



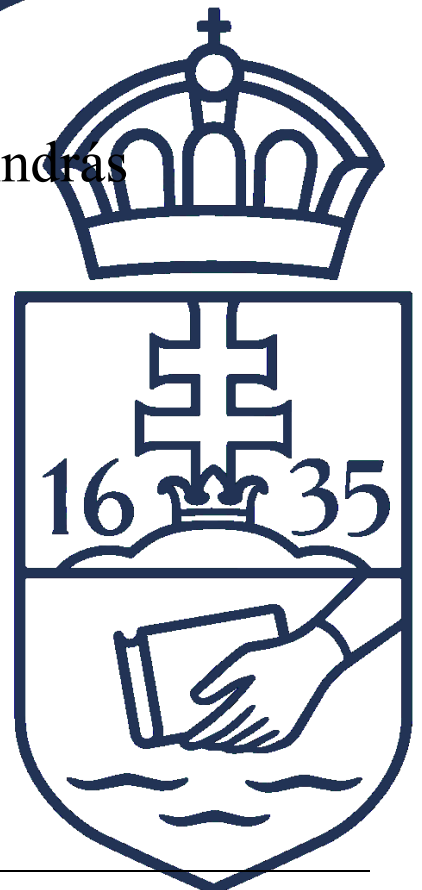
**ELTE**  
EÖTVÖS LORÁND  
TUDOMÁNYEGYETEM

ELTE – FUNKCIONÁLIS  
NUKLEINSAV-MOTÍVUMOK  
KUTATÓCSOPORT  
ELTE TTK BIOKÉMAI TANSZÉK

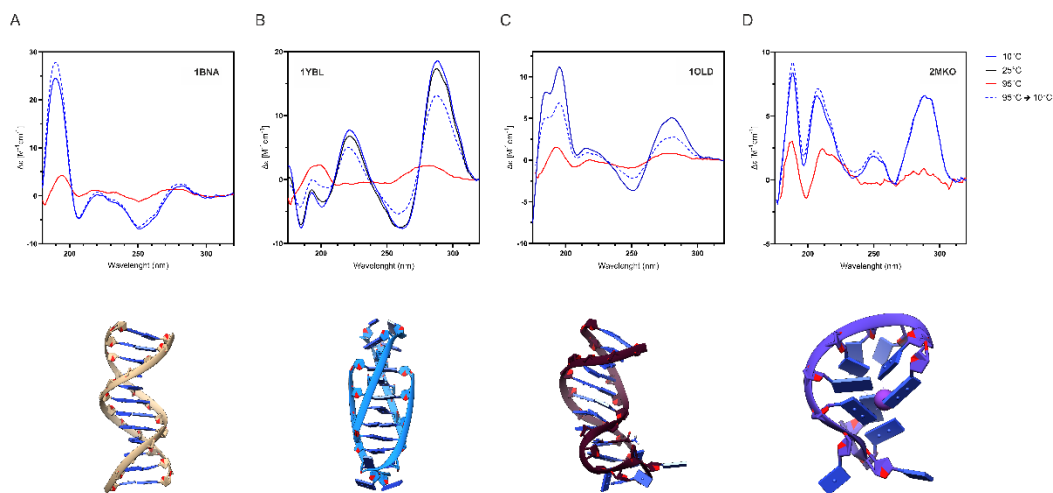
ELTE – Funkcionális nukleinsav-motívumok  
Kutatócsoport (2022/045-P278-1)

Pályázati zárójelentés  
(2023.01.15-2026.01.15.)

Témavezető: Dr. Micsonai András



Kutatócsoportunk azzal a céllal indult el, hogy a kanonikus A- és B-DNS szerkezetek mellett a nem-kanonikus nukleinsav motívumok szerkezetét jellemezze spektroszkópai és egyéb biofizikai módszerekkel. Mivel a nukleinsav motívumok a távoli UV tartományban jelentős CD jelet adnak, így feltételezésünk az volt, hogy a fehérjékhez hasonlóan ezen spektrumok komponenseinek értelmezése, geometriához való társítása lehetőséget ad egy szerkezetbecslő módszer kidolgozására. Az elmúlt 3 évben számos nem-kanonikus DNS szerkezethez tartozó CD spektroszkópiás vizsgálatot végeztünk el. Méréseinkhez az ELTE TTK Kémiai Intézetében található Jasco J-810 asztali CD készüléket használtuk, valamint 6 sikeres műszerhasználati pályázatnak köszönhetően a francia SOLEIL Szinkrotron forrás DISCO nevű állomásán szinkrotron radiációs CD (SRCD) műszerét használtuk. Mintaként pedig a PDB adatbázisban atomi felbontású térszerkezettel rendelkező motívumokat választottunk ki, rendeltünk meg oligonukleotid formában, majd minőség-ellenőrzés után különböző körülmények között vizsgáltuk a szerkezetüket (1. ábra).



1. ábra: Különböző nukleinsav motívumok SRCD spektruma és a hozzájuk tartozó térszerkezetek. A: B-DNS (1BNA), B: i-motif (1YBL), C: DNS stemloop (1OLD), D: G-triplex (2MKO). Saját mérések.

A funkcionális DNS motívumok vizsgálatánál a fő hangsúlyt a G-kvadruplex (G4) szerkezetére helyeztük. Ezek olyan DNS és RNS szekvenciák esetében alakulhat ki, melyek magas guanin tartalommal jellemezhető, a szerkezet alapját pedig 4, egy síkba rendeződő guanin bázis által alkotott tetrád szerkezet adja, stabilizálja. A G4 szerkezetek többféle elrendezésben jöhetnek létre: a tetrádot alkotó guaninok, valamint az őket hordozó cukor-foszfát gerinc egymáshoz képesti lefutása alapján megkülönböztetünk parallel, antiparallel valamint hibrid G4 szerkezeteket. da Silva és munkatársai dolgoztak ki egy quadruplex topológiai rendszert, mely 26 lehetséges csoportot tartalmaz (da Silva, Chemistry, 13(35):9738-9745, 2007.) Ezt a rendszert dolgoztuk tovább és határoztunk meg alosztályokat a tetrádonkénti bázisorientációk (syn/anti) alapján. A 26 csoportból 16 csoporthoz, összesen 94 alosztályhoz találtunk példát a PDB adatbázisban.

Ez alapján a topológiai osztályozást követve alkottuk meg adatbázisunk, a G4SDB (G-kvadruplex Spectral DataBase) gerincét: célunk az volt, hogy ezeket a csoportokat geometriailag jellemezzük, valamint társítsunk hozzájuk olyan spektroszkópiai méréseket, amelyekkel az egyes csoportok, alcsoportok karakterizálhatóak. 397 monomolekuláris G4 szerkezet PDB-térszerkezetét jellemeztük geometriai szempontból (csavarodási szögek, planaritás, H-híd mintázat, szekvenciális adatok, stb.), gyűjtöttünk metaadatokat a kísérleti elrendezésre vonatkozóan (módszer: X-ray, NMR; hőmérséklet, ionerő, ionösszetétel, stabilizáló kismolekula jelenléte, stb.)

A támogatott időszakban összesen 84 oligonucleotid spektrális tulajdonságait vizsgáltuk különböző körülmények között. Vizsgálati módszereink között szerepelt a CD spektroszkópia mellett, abszorpciós spektrumok felvétele, fluoreszcencia vizsgálatok, DSC mérések (lásd később), valamint sejtes rendszerű vizsgálatok is. Eredményeinket a topológiai osztályozásra épülő adatbázisunkhoz illesztettük a kísérletekre vonatkozó metaadatokkal együtt. Az így kapott adatbázis hiánypótló, ugyanis a jelenleg elérhető ilyen típusú adatbázisok csupán az irodalmi adatok kis részét tartalmazzák, nincs sztenderdizálva a mérésekről elérhető adatok formája, nem kereshető, és nem vagy csak korlátozottan tartalmaznak atomifelbontású térszerkezettel jellemezhető adatokat.

## **Módszerfejlesztés**

A spektroszkópiai adatainkra támaszkodva elkezdtünk kidolgozni egy szerkezetvizsgáló módszert, amely a jövőben képes lesz spektroszkópiai eredmények alapján becslést adni az oligonukleotid térszerkezetére vonatkozóan. A módszer mögött álló matematikai modellek terén a klasszikus lineáris modell mellett kidolgoztunk egy nem-lineáris modellt is, illetve gépi tanulási és mesterséges intelligencia modelleket is alkalmaztunk. Ezen módszerek fejlesztése jelenleg is folyamatban van.

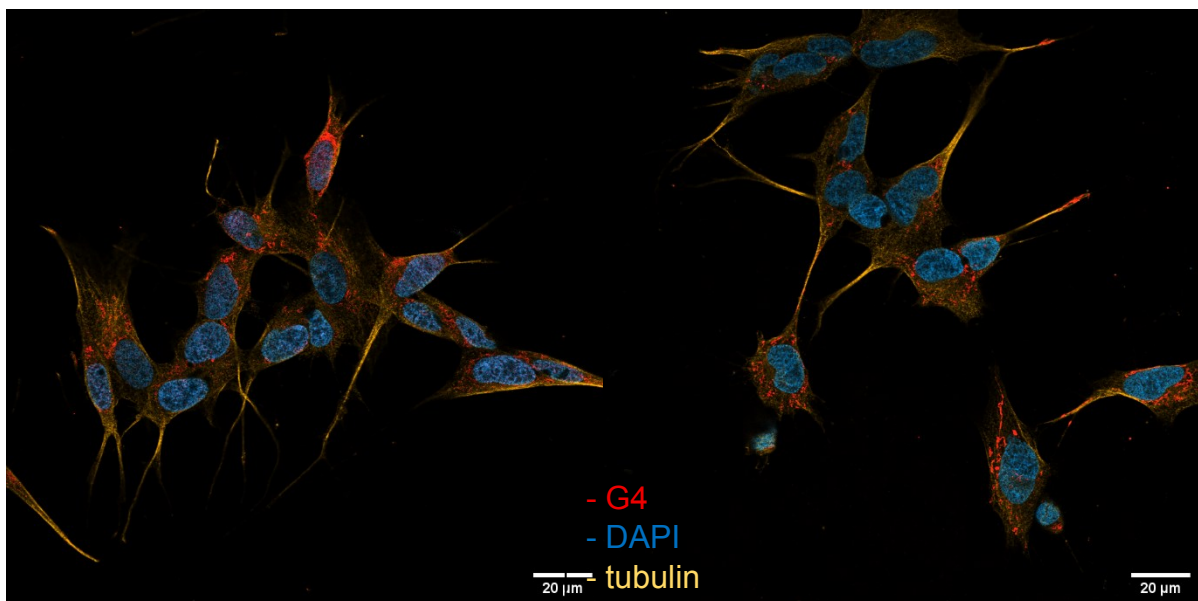
## **Új G4 topológiát megvalósító szekvenciák keresése és validálása**

Az általunk összegyűjtött szekvenciális, térszerkezeti és spektrális adatokra támaszkodva megvizsgáltuk, hogy a lehetséges 26 G4 topológia „hiányzó” 10 csoportja (melyekre még nem ismert atomi felbontású szerkezet) modellezhető-e. Célunk volt, hogy olyan szekvenciákat keressünk, melyek olyan szerkezetet vesznek fel, amelyek ezen 10 topológia osztály egyikébe tartoznak. A valószínűségi számításokon és térgeometriai számításokra alapozva minden csoportra több jelölt-szekvenciát határoztunk meg, melyek közül 2-2 oligonukleotidot rendeltünk meg.

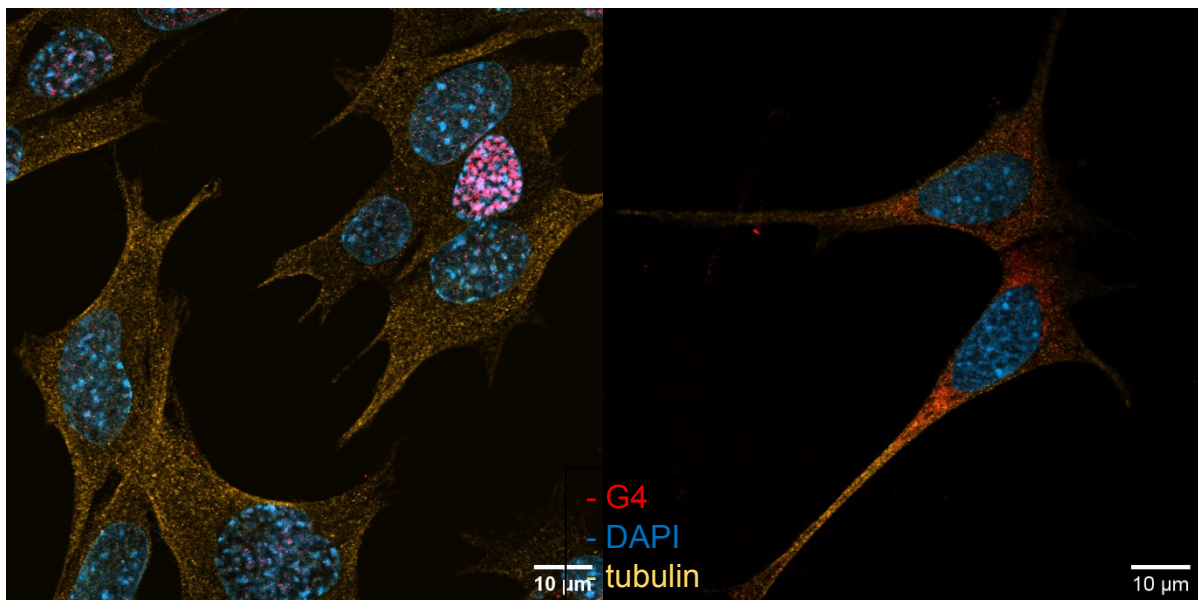
Eredményein azt mutatják, hogy sikeresen azonosítani tudtunk egy új G4 topológiát megvalósító szekvenciát, amely a PPDML jelölést kapta. A kiindulási szekvencia mellett, annak toldalékos (flanking) variánsait is megterveztük és megvizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy az új G4 topológia hosszabb oligonukleotid részeként is képes kialakulni.

### Sejtes vizsgálatok

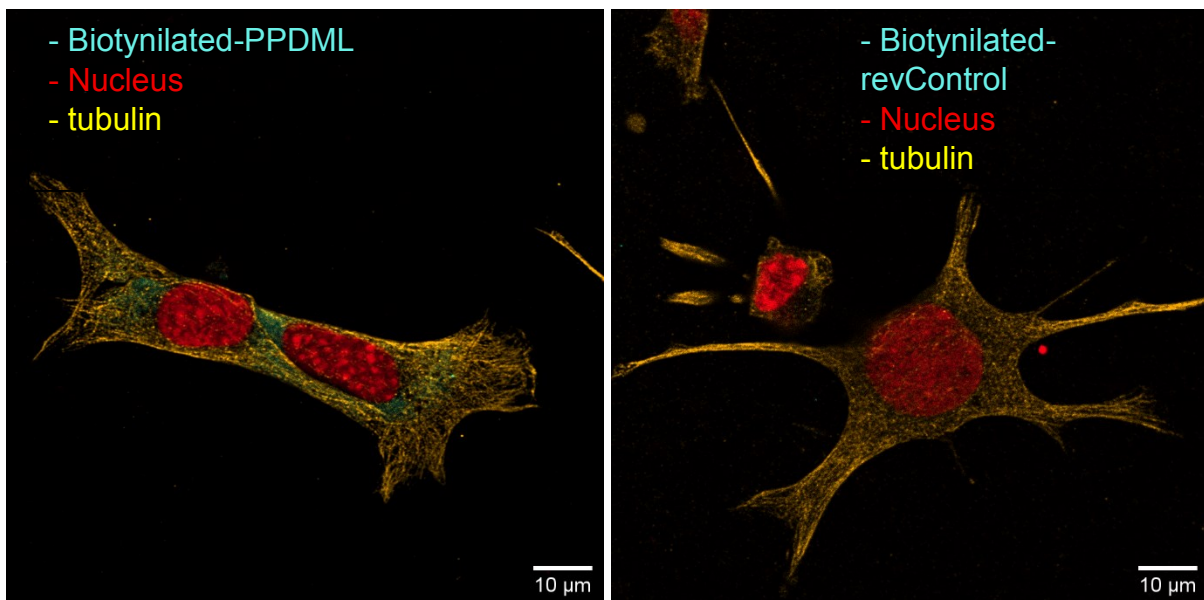
Szintén az adatbázis részét képezik majd a fluoreszcens partnerek jelenlétében végzett mikroszkópos vizsgálatok eredményei is. Célunk kettős volt: a piacon elérhető fluoreszcens festékek specifikitásának vizsgálata, valamint alkalmazhatóságuk vizsgálata új topológiák sejten belüli kimutatására. Eredményeinket a 2-4. ábra mutatja.



2. ábra: SH-SY5Y sejteken végzett vizsgálatok alapján a kereskedelmi forgalomban kapható G4 antitestek (G4-1H6 és BG4) nem specifikusak DNS kvadruplexekre. Az alkalmazott kezelés során a sejtplazma területén észlelt jelek feltehetően RNS kvadruplexekhez köthetőek.

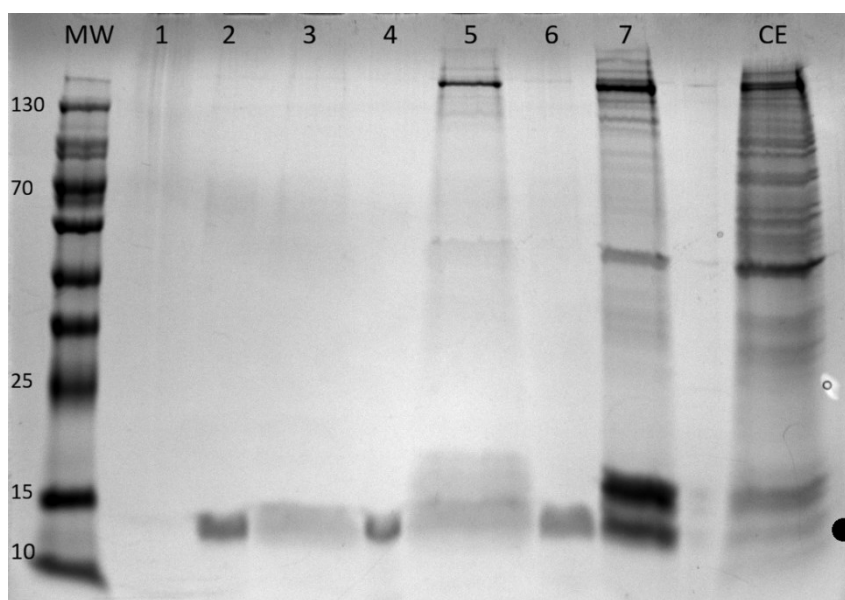


3. ábra: A különböző RNáz és DNáz kezelésen átesett mHippoE-14 sejteken végzett vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy ezen antitestek mind az RNS-, mind a DNS-kvadruplexek kimutatására alkalmasak, s a differenciáláshoz szükséges a fixált tenyészet enzimatisuk előkezelése.



4. ábra: Biotin jelölt PPDML-lel kimutatásra került, hogy a tervezett, feltehetően új topológiával rendelkező G4 szekvencia mHippoE-14 sejtek esetében a citoplazmába lokalizálódik, míg a kontrollként alkalmazott biotin jelölt PPDML nem ad jelet mHippoE-14 sejtek esetében különböző kezelések hatására- PhenDC3 kvadruplex stabilizáló ágens jelenlétében ugyanezen eredmények reprodukálhatóak.

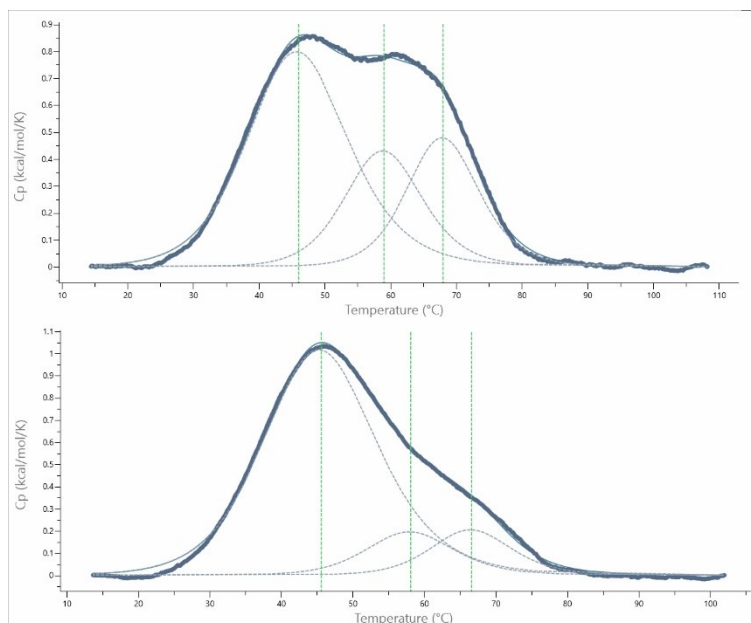
Célunk volt továbbá a PPDML szekvencia sejten belüli kimutatása mellett annak kötőpartnereit is feltérképezni. Ehhez a biotin jelölt PPDML oligonukleotidokat alkalmaztunk pull-down kísérletekben (5. ábra). Ezek az eredmények a jelentés elkészülte előtti napok eredménye, így sajnos a gélen látható sávok szekvenálási eredményeiről, a partnerek azonosításáról egyelőre nem tudunk beszámolni.



5. ábra: A PPDML szekvenciával kölcsönható fehérje partnerek azonosítására alkalmazott pull-down vizsgálat során a biotin jelölt PPDML minták esetében (3, 5, 7) SDS-poliakrilamid gélen is jól azonosítható, hogy a streptavidin (•) mellett ~15 kDa-nál egy erőteljes sáv jelenik meg a teljes sejt extraktumokból végzett kísérlet során. Illetve több, kevésbé kifejezett komponens is feldúsul. A kapott mintákból a fehérje partnerek LC-MS/MS technikával történő azonosítása további tervek között szerepel.

### A mérési protokoll

A mérések során különös jelentősége van annak, hogy a minták ne csupán stabil, hanem topológiailag homogén populációt tartalmazzanak. Számos esetben ugyanis a kialakult G4-rendszerek nem monodiszperz szerkezetként vannak jelen, hanem több, egymással egyensúlyban álló konformer keverékeként. Ez különösen kritikus akkor, amikor kis koncentrációváltozás – akár egyszerű hígítás – is képes eltolni a szerkezeti egyensúlyt egy másik domináns topológia irányába. Ennek kontrollálására a CD- és SRCD-mérések kiegészítéseként differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálatokat végeztünk, mivel a DSC nemcsak a termodinamikai stabilitás meghatározására alkalmas, hanem érzékenyen jelzi a minták heterogenitását, több olvadási átmenet jelenlétét, illetve a reverzibilitás mértékét is (6. ábra). Természetesen a hőkezelés a korábbi méréseink esetében is megtörténtek, de a protokoll kidolgozása és publikálása szempontjából jelentős, hogy ennek hatását DSC mérésekkel is szemléltetni tudjuk.



6. ábra: Antiparallel G4 szerkezetet mutató oligonukleotid differenciális pásztázó kalorimetriás felfűtési görbéje hőkezelés nélkül (felül), illetve hőkezelés után (alul). Látható, hogy az ismételt hőkezelés hatására a kezdeti heterogén populációban az alacsony hőstabilitással jellemezhető konformáció részaránya jelentősen megnő.

### Publikációk, konferenciák

A támogatott időszakban több jelentős publikáció született a kutatócsoport munkájához kapcsolódóan. Murvai Nikoletta, a kutatócsoport posztdoktorának elsőszerezős publikációjában az alfa-szinuklein keresztkötött változatának amiloidképződést gátló hatását, valamint a módosítás által kiváltott szerkezetváltozásokat vizsgáltuk többek között cirkuláris dikroizms spektroszkópiával.

2025-ben négy publikációnk is megjelent. A *Protein Science* hasábjain publikáltuk a fehérjeaggregátumok CD spektroszkópiával történő szerkezetvizsgálatára vonatkozó protokoll cikkünket, melyben a kutatócsoport vezetője utolsó és levelező szerzőként szerepel. Ebben a publikációban az aggregációkutatásban érdekelt kutatók mellett minden szerkezetvizsgálatban érdekelt kutató hasznos tanácsokat és megoldásokat talál a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai mérések tervezésével és kivitelezésével kapcsolatban. A publikáció jelentős nemzetközi visszhangot kapott konferenciákon, illetve a megjelenés óta eltelt egy évben 32 tudományos cikkben hivatkozták.

Másik nagy jelentőségű publikációnk a rangos *Nucleic Acids Research* folyóiratban jelent meg a kutatócsoport tagjai által fejlesztett szerkezetvizsgáló módszerről. Az algoritmus fejlesztésében, illetve a kísérletes validálásban központi szerepet játszottak a kutatócsoport tagjai. A módszer alapját adó matematikai modell a korábbi algoritmusoktól merőben eltérő megközelítésen alapul: a biomakromolekulák esetében korlátozott számban elérhető referencia adatok által

reprezentált szerkezeti tér alapján egy nem-lineáris modell alapján számol. Ez a módszer egyszerre szolgáltat robusztus becslést és flexibilitást korlátozott adatkészlet használatával, amely a nukleinsav motívumok (vagy más biomakromolekulák) szerkezetvizsgálata esetén fundamentális szempont.

2025 év végén jelent meg a *Protein Science* folyóiratban Tantos Ágnes (HUN-REN) kutatócsoportjával közös munkánk az EZH2 rendezetlen régiójának RNS-kötését szabályzó foszforilációs módosításáról. Munkánkban a fehérjék, illetve nukleinsav molekulák CD-spektroszkópiával történő szerkezetbecsléséről az elmúlt évek alatt szerzett tapasztalataink központi szerepet játszottak.

Dr. Murvai Nikoletta – kutatócsoportunk sokoldalú posztdoktora – egy magyar-görög kollaboráció keretében vizsgálta egy  $\gamma$ -CD-származék és a természetben előforduló aminoszteroid fitotoxinok kölcsönhatásait spektroszkópiai módszerekkel és életképességi tesztek segítségével. Az eredményeket bemutató publikáció *Carbohydrate Polymers* folyóiratban (impakt faktor: 12.5; D1) jelent meg [Kalydi et al., *Carbohydrate Polymers* 366:123824; 2025].

Csoportunk doktorandusz hallgatójának, Moussong Évának elsőszerező cikke jelenleg bírálat alatt van és védését ez év második felére tervezi.

Eddig megjelent publikációink:

1. Szabó B, Micsonai A, Kardos J, Tantos Á. Phosphorylation event changes the RNA binding mode of EZH2 disordered segment. *Protein Science* (2025) IF: 5,2
2. Kalydi E, Murvai N, Saridakis E, Mavridis IM, Malanga M, Kardos J, Yannakopoulou K, Beni S. Molecular encapsulation of the aminosteroid phytotoxins solanidine and  $\alpha$ -solanine by sugammadex: new insights into atomic-level interactions. *Carbohydrate Polymers*. 366:123824 (2025) IF: 12,5
3. Micsonai A, Wien F, Murvai N, Nyiri MP, Balatoni B, Lee YH, Molnár T, Goto Y, Jamme F, Kardos J. BeStSel: analysis site for protein CD spectra – 2025 Update. *Nucleic Acids Research* 53(W1):W73-W83 (2025) IF: 13,1
4. Kardos J, Nyiri MP, Moussong É, Wien F, Molnár T, Murvai N, Tóth V, Vadászi H, Kun J, Jamme F, Micsonai A. Guide to the structural characterization of protein aggregates and amyloid fibrils by CD spectroscopy. *Protein Science* 34: e70066 (2025) IF: 5,2
5. Murvai N, Gellén G, Micsonai A, Schlosser G, Kardos J. Cross-Linked  $\alpha$ -Synuclein as Inhibitor of Amyloid Formation. *Int J Mol Sci*. 24:13403 (2023) IF 4,9

Eredményeinket számos hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be (meghívott előadóként, illetve poszter szekcióban): Biophysical Society Annual Meeting (BPS2025), 19th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2023), 20th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2025), JASCO webinars, ELTE TTK Biológiai Intézeti előadássorozat.

A támogatott időszak új nemzetközi kapcsolat kiépítése terén is sikeres volt. Dr. Bánréti Ágnes, az Université Côte d'Azur munkatársával közös projektek kidolgozásába kezdtünk.

Kutatócsoportjának fókuszában a homokiralitás megbomlása, a heterokirális fehérjék detektálása és karakterizálása áll. Ágnes vezetésével kerül benyújtásra egy nemzetközi COST pályázat, melyben a kísérletes doménban kaptunk vezető szerepet a biomakromolekulák heterokiralitásának vizsgálatában.

Megkeresést és együttműködési ajánlót Prof. Jonathan Chaires (University of Louisville) és Prof. Michaela Vorlíčková (Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences), akik mindketten a G-kvadruplex szerkezetek vizsgálatának elismert és meghatározó szakértői. A két szaktekintéllyel az adatbázisépítés és szerkezetvizsgálati módszer kidolgozásának témájában tervezünk együttműködni és közös pályázati lehetőségeket keresni.

A JASCO, japán műszergyártó cég 2022-ben licence szerződés keretében megvásárolta és műszereibe beépítette a csoportunk által korábban kidolgozott BeStSel, fehérje CD elemző szoftvert. A céggel azóta is szoros partneri kapcsolatot ápolunk, és nagy érdeklődést mutatnak a nukleinsavakat érintő eredményeink iránt is.

A vállalatoknak megfelelően az első évben benyújtásra került egy pályamű a Magyar Tudományos Akadémia által kiírt Lendület pályázati felhívására. A projekt célja az EKA Kutatócsoporti Pályázat kutatási tervének bővítése: az adatbázishoz beszerezhető oligonukleotidok számának jelentős növelése; egy fluoriméter beszerzése és az adatbázis növelése a motívumok fluoreszcencia spektrumaival; a szerkezetvizsgáló módszer alkalmazása biológiailag releváns problémák vizsgálatára (vírusgenom szerkezet, Ret-szindróma molekuláris/szerkezeti okainak vizsgálata, kotranszlációs RNS folding). Sajnos a pályázat nem nyert támogatást, így a kutatási tervben szereplő kísérletekre más forrás(ok) elnyerését céloztuk meg. Benyújtásra került több NKKP pályázat is hasonló célokat kitűzve, azonban az elmúlt években ezekre támogatást nem sikerült elnyernünk. A 2026-os évi felhívásra szintén nyújtottunk be pályázatot az eddigi visszajelzések figyelembevételével.

Belső sikeres pályázat után részt vettünk az ELTE által 2026 februárjában benyújtott GINOP+ pályázatában, ahol egy új CD spektropolariméter beszerzését céloztuk meg. Amennyiben a pályázat nyer, úgy az ELTE TTK Biokémiai Tanszékén is elérhetővé válik jó minőségű, nagykapacitású adatgyűjtés, ami jövőbeli céljainkat segíti.

## **Jövőbeli kutatások**

Célunk a G-quadruplexek (G4-ek) szerkezetvizsgálatának egyik alapvető, jelenleg sem teljes körűen standardizált kérdésének vizsgálata: egy olyan általánosan elfogadható mérési és mintaelőkészítési protokoll kialakítása, amely biztosítja a különböző laboratóriumokban végzett spektroszkópiai, kalorimetriás és szerkezetbiológiai mérések közötti reprodukálhatóságot és

összehasonlíthatóságot. Továbbá célunk a jelenlegi adatbázisunkat a mérést értékelő információkkal is ellátni irodalmi adatok (és saját méréseink) esetében.

Jövőbeni kutatási irányunk egyik központi célja új G4-topológiák azonosítása és kísérletes validálása. A támogatott időszakban végzett elemzések alapján megtervezett és vizsgált, potenciálisan új topológiát mutató szekvenciák mellett, a többi, eddig nem ismert topológiához tartozó G4 szerkezet tulajdonságait is szeretnénk feltárni. Ennek részeként célzott új oligonukleotid-tervezés, CD/SRCD/DSC validáció, natív PAGE, valamint szükség esetén NMR együttműködésben történő szerkezetellenőrzés szükséges.

A kutatási irány kiterjesztése során fontos célunk a G4 szerkezetek képződésének sejtes környezetben történő vizsgálata eukarióta sejtvonalakban, különösen neurodegeneratív és daganatos modellekben. Ez lehetőséget nyújt az topológiaspecifikus kötőpartnerek keresésére is. Hosszabb távú cél annak meghatározása, hogy az azonosított kötőpartnerek és topológiai sajátosságok alapján milyen irányban szükséges továbbfejleszteni a jelenlegi G4 genomikai feltérképezési technikákat, ideértve a G4-ChIP-seq, CUT&Tag, ligandum-asszisztált pull-down és strukturális footprinting módszereket. Különösen fontos lehet olyan új detekciós stratégiák kidolgozása, amelyek nem kizárólag stabil, hosszú élettartamú G4-eket detektálnak, hanem az átmeneti, stresszfüggő vagy fehérjék által modulált konformációkat is.

Ezúton is köszönjük az EKA támogatását, mely nélkülözhetetlen volt kutatási céljaink megvalósításához!