttekintő közlemények az MBKE tagjainak tollából” című rovat felhívása

Sarkadi Balázs
rovatvezető

A BIOKÉMIA folyóiratban hírül kívánjuk adni a MBKE tagok 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 beküldött összefoglalók megjelenési formája: az eredeti cikk **első oldalának pdf változata** (amennyiben ezt a folyóirat engedi) és egy, a cikkhez vezető link.

A beküldés folyamatos az alábbi címre: sarkadi@biomembrane.hu



Várjuk a 2023/2024-ben készült PhD disszertációkat bemutató összefoglalókat

Nyitray László
rovatvezető

Bíztatunk minden, a BIOKÉMIA újságot olvasó doktori témavezetőt, hogy kérjék meg doktoranduszaikat, hogy éljenek ezzel a lehetőséggel, és írjanak egy összefoglalót a disszertációjukban bemutatott eredményeikről.

A ROVAT CÉLJA:

A BIOKÉMIA folyóirat szerkesztőbizottságában felmerült egy külön rovat indítása, melynek keretében lehetőséget teremtünk a PhD fokozatukat a biokémia területén frissen megszerző fiatalok számára az eredményeik rövid formában történő bemutatására. A rovat elindítását az is indokolta, hogy az ugyan bárki számára élőben meghallgatható, de korlátozott nyilvánosságú doktori védések, és a szintén nem túl széles körben olvasott doktori disszertációk mellett, megjelenést biztosítsunk a BIOKÉMIA lapban a fiatal kutatók számára.

Ugyan készül minden értekezés mellé egy téziszfüzet, de úgy gondoljuk, hogy egy pár oldalas, illusztrációkkal ellátott összefoglaló közlésével szélesebb nyilvánossághoz jutnak a tudomány jövőjét képviselő fiataljaink.

A kéziratokat folyamatosan várjuk!

A cikkeket a BIOKÉMIA honlapján megtalálható formai követelmények (<https://www.mbkegy.hu/apps/mbkegy/pages/index.html#!/ContentById/900>) betartásával, az újságban 2022-ben közölt korábbi összefoglalókat mintául véve kérjük megírni, azzal a változtatással, hogy a **referencia lista formátuma a FEBS Journal által alkalmazott stílust kövesse**, és kérünk szépen **angol nyelvű címet, absztraktot, és szintén angol nyelvű kulcsszavakat (4-6)** is a magyar nyelvű összefoglalóhoz.

Az elkészült cikket az alábbi címre várjuk: nyitray@elte.hu

A Fórum rovat felhívása

Gallyas Ferenc
rovatvezető

A BIODÉKA folyóirat Fórum rovata közérdekű bejelentéseket, kutatói véleményeket, esetleges tudományos diskusziókat ad közre. Bízunk ezért az MBKE tagokat és a BIODÉKA olvasóit, hogy éljenek a Fórum rovat lehetőségeivel! **Az írás bármilyen, a tudományos közéletet érintő vagy foglalkoztató témát érinthet, különösebb megkötések nélkül.**

Szerkesztőségünk bátorít mindenkit, hogy véleményét, vagy témafelvető gondolatát küldje el Gallyas Ferenc rovatvezetőnek a ferenc.gallyas@aok.pte.hu e-mail címre.

Tudományos cikkek
Áttekintő összefoglalók
PhD disszertációk bemutatása
Kitüntetések, elismerések
Munkacsoportok bemutatása
Konferencia felhívások és beszámolók
FEBS hírek
Aktualitások

**Szerkesztőségünk folyamatosan várja
az ÚJ HÍREKET a BIOKÉMIA VILÁGÁBÓL!**



Elérhetőségünk:
biokemia.szerkesztoseg@ttk.hu