



Ph.D. értekezés tézisei



**Rendszerszintű genommérnöki vizsgálatok az evolúciós
folyamatok tanulmányozására**

Nyerges Ákos József

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem

Biokémiai Intézet

Szintetikus és Rendszerbiológiai Egység

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Magyar Tudományos Akadémia

Szeged

2019

Bevezetés

Az evolúciós folyamatok vizsgálatára és a genotípus fenotípusra gyakorolt hatásának tanulmányozására a nagy átteresztőképességű genommérnökség páratlan lehetőséget kínál. Az örökítő anyag nagyszámú, tervezett változatát, mutációját létrehozva és hatását hasonló átteresztőképességgel vizsgálva a komplex, több mutációt igénylő evolúciós folyamatok is laboratóriumi időlépték alatt vizsgálhatóvá válnak. Mindezen lehetőségek ellenére a genommérnökség eszköztára súlyos hiányosságoktól szenved, mely egyes biológiai kérdések megválaszolását hátráltatja. Ennek oka, hogy az elérhető módszerek java mindösszesen néhány laboratóriumi modellszervezetre (például a széles körben alkalmazott *Escherichia coli* K-12 bélbaktériumra) optimalizált, vagy kiterjedt genommodosítást, DNS szintézist, és időigényes klónozási lépéseket igényel – ezáltal praktikusságukat és átteresztőképességüket csökkentve. Továbbá az elérhető módszerek java nem kívánt, háttér-mutációk felhalmozódásához vezet, mely egyes esetekben akár a célzott genommodosítás hatást is elfedheti.

Kutatásunk ennek következtében a genommérnöki módszerek hátrányainak leküzdésére irányult. Ennek eléréséhez, munkánk során a jelenleg elérhető legnagyobb átteresztőképességű genommérnöki módszert, az egyes szálú DNS-rekombináción alapuló multiplex génmérnökség (MAGE) módszerét fejlesztettük tovább számos baktérium fajban történő alkalmazásra. Ezen túl pedig a nem kívánt háttérmutációk megjelenését is nagyságrendekkel csökkentettük, a módszer precíz alkalmazása érdekében. Ezen új eljárás, melyet pORTMAGE-nek neveztünk el, precíz és könnyen alkalmazható eszközt kínál számos bélbaktérium genomjának gyors és célzott módosítására. Ezt követően a pORTMAGE módszerét alapul véve olyan eljárást fejlesztettünk ki mely elsőként teszi lehetővé kiterjedt genomi szakaszok átfogó, célzott *in vivo* mutagenézisét – és ezáltal az evolúciós folyamatok korábbiaknál gyorsabb tanulmányozását.

Célkitűzéseink

Célunk a bakteriális genommérnökség eszköztárának továbbfejlesztése a precizitás, megnövelt áteresztőképesség és kibővített gazdaspecificitás érdekében. Ennek elérése érdekében első lépésünkként egy, széles gazdaspecificitású, plazmid-alapú, egyes szálú DNS-rekombináción alapuló génmérnöki eljárást dolgoztunk ki, mely számos, egészségügyi és biotechnológiai szempontból fontos baktériumban is hatékonyan alkalmazható. Ezt követően ezen eljárásra építve, egy olyan extrém nagy áteresztőképességű genommérnöki eljárás kidolgozásába fogtunk, mely képes mutációk milliárdjainak párhuzamos létrehozására és vizsgálatára a bakteriális kromoszómán. Végezetül pedig, ezen gyorsított-evolúciós eljárásokat felhasználva, az antibiotikum rezisztenciafolyamatok tanulmányozásába fogtunk és elvégeztük ezen evolúciós folyamatok összehasonlítását közeli rokon bakteriális törzsek esetén.

Ezen célok elérése érdekében kutatásunk a következő lépésekből állt:

- Elsőként egy, az *Escherichia coli* metiláció-függő DNS hibajavítási rendszerének olyan mutációját karakterizáltuk, melynek jelenléte domináns negatív hatást vált ki a sejtek DNS hibajavítási folyamataiban.
- Ezt követően, ezen domináns mutáns felhasználásával, olyan széles gazdaspecificitású, plazmid alapú rendszert dolgoztunk ki az egyes szálú DNS-rekombináción alapuló génmérnökség folyamatára, mely magas hatásfokú genommodosítást valósít meg a DNS hibajavítás precíz szabályzásán keresztül.
- Olyan költséghatékony kémiai DNS oligonukleotid-szintézis eljárást dolgoztunk ki, mely szabályozható módon képes véletlenszerű mutációk elhelyezésére az egyes szálú DNS-rekombináción alapuló génmérnökség folyamata során felhasznált oligonukleotidok teljes hosszán.
- Ezen oligonukleotidokat alapul véve, olyan genommérnöki eljárást dolgoztunk ki mely képes random mutációk egyenletes beépítésére a bakteriális kromoszóma általunk kijelölt cél régióin, mindezt káros háttérmutációk beépítése nélkül és egyszerre több faj esetén is.
- Az antibiotikum rezisztencia mögött meghúzódó mutációs folyamatok rezisztencia-hatását közeli rokon mikroorganizmusok között összehasonlítottuk.
- Olyan evolúciós folyamatokat azonosítottunk, mely bakteriális antibiotikum rezisztencia kialakulásához vezethet jelenleg klinikai fejlesztés alatt álló antibiotikumok ellen.

Módszertan

- I. Mutagén DNS szintézis a DiVERGE oligonukleotidok kémiai úton történő létrehozása érdekében
- II. pORTMAGE plazmidok létrehozása
- III. Egyesszálú DNS-alapú rekombináció és Multiplex Automatikus Genommérnökség alkalmazása
- IV. MP6 plazmid-alapú *in vivo* mutagenézis
- V. A pORTMAGE és DiVERGE működésének karakterizálása számos bakteriális faj esetén
- VI. Teljes genom szekvenálás
- VII. DiVERGE során alkalmazott DNS oligonukleotidok nagyáteresztőképességű szekvenálása
- VIII. Mutagenizált sejtkönyvtárak nagyáteresztőképességű DNS szekvencia analízise Illumina és Pacific Biosciences szekvenáló eljárásokkal
- IX. Mutációs ráta mérés
- X. *In vitro* növekedési sebesség mérés
- XI. Antibiotikum érzékenység mérése

Eredményeink

I. Széles gazdaspecificitású, precíz genommérnöki eljárás kidolgozása

Elsődleges célunk elérése érdekében, azaz, hogy a káros háttér-mutációk számának minimalizálása mellett egy széles gazdaspecificitású genommérnöki módszert fejlesszünk ki, egy általánosan alkalmazható, plazmid alapú genommodosítási eljárást dolgoztunk ki. Ennek megvalósítását az *Escherichia coli* metiláció-függő DNS hibajavítását végző egyik fehérje, a MutL domináns mutátor mutánsa tette lehetővé. A MutL a metiláció által irányított hibás bázispárosodás kijavítás („methyl-directed mismatch repair”, MMR) útvonalának tagja, mely a MutHLS komplex részeként a MutH endonukleáz DNS-hibához való vonzásában vesz részt. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy *Escherichia coli* MutL fehérjéjének a E32→K mutációt hordozó változata a sejt mutátor állapotát indukálja, azaz a MutHLS komplex működését meggátolja, vad típusú változatának jelenléte esetén is. Ezen domináns hatást biztosító allél lehetővé tette a bakteriális metiláció által irányított hibás bázispárosodás kijavítás szabályozását a genom modosítása nélkül, mindösszesen egyetlen, plazmid alapú fehérjetermelési rendszer sejtbe juttatásával. Mindezt kihasználva, a genommodosítást és DNS hibajavítás szabályozását együttesen megvalósító, plazmid alapú genommodosítási rendszert hoztunk létre, melyet pORTMAGE-nek neveztünk el.

A pORTMAGE egyszerre képes szabályozottan a bakteriális genommodosításhoz szükséges rekombinációs fehérjék és a domináns MutL E32→K variáns termelésére, melyet hőmérséklet-szabályozható módon a λ bakteriofágból származó cl857 represszor – pL promóter-alapú fehérjetermelési rendszer révén valósít meg. A pORTMAGE rendszere számos hasonlóságot mutat MAGE korábbi módszerével, így a korábbi módosított MAGE-módszere során is átalakítás nélkül alkalmazható. Azonban míg a MAGE tradicionális módszere csupán limitált számú bakteriális törzsre volt alkalmazható melyekben előzetesen a DNS hibajavítás metiláció-függő útvonalát el kellett távolítani, addig a pORTMAGE alkalmazása egyetlen plazmid sejtbe juttatásával azonnal lehetővé tette a hatékony genommodosítást. A pORTMAGE alapú genommodosítás során a rekombinációt katalizáló fehérjék és a domináns MutL allél termelése egyetlen rövid hő sokk segítségével indukálható, mely egyúttal a sejtek MutHLS rendszerének inaktiválásához is vezet. Ezáltal a genommodosítást végző DNS oligonukleotidok beépülésének idejére a sejtek metiláció által irányított hibás bázispárosodás kijavítási rendszere kikapcsolt állapotban marad, így egyformán hatékony mutációbeépítést tesz lehetővé legyen szó bármilyen genomi modosítás típusról. Ezen felül azonban a domináns mutátor MutL allél szabályozható termelése további előnyt is kínált. Segítségével a sejtek mutátor állapota a genommodosítás teljes folyamata során rövid időperiódusára vált korlátozhatóvá, ezáltal csökkentve a sejtosztódások számát

melyet a sejt háttérmutációk felhalmozódására érzékeny állapotban tölt. Kísérleteink ezen elmélet helyességét igazolták. Ismételt pORTMAGE-genommódosítási ciklusokat követően a sejtek teljes genomját szekvenanciaanalízisnek alávetve a módszer segítségével kapott sejt-változatok nem mutattak háttérmutációkat a bakteriális genomon. Ezzel szemben azonban a tradicionális módszerrel módosított sejtek több mint 80 nemkívánt mutációt halmoztak fel.

Végezetül pedig, a MutHLS rendszer erős konzerváltságát kihasználva a domináns MutL E32→K allél felhasználása a pORTMAGE általános alkalmazását is lehetővé tette. Ennek oka, hogy az *Escherichia coli*-ből eredő MutL E32→K allél számos bélbaktériumban hasonló, domináns DNS hibajavításra gyakorolt hatást mutatott, ezáltal pedig a pORTMAGE hatékony működését lehetővé tette az *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* nemzetség számos fajában is, melyek jelentős biotechnológiai és klinikai mikrobiológiai szereppel bírnak.

Ezen eredményeinket a *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 2016. február 16-ai kiadásában mutattuk be (<https://doi.org/10.1073/pnas.1520040113>).

II. Nagy áteresztőképességű *in vivo* célzott mutagenézis eljárás kidolgozása

Ezt követően, hogy lehetővé tegyük a mutációk hatásának szisztematikus analizisét kiterjedt genomi régiók esetén is, az egyes szálú DNS-rekombináción alapuló multiplex génmérnökséget módszerét tovább fejlesztve olyan eljárást dolgoztunk ki mely képes kiterjedt genomi szakaszok egyenletes *in vivo* mutagenézisére. A jelenlegi *in vivo* mutagenézis módszerek erre nem adnak lehetőséget. Ennek oka, hogy az elérhető módszerek mutációs rátája vagy limitált, vagy épp nem specifikus, ezáltal nemkívánt háttér-mutációkat generálnak. Ezen túl egyes módszerek esetén pedig a szakasz, melyre mutáció vihető be erősen limitált. Ennek következtében pedig ezen módszerek nem teszik lehetővé a szekvenciater hatékony feltérképezését, amely azonban elengedhetetlen lenne az evolúciós folyamatok hatékony vizsgálata érdekében. Ezen probléma megoldása érdekében a pORTMAGE alapú oligo-rekombináció módszerét olyan DNS szintézis eljárással kapcsoltuk össze, mely képes a rekombinációban felhasznált DNS oligonukleotidok teljes hosszán random elhelyezkedésű és típusú mutációkat létrehozni. Mindezt egy módosított foszforamidit-kémia alapú DNS szintézis eljárással sikerült elérnünk, mely képes volt a génmérnökség során felhasznált oligonukleotidok teljes hosszán a lehetséges nukleotid-szubsztitúciók egyenletes létrehozására.

Ezen új eljárás, melyet DiVERGE-nek (mely a 'directed evolution with random genomic mutations' megnevezésből képzett mozaikszó) neveztünk el, képes a pORTMAGE előnyös

tulajdonságainak kihasználása mellett (precizitás, gyorsaság, pontosság, széles gazdaspecifitás) nagyszámú mutáció és mutáció-kombináció bakteriális genomba építésére. Kutatásaink során sikerrel igazoltuk, hogy a DiVERGE módszere során alkalmazott mutagén oligonukleotidok nukleotid pontossággal képesek genomi célpontjuk mutagenézisére, akár egymilliószoros mutációs ráta emelkedést elérve a sejtek természetes mutációs folyamataihoz képest. A DiVERGE fejlesztése során bizonyítottuk, hogy ezen mutagén oligonukleotidok részlegesen átfedő alkalmazásával és genomba építésével teljes gének, illetve azok szabályozásáért felelős szekvenciák is egyidejűleg mutagenizálhatók. Mindezt kihasználva pedig sikeresen értünk el egyetlen mutáció-bevitelt több mint 9500 bázispárnyi, négy teljes bakteriális gént (*gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*) kódoló genomi szekvencián. Ezt követően pedig az egyetlen mutagenézis és igen magas mutációs ráta segítségével sikerrel demonstráltuk, hogy a DiVERGE módszere kiválóan alkalmas bakteriális jellegek irányított evolúciójára, olyan esetekben is, mely korábbi laboratóriumi evolúciós stratégiák felhasználásával nem vagy csak igen hosszú idő alatt vált volna megvalósíthatóvá.

III. Antibiotikum rezisztencia-evolúció nagy áteresztőképességű tanulmányozása

Ennek egy praktikus példjaként DiVERGE segítségével sikeresen térképeztük fel a bakteriális antibiotikum rezisztencia kialakulása mögött meghúzódó genomi mutációs folyamatokat, több antibiotikum család esetén is. A DiVERGE segítségével megvalósított célzott mutagenézis laboratóriumi körülmények között sokszorosára gyorsította az antibiotikum-célfehérje mutációi által megjelenő rezisztencia kialakulását, ezáltal pedig átfogóan vizsgálhattunk olyan antibiotikum rezisztencia folyamatok megjelenését is, melyek a tradicionális mikrobiológiai módszerekkel felfedezetlenek maradtak: nagyáteresztőképességű mutagenézis segítségével mindösszesen néhány nap időtartam alatt nagyszámú trimetoprim és fluoroquinolon-antibiotikum ellenes mutációt is sikerült felfednünk, mely közül számos a klinikai gyakorlatban is előfordult. Továbbá kihasználva a pORTMAGE széles gazdaspecifitását, ezen antibiotikum rezisztenciafolyamatok hatását rokon bakteriális törzsek között is összehasonlítottuk. Az azonos körülmények között összehasonlított rezisztencia folyamatok tanulmányozásából kiderült, hogy egyes mutációk hatása az antibiotikum toleranciára az anyatörzs genotípusától függően jelentős eltéréseket mutathat, továbbá törzs-függő rezisztenciafolyamatokat is feltártunk.

Végezetül pedig, a DiVERGE egyik legfontosabb gyakorlati előnyeként, sikerrel igazoltuk, hogy egy, ismert célponttal rendelkező, fejlesztés alatt álló antibiotikum (gepotidacin) feltételezett támadáspontjait mutagenizálva az ellene megjelenő rezisztenciafolyamatok még a klinikai alkalmazása előtt felfedhetők. Így feltételezéseink

szerint a DivERGE alkalmazása mind az alapkutatásban – az evolúciós folyamatok korábbiaknál átfogóbb vizsgálata révén - mind az alkalmazott kutatásban - a hatékonyabb irányított evolúciós stratégiák lehetővé tétele által - jelentős előnyökkel szolgál majd.

Ezen eredmények a *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 2018 június 19-ei kiadásában kerültek bemutatásra (115(25)E5726-E5735, <https://doi.org/10.1073/pnas.1801646115>), továbbá egy, a módszert lefedő szabadalom is benyújtásra került: Nyerges Akos Jozsef, Pal Csaba, Csorgo Balint, Kintses Balint (2017) Mutagenizing Intracellular Nucleic Acids, PCT/EP2017/082574.

Publikációk és szabadalmi bejelentések:

MTMT azonosító szám: 10043320

Elsőszerzős nemzetközi szakmai folyóiratban megjelent cikkek:

1*. **Nyerges, Á.**, Csörgő, B., Draskovits, G., Kintses, B., Szili, P., Ferenc, G., Révész, T., Ari, E., Nagy, I., Bálint, B., Vásárhelyi, B.M., Bihari, P., Számel, M., Balogh, D., Papp, H., Kalapis, D., Papp, B., Pál, C., 2018. Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance. PNAS 115, E5726–E5735. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801646115> IF: 9.504

2*. **Nyerges, Á.**, Csörgő, B., Nagy, I., Bálint, B., Bihari, P., Lázár, V., Apjok, G., Umenhoffer, K., Bogos, B., Pósfai, G., Pál, C., 2016. A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species. PNAS 201520040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520040113> IF: 9.661

* A jelenlegi PhD disszertáció alapjául szolgáló publikációk.

3. **Nyerges, Á.**, Csörgő, B., Nagy, I., Latinovics, D., Szamecz, B., Pósfai, G., Pál, C., 2014. Conditional DNA repair mutants enable highly precise genome engineering. Nucleic Acids Res 42, e62–e62. <https://doi.org/10.1093/nar/gku105>. IF: 9.112

4. **Nyerges, A.**, Balint, B., Cseklye, J., Nagy, I., Pal, C., Feher, T., 2018. CRISPR-interference based modulation of mobile genetic elements in bacteria. bioRxiv 428029. <https://doi.org/10.1101/428029> . IF: N.A.

Szabadalmi bejelentések:

5. **Nyerges Akos J**, Pal C, Csorgo B, Kintses B (2017) Mutagenizing Intracellular Nucleic Acids, PCT/EP2017/082574 (WO2018108987)
6. Tihomir Tomašič, Lucija Peterlin Mašič, **Akos Nyerges**, Csaba Pal, Danijel Kikelj, et al. LU100918, Luxembourgian Patent Application (2018) New class of DNA gyrase B and/or topoisomerase IV inhibitors with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria

Társszerzős nemzetközi szakmai folyóiratban megjelent cikkek:

7. Szili, P., Draskovits, G., Revesz, T., Bogar, F., Balogh, D., Martinek, T., Daruka, L., Spohn, R., Vasarhelyi, B.M., Czikkely, M., Kintses, B., Grezal, G., Ferenc, G., Pal, C.*, **Nyerges, A***, 2018. Antibiotic usage promotes the evolution of resistance against gepotidacin, a novel multi-targeting drug. bioRxiv 495630. <https://doi.org/10.1101/495630> IF: N.A.
8. Ricaurte, D.E., Martínez-García, E., **Nyerges, Á.**, Pál, C., Lorenzo, V. de, Aparicio, T., 2018. A standardized workflow for surveying recombinases expands bacterial genome-editing capabilities. *Microbial Biotechnology* 11, 176–188. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12846>. IF: 3.33
9. Kintses, B., Méhi, O.K., Ari, E., Számel, M., Györkei, Á., Jangir, P.K., Nagy, I., Pál, F., Fekete, G., Tengölics, R., **Nyerges, Á.**, Likó, I., Bálint, B., Vásárhelyi, B.M., Bustamante, M., Papp, B., Pál, C. (2018) Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota. *Nature Microbiology*, 10.1038/s41564-018-0313-5 IF: 14.174
10. Csörgő, B., **Nyerges, Á.**, Pósfai, G., Fehér, T., 2016. System-level genome editing in microbes. *Current Opinion in Microbiology* 33, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.005>. IF: 6.635
11. Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P.K., Kintses, B., Csörgő, B., **Nyerges, Á.**, Györkei, Á., Kincses, A., Dér, A., Walter, F.R., Deli, M.A., Urbán, E., Hegedűs, Z., Olajos, G., Méhi, O., Bálint, B., Nagy, I., Martinek, T.A., Papp, B., Pál, C., 2018. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nature Microbiology* 3, 718–731. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0164-0>. IF: 14.174

12. Kintsés, B., Méhi, O.K., Ari, E., Számel, M., Györkei, Á., Jangir, P.K., Nagy, I., Pál, F., Fekete, G., Tengölics, R., **Nyerges, Á.**, Likó, I., Bálint, B., Vásárhelyi, B.M., Bustamante, M., Papp, B., Pál, C., 2018. Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota. *bioRxiv* 385831. <https://doi.org/10.1101/385831>. IF: N.A.
13. Durcik, M., Lovison, D., Skok, Ž., Cruz, C.D., Tammela, P., Tomašič, T., Tiz, D.B., Draskovits, G., **Nyerges, Á.**, Pál, C., Ilaš, J., Mašič, L.P., Kikelj, D., Zidar, N., n.d. New N-phenylpyrrolamide DNA gyrase B inhibitors: Optimisation of efficacy and antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.011>. IF: 4.816
14. Guzman, G.I., Sandberg, T.E., LaCroix, R.A., **Nyerges, A.**, Papp, H., Raad, M. de, King, Z.A., Northen, T.R., Notebaart, R.A., Pal, C., Palsson, B.O., Papp, B., Feist, A.M., 2018. Enzyme promiscuity shapes evolutionary innovation and optimization. *bioRxiv* 310946. <https://doi.org/10.1101/310946>. IF: N.A.
15. Umenhoffer, K., Draskovits, G., **Nyerges, Á.**, Karcagi, I., Bogos, B., Tímár, E., Csörgő, B., Herczeg, R., Nagy, I., Fehér, T., Pál, C., Pósfai, G., 2017. Genome-Wide Abolishment of Mobile Genetic Elements Using Genome Shuffling and CRISPR/Cas-Assisted MAGE Allows the Efficient Stabilization of a Bacterial Chassis. *ACS Synth. Biol.* 6, 1471–1483. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00378>. IF: 5.382
16. Bódi, Z., Farkas, Z., Nevozhay, D., Kalapis, D., Lázár, V., Csörgő, B., **Nyerges, Á.**, Szamecz, B., Fekete, G., Papp, B., Araújo, H., Oliveira, J.L., Moura, G., Santos, M.A.S., Jr, T.S., Balázsi, G., Pál, C., 2017. Phenotypic heterogeneity promotes adaptive evolution. *PLOS Biology* 15, e2000644. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000644>. IF: 9.163
17. Lázár, V., Nagy, I., Spohn, R., Csörgő, B., Györkei, Á., **Nyerges, Á.**, Horváth, B., Vörös, A., Busa-Fekete, R., Hrtyan, M., Bogos, B., Méhi, O., Fekete, G., Szappanos, B., Kégl, B., Papp, B., Pál, C., 2014. Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. *Nat Commun* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5352>. IF: 11.47
18. Méhi, O., Bogos, B., Csörgő, B., Pál, F., **Nyerges, Á.**, Papp, B., Pál, C., 2014. Perturbation of Iron Homeostasis Promotes the Evolution of Antibiotic Resistance. *Mol Biol Evol* msu223. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu223>. IF: 9.105