

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója
Quarterly Bulletin of the Hungarian Biochemical Society

Szerkesztőbizottság:
GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS

Felelős szerkesztő:
SZÉKÁCS ANDRÁS

XXX. ÉVF. 3. SZÁM

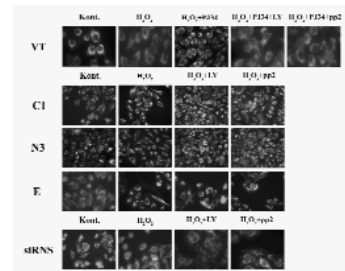
2006. SZEPTEMBER

A tartalomból:

- ◇ PARP-gátlás: a mitokondrium védelmének új útja – *Sümegei Balázs*
- ◇ A Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi vándorgyűlése – Előadás- és poszterösszefoglalók

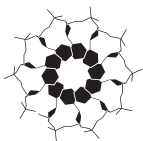
Címlapkép:

PARP-gátlás és különböző kinázinhibitorok hatása a mitokondriális membránpotenciálra oxidatív stresszben. Azonos mikroszkópos területről készült zöld és piros fluoreszcens képeket szuperponáltunk, hogy az alábbi kezelések mitokondriális membránpotenciálra történő hatását demonstráljuk. WRL-68 májsejteket pEGFP, C1 vagy N3 plazmidokkal transzfektált májsejteket, valamint PARP-siRNS módszerrel transzfektált májsejteket 3 órán át 0,3 mM H₂O₂, 10 μM PJ-34, 10 μM LY294002 vagy 10 μM PP2 reagenssel, illetve az említett vegyületek kombinációjával kezeltük. A kezelés után a sejteket mostuk, 10 percig JC-1 membránpotenciál-függő festékkel töltöttük, majd fluoreszcens mikroszkópra szerelt digitális kamera segítségével fényképeztük (ld. a vonatkozó közleményt az 50–53. oldalakon).



Contents:

- ◇ PARP inhibition: a novel pathway for mitochondrial protection – *Balázs Sümegei*
- ◇ The 2006 meeting of the Hungarian Biochemical Society – Lecture and poster abstracts



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6
e-mail: biokemia@nki.hu <http://www.webio.hu/biokemia>
Felelős kiadó: Dr. Fésüs László

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455
Készíti és terjeszti a **dART studio** (1137 Budapest, Újpesti rakpart 6. Tel.: 349-3426)
Ára • a Magyar Biokémiai Egyesület tagjai részére: tagdíj ellenében,
• nem egyesületi tagoknak: 680 Ft + postaköltség

WEB10
BioScience Portal

KÖRNYEZETVÉDELLEM - VÍZANALITIKA

GYORSTESZTEK



SZŰRŐPAPIROK MEMBRÁNSZŰRŐK SZŰRŐKARTONOK

A maximális minőség
munkakörülmények között!



IV-NAGEL

KVALITATÍV TESZTPAPIROK

pH - PAPIROK

KVALITATÍV TESZTPAPIROK



MACHERY-NAGEL (MN)

NAGYOBB TELJESÍTMÉNY KISEBB MÉRÉTBEN

liquiTOC IKA



Magas hőmérsékletű TOC és TN
1 KÉZSZERES ÉS PORTATÍV
TITRÁCIÓVAL SZENNYVÍZ SZÁRÍTÁSI
KÖRNYELTEK TÖLTÉSÉNEK AZ ELŐKÖZMŐK

VÍZANALITIKA

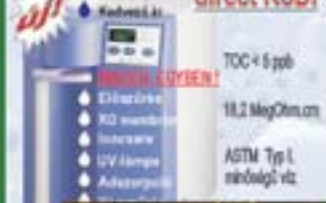
mobíl, laboratóriumi és on-line kivitelben



ULTRA TISZTA VÍZ

Csapatvízről tárogatóvizre!

- Kompakt
- Egyszerű
- Stokany
- Külső felület



EASypure[®] direct RoDi

TOC < 6 ppb
18,2 MgO/m³
ASTM Typ I
minőégi víz

NITROGEN / PROTEIN tartalom mérése

Dumas módszer szerinti egyszerű, automatizált analízis



- A Dumas módszer előnyei:
- hatalmas mennyiségű minták
 - nagy mintatartomány (1-100%)
 - kevesebb mintabehatás

Elementar GmbH elemanalizátorok

1 ppm...100% elemtartalomra



ELEMALIZIS FELSOROKON

RÁDIOAKTÍV SUGÁRZÁSMÉRŐ MŰSZEREK ÉS MONITOROK



1600 KERN



Mérlegek
Waagen und Prüfservice 2006

AUTOMATA VÍZMINTAVEVŐK

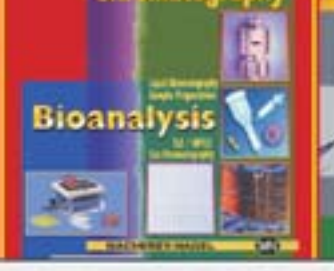
Rendelhető (mobíl) és telepített típusok.
A legjobb minőségű és legújabb generációs vízminőség vizelési, vízszint-vizelési mérőeszközök.
Működés nyitott vagy zárt.
Önálló működésű.
Külső, belső táplálás.



Desziliáció, extrakció, termokáció "nehéz" MÉRÉSEK KÖNYVEDÉN



Chromatography



AKTIVIT Kft.

H-1581-Budapest, Pf.: 104.
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA ELÉRHETŐ ÁRON

ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

MULTIPARAMETERES ÉLHŐTŐRŐK
MULTIPARAMETERES AUTOMATA ANALIZÁTOROK

LABORTECHNIKA, ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

PARP-gátlás: a mitokondrium védelmének új útja

PARP inhibition: a novel pathway for mitochondrial protection

Sümegei Balázs

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar,
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, 7624 Pécs,
Szigeti út 12., E-mail: balazs.sumegi@aok.pte.hu

Összefoglalás

A korábban elfogadott nézetek szerint a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP) gátlószerei megakadályozzák az enzim oxidatív stressz során történő aktiválódása következtében kialakuló NAD⁺- és ATP-depléciót, valamint a következményes nekrotikus sejthalált. Ugyanakkor, saját korábbi eredményeink arra mutattak, hogy a PARP katalizálta ADP-riboziláció hatással lehet jelátviteli útvonalakra, amelyeknek a túlélésben meghatározó szerepük lehet. Sejt kultúrában a PARP-aktivitást ismert farmakológiai ágenssel (PJ-34), illetve nemfarmakológiai úton, nevezetesen siRNA segítségével történő elnyomással, valamint a PARP N-terminális DNS-kötő doménjének (PARP-DBD) transzdomináns expressziójával gátoltuk, majd a sejteket oxidatív stressznek tettük ki. A PARP gátlása megvédte a sejteket az oxidatív károsodásoktól, miközben indukálta az Akt kináz foszforilációját, ezáltal aktiválódását. Az Akt aktiválódásának gátlása PI3- vagy Src kináz-inhibitorokkal a PARP-gátlás citoprotektív hatása ellen dolgozott, miközben ezek a gátlószerek nem befolyásolták a NAD⁺-depléciót. Következésképpen, a PARP-gátlás következtében fellépő Akt-aktiváció jelentős mértékben felelős a PARP-gátlók oxidatív stresszben mutatott citoprotektív hatásáért.

A reaktív oxigéngyökök (ROS) által okozott károsodások fontos szerepet játszanak számos betegség patogenezisében [1-3]. Különböző forrásokból származhatnak a szabadgyökök, pl. a xantin oxidáz rendszerből [1], a mitokondriális respirációs lánc tökéletlen működése következtében [2], az arachidonsav-anyagcsere ciklooxigenáz útvonalából [3] és a fagocitáló sejtek átmeneti respirációs aktivitás-fokozódása következtében, amelyek aztán – számos egyéb károsodás mellett – egyszerű DNS-töréseket okoznak [4]. A poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP, EC 2.4.2.30) multifunkcionális nukleáris enzim [5],

Sümegei, B.

University of Pécs, Medical School, Institute of Biochemistry and Medical Biology, H-7624 Pécs,
Szigeti út 12., E-mail: balazs.sumegi@aok.pte.hu

Summary

According to the classical view, the cytoprotective effect of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP) enzyme in oxidative stress was based on the prevention of NAD⁺ and ATP depletion, and so the attenuation of necrotic cell death. However, our previous data suggested that PARP-catalyzed ADP ribosylations may affect signaling pathways which can play a significant role in cell survival. We inhibited PARP activity either by a well-established pharmacological inhibitor (PJ34) or by non-pharmacological means, namely by suppressing PARP-1 expression by siRNA or by transdominantly expressing N-terminal DNA-binding domain of PARP-1 (PARP-DBD) in cell culture before exposing the cells to oxidative stress. PARP inhibition protected cells from oxidative damages and induced the phosphorylation and activation of Akt protein kinase. Inhibition of Akt activation by specific inhibitors of PI-3- and Src kinases counteracted the cytoprotective effect of PARP inhibition, but did not affect NAD⁺ depletion. In conclusion, PARP-inhibition-induced Akt activation is responsible in a considerable extent for the cytoprotective properties of PARP inhibitors in oxidative stress.

amelyet az egyszerű DNS-törések aktiválnak, és amely NAD⁺-ot használva szubsztrátumként különböző nukleáris fehérjéken, például hisztonokon és saját magán kovalensen kapcsolt, elágazó láncú poli-(ADP-ribóz)-szálakat szintetizál. A PARP-1 szerepet játszik a kromatin *remodeling* folyamatában, a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében; s ezeket a szerepeket részben poli-ADP-riboziláló aktivitása révén éri el [5]. Enyhe DNS-károsodás esetén a PARP-1 szükséges a hibajavításhoz [6], de oxidatív stressz során, amikor a nagy mennyiségű DNS-törés a PARP-1 túlzott

aktivációját okozza, az enzim depletálhatja a NAD⁺-ot, illetve a NAD⁺ reszintézisének nagy energiaigénye miatt az ATP-t is, ami sejthalált eredményez [7]. A PARP-inhibitorok védenek a miokardiális [8] és neuronális [9] ischemia, akut tüdőgyulladás [10], akut szeptikus sokk [11], zimogén-indukálta többszervi elégtelenség [12] és diabetikus pankréaszkárosodás [13] ellen, mutatva, milyen jelentős a túlzott PARP-1-aktiváció szerepe a sejthalál kiváltásában. A klasszikus elképzelés szerint a PARP-inhibitorok a NAD⁺- és ATP-depléciónak megakadályozásával védnek az oxidatív stressz ellen, de néhány új adat a citoprotekció egy sokkal összetettebb mechanizmusát sugalja [14, 15].

Kísérletesen bizonyított, hogy a PARP-aktiváció hozzájárulhat a mitokondriális károsodások [16] és a mitokondriális ROS-termelés [17] megnövekedéséhez, mutatva, hogy a PARP a magon kívüli folyamatokat is képes befolyásolni. Friss eredmények szerint létezik mitokondriális PARP, ami gátolható PARP-1-inhibitorokkal [18], ezért, fontos azt tisztázni, hogy a mitokondriumvédelem a mitokondriális ADP-riboszilációs folyamatok gátlásának egyenes következménye, vagy a nukleáris PARP-1 befolyásol olyan – egyelőre nem tisztázott – mechanizmusokat, amelyek a mitokondriális protekciót eredményezik. Saját korábbi eredményeink szerint PARP-inhibitorok az Akt foszforilációját, ezáltal aktivációját eredményezték lipopoliszahariddal kezelt egerek májában, tüdejében és lépében, ami annak lehetőségét veti fel, hogy a PARP-inhibitorok védő hatása a PI3-kináz/Akt útvonalon keresztül mediálódik [19]. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a PARP-inhibitorok védő hatása sokkal összetettebb lehet, mint a NAD⁺- és ATP-depléciónak megakadályozása, mivel az Akt kináz képes számos regulátorfehérje, így a GSK-3 β , a kaszpáz-9, a BAD vagy a FKHR foszforilálására [20], amely folyama-

tok közrejátszanak a mitokondriális membránrendszerek stabilizálásában [21, 22].

Módszerek

A PARP DNS-kötő doménjének transzdomináns expressziója. A PARP N-terminális DNS-kötő doménjének kódoló régióját (PARPN214, 1-214 aminosavak [23]) PCR technikával kiterjesztettük és „in-frame” pEGFP-C1/N3 vektorokba illesztettük be Hind III és EcoRI restriktions enzimekkel. Annak érdekében, hogy a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) tartalmazó PARP-N214 a magba juthasson, az erősítéshez nukleáris lokalizációs szignált (NLS) kódoló PCR-primer alkalmaztunk. A rekombináns pPARPGFP-C1/N3 vektorokat tranziensen transzfektáltuk WRL-68 humán májsejttvonalba Lipofectamine2000 segítségével. Hatásos transzdomináns expresszió érdekében egy második transzfekeciót is végeztünk.

A PARP-1 szuppressziója kis interferáló RNS (siRNS) technikával. WRL-68 sejteket tranziensen transzfektáltunk a PARP-1 szuppressziójára tervezett siRNS-sel Lipofectamine2000 segítségével. A PARP hatásos elnyomása érdekében még két transzfekeciót végeztünk.

Western blot analízis. A sejteket 3 órán át H₂O₂-tartalmú médiumban tartottuk inhibitorok jelenlétében és távollétében, majd proteáz- és foszfatázgátlót tartalmazó pufferben homogenizáltuk. Zsebenként 35 μ g fehérjét vittünk fel 12%-os poliakrilamid-gélre, és blotolást követően a nitrocellulózmembránt 5%-os zsírmentes tejben 1:1000 arányban hígított primer antitestoldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A második antitest torma-gyóker peroxidáz enzimhez konjugált anti-nyúl IgG volt, a vizualizálást SuperSignal West Pico kemilumineszcenciás szubsztrátum használatával végeztük. Minden kísérletet négyszer ismételtünk.

Fluoreszcens mikroszkópia. A vad típusú vagy transzfektált WRL-68 sejteket poli-L-lizinnel borított



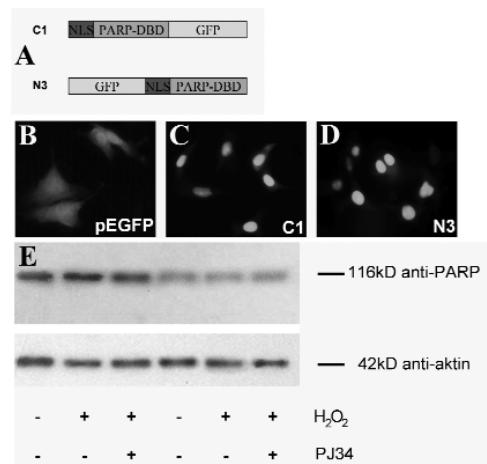
Sümegi Balázs 1975-ben szerzett okleveles vegyész diplomát a szegedi József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karán, azóta a Pécsi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetében (jelenleg PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) dolgozik. Egyetemi doktor (1978), biológiai tudományok kandidátusa (1987) és biológiai tudományok doktora (1990) fokozatot szerzett, 1994-től tanszékvezető egyetemi tanár. Vendégkutatóként, illetve vendégprofesszorként dolgozott a *University of Texas, Health Science Center* és a *Veterans Administration, Medical Center* intézetekben (1983–84, 1985–88). A PTE ÁOK dékánja (1996–99 és 2003–06). Korábbi tudományos eredményei az enzimrendszerek szupramolekuláris szerveződése a mitokondriumban, *in vivo* szubsztrátchannelling, valamint metabolitok *in vivo* kompartmentalizációja témákban születtek. Jelenlegi tudományos érdeklődése az oxidatív stressz molekuláris mechanizmusa, a PARP-aktiváció jelátviteli hatásai és új gyógyhatású anyagok kifejlesztése témakörökhöz kapcsolódik.

(2,5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) üvegfedőlemezekre tenyésztettük. A kezeléseket után a lemezeket mostuk, a sejteket JC-1 membránpotenciál-függő festékkel feltöltöttük 10 percig, majd ColorView CCD kamerával és analySISR szoftverrel felszerelt Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal fényképeket készítettünk 60-szoros nagyítású objektív alatt. A GFP fluoreszcenciához 450–490 nm gerjesztési és $>520\text{nm}$ emissziós (zöld) fényszűrőket használtunk. JC-1 fluoreszcenciához ugyanarról a látómezőről 546 nm *bandpass* gerjesztési és $>590\text{nm}$ emissziós (piros), majd zöld fényszűrővel készült kép.

Eredmények

Az 1. ábra mutatja a nukleáris lokalizációs szignálból, a PARP DBS-kötő doménjéből és a zöld fluoreszcens fehérjéből álló kétféle fúziós fehérjét (1. ábra, A), amelyeket a PARP aktivitásának nemfarmakológiai úton történő kompetitív gátlására készítettünk. A GFP következtében fluoreszcens mikroszkóppal jól látható, hogy transzfekeciót követően a fúziós fehérje valóban bejutott a magba (az NLS-nak köszönhetően) (1. ábra, C,D), míg az üres plazmidaal transzfekeciált sejtben a GFP egyenletesen oszlott el a sejtben belül. (1. ábra, B). A PARP-1 fehérje elnyomására tervezett PARP-siRNS révén jelentősen lecsökkent a PARP fehérje mennyisége WRL-68 sejtekben a transzfekeciót követően (1. ábra, E), továbbá az is látszik, hogy sem az oxidatív stressz, sem a farmakológiai inhibitor jelenléte nem befolyásolta a PARP fehérje expresszióját sem normál körülmények között sem siRNS módszerrel végzett szuppresszió során (1. ábra, E).

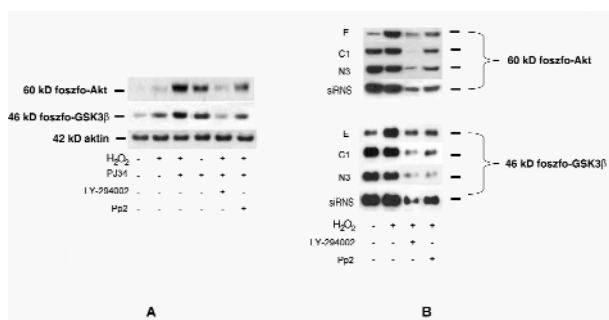
A 2. ábra mutatja, hogy a dokumentáltan citoprotektív Akt kináz oxidatív stressz hatására foszforilálódott, ezáltal aktiválódott. Aktiválódása következtében megnőtt célfehérjéje, a GSK3 β foszforilációja is. A PARP-gátló PJ-34 ugyancsak megnövelte mindkét fehérje foszforilációját oxidatív stressz távollétében is, ugyanakkor, még erőteljesebben megnövelte az Akt aktivációját oxidatív stressz körülményei között. A kináz jelátviteli folyamatban az Akt előtt álló PI-3 és Src kinázok inhibitorai érhető módon megakadályozták az Akt akár oxidatív stressz, akár PARP-gátló hatására bekövetkező foszforilációját (2. ábra, A). A PJ-34 hatásával teljesen azonos módon viselkedtek a PARP-siRNS-, illetve a PARP-DBD-expresszááló sejtek. Mivel ezekben a sejtekben a PARP folyamatos gátlás



1. ábra A PARP DNS-kötő domén (PARP-DBD) transzdomináns expressziójának hatása a hepatociták túlélésére. PARP-DBD GFP fúziós fehérje konstrukciója (A). WRL-68 májsejteket pEGFP (B), C1pEGFP (C) vagy N3pEGFP (D) plazmidaal transzfekeciáltunk. A GFP fluoreszcenciáját fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. A WRL-68 májsejteket PARP-siRNS módszerrel transzfekeciáltuk, majd 0,1 mM H₂O₂ vagy 1 mM H₂O₂ + 10 μM PJ-34 reagenssel kezeltük őket 1 órán át. A PARP elnyomását anti-PARP primer antitest felhasználásával, Western blot technikával detektáltuk (E). A felvitt fehérjemennyiségek azonos voltát anti-aktin antitesttel ellenőriztük. 1-3. minta: vad típusú sejtek; 4-6. minta: PARP-siRNS módszerrel transzfekeciált sejtek.

alatt állt, ezért a sejtek kezelés nélkül a PJ-34-kezelt sejtekre hasonlítottak (2. ábra, B). Ugyanakkor az LY292002 és a PP2 ezekben a sejtekben is megakadályozta az Akt aktivációját.

Az oxidatív stressz hatására bekövetkező mitokondriális károsodások *in vivo* követésére a JC-1, speciális membránpotenciál-függő mitokondriális festéket alkalmaztunk. A festék megfelelő koncentrációban akkumulálódik a mitokondrium membránjában, és piros fluoreszcenciát mutat. Enyhe depolarizáció során a membrán elengedi a festék egy részét, és a fluoreszcenciája zöldre vált, míg a membránpotenciál teljes elvesztésével elengedi az összes festéket, és megszűnik a fluoreszcencia. Enyhe oxidatív stressznek (0,3 mM H₂O₂ 3 órán át) tettünk ki vad típusú, valamint pEGFP, C1, N3 plazmidaal, illetve PARP-siRNS módszerrel transzfekeciált WRL-68 májsejteket 10 μM PJ-34, 10 μM LY294002 vagy 10 μM PP2 jelenlétében és hiányában. A kezelés után JC-1 festékkel töltöttük fel a sejteket, és azonos területekről a mikroszkóp zöld és piros csatornájában is készítettünk képeket róluk. Az egészséges sejtekről készült képek élesek voltak,



2. ábra Az Akt útvonal aktiválódása oxidatív stressz, PARP-gátlás és különböző kinázinhibitorok hatására. Az Akt aktivációját és célfehérjéje, a GSK3 β foszforilálódását tanulmányoztuk WRL-68 májsejtekben foszforilációs-specifikus primer antitestek (P-Ser473Akt és P-Ser9GSK3 β) és Western blot módszer segítségével. Vad típusú (A), illetve PARP-siRNS, pEGFP, C1 vagy N3 konstrukciókkal kezelt (B) WRL-68 sejteket 1 órány át 1 mM H₂O₂, 10 μ M PJ-34, 10 μ M LY294002 vagy 10 μ M PP2 reagenssel, illetve az említett vegyületek kombinációjával kezeltük. Önmagában a LY294002 és a PP2 nem befolyásolta a vizsgált fehérjék foszforilálódását (nincs dokumentálva). A fekvitt fehérjemennyiségek azonos voltát anti-aktin antitesttel ellenőriztük.

és jelentős mértékben volt bennük piros fluoreszcens komponens, ugyanakkor a károsodott sejtek zöldre fluoreszkáltak, és sokkal elmosódottabbak voltak. H₂O₂ hatására jelentősen károsodtak a sejtek, ami lecsökkent mitokondriális membránpotenciálban is megnyilvánult. A PARP gátlása – függetlenül a gátlás módjától – megakadályozta a H₂O₂ mitokondriumkárosító hatását, ugyanakkor, a specifikus kinázinhibitorok visszafordították a PARP-gátlás védő hatását (3. ábra).

Mind a siRNS, mind a PARP-DBD konstrukció a PARP-1 szekvenciája alapján készült, így kísérleteink nyomán egyértelművé vált, hogy a nukleáris PARP aktivációja, és nem egyéb ADP-ribózilációs folyamatok felelősek az oxidatív stressz kiváltotta mitokondriális károsodás mediálásában.

3. ábra (lásd a címlapon) PARP-gátlás és különböző kinázinhibitorok hatása a mitokondriális membránpotenciálra oxidatív stresszben. Azonos mikroszkópos területről készült zöld és piros fluoreszcens képeket szuperponáltunk, hogy az alábbi kezelések mitokondriális membránpotenciálra történő hatását demonstráljuk. WRL-68 májsejteket pEGFP, C1 vagy N3 plazmidokkal transzfektált májsejteket, valamint PARP-siRNS módszerrel transzfektált májsejteket 3 órány át 0,3 mM H₂O₂, 10 μ M PJ-34, 10 μ M LY294002 vagy 10 μ M PP2 reagenssel, illetve az említett vegyületek kombinációjával kezeltük. A kezelés után a sejteket mostuk, 10 percig JC-1 membránpotenciál-függő festékkel töltöttük, majd fluoreszcens mikroszkópra szerelt digitális kamera segítségével fényképeztük.

Az is valószínűnek látszik, hogy a PARP aktivitása, nem pedig a fehérje jelenléte az, ami a nekrotikus sejthalál kiváltásához hozzájárul. Ugyanis mindhárom módszer, a farmakológiai gátlás, a fehérje mennyiségének elnyomása, illetve a kompetitív, de nem farmakológiai gátlás, a PARP-DBD transzdomináns expressziója ugyanazokat a hatásokat váltotta ki. Ráadásul, ez utolsó esetben a PARP-1 intakt módon jelen volt a sejtben, csupán versengenie kellett a katalitikus aktivitással nem bíró PARP-DBD fehérjével az egyszálú DNS-törésekhez való kötődésért. Mindezek alapján a PARP-1 fontos terápiás célpont az összes oxidatív stresszel járó megbetegedésben.

Irodalomjegyzék

- [1] Xia, Y., Khatchikian, G., Zweier, J. L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**: 10096–10102.
- [2] Turners, J. F., Bovanis, A. (1980) *Biochem. J.*, **156**: 434–444.
- [3] Rowe, G. T., Manson, N. H., Caplan, M., Hess, M. L. (1983) *Circ. Res.*, **53**: 584–591.
- [4] Martin, D., Salinas, M., Fujita, N., Tsuruo, T., Cuadrado, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**: 42943–42952.
- [5] D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. G. (1999) *Biochem. J.*, **342**: 249–268.
- [6] de Murcia, G., Menissier de Murcia, J. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 172–176.
- [7] Jagtap, P., Szabo, C. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**: 421–440.
- [8] Zingarelli, B., Salzman, A. L., Szabo, C. (1998) *Circ. Res.*, **83**: 85–94.
- [9] Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., Dawson, V. L. (1997) *Nat. Med.*, **3**: 1089–1095.
- [10] Liaudet, L., Pacher, P., Mabley, J. G., Virag, L., Soriano, F. G., Hasko, G., Szabo, C. (2002) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**: 372–377.
- [11] Soriano, F. G., Liaudet, L., Szabo, E., Virag, L., Mabley, J. G., Pacher, P., Szabo, C. (2002) *Shock*, **17**: 286–292.
- [12] Szabo, C., Lim, L. H., Cuzzocrea, S., Getting, S. J., Zingarelli, B., Flower, R. J., Salzman, A. L., Perretti, M. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**: 1041–1049.
- [13] Burkart, V., Wang, Z. Q., Radons, J., Heller, B., Herceg, Z., Stingl, L., Wagner, E. F., Kolb, H. (1999) *Nat. Med.*, **5**: 314–319.
- [14] Veres, B., Radnai, B., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Berente, Z., Osz, E., Sumegi, B. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**: 247–255.
- [15] Palfi, A., Toth, A., Kulcsar, G., Hanto, K., Deres, P., Bartha, E., Halmosi, R., Szabados, E., Czopf, L., Kalai, T., Hideg, K., Sumegi, B., Toth, K. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press
- [16] Murriel, C. L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L. I., Mochly-Rosen, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**: 47985–47991.
- [17] Halmosi, R., Berente, Z., Osz, E., Toth, K., Literati-Nagy, P., Sumegi, B. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **59**: 1497–1505.
- [18] Du, L., Zhang, X., Han, Y. Y., Burke, N. A., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Graham, S. H., Carcillo, J. A., Szabo, C., Clark, R. S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 18426–18433.
- [19] Veres, B., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Berente, Z., Osz, E., Szekeres, G., Szabo, C., Sumegi, B. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**: 1373–1382.
- [20] Scheid, M. P., Woodgett, J. R. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**: 760–768.
- [21] Virag, L., Salzman, A. L., Szabo, C. (1998) *J. Immunol.*, **161**: 3753–3759.
- [22] Hong, S. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**: 259–264.
- [23] Kim, J. W., Won, J., Sohn, S., Joe, C. O. (2000) *J. Cell. Sci.*, **113**: 955–961.
- [24] Shah, G. M., Poirier, D., Duchaine, C., Brochu, G., Desnoyers, S., Lagueux, J., Verreault, A., Hoflack, J.-C., Kirkland, J. B., Poirier, G. G. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**: 1–13.
- [25] Tapodi, A., Debreceni, B., Hanto, K., Bogнар, Z., Wittmann, I., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Sumegi, B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 35767–35775.

A Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi vándorgyűlése

(Pécs, 2006. augusztus 30. – szeptember 2.)

Előadás- és poszterösszefoglalók

E1 – Plenáris előadások

E1-01 Poli-ADP-ribosziláció indukálta jelátviteli folyamatok oxidatív stresszben

Sümegei B., Tapodi A., Debreceni B., Hantó K., Bognár Z., Gallyas F.
PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Oxidatív stresszben egyes szálú DNS-törések keletkeznek, melyek aktíválják a poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) enzimet. A túlzott mértékű PARP-aktivitás celluláris NAD⁺-deplecióhoz vezethet, melyet a sejt megpróbál a NAD⁺ reszintézisével megakadályozni, ami ATP-depleciót, majd sejtpusztulást vonhat maga után. A klasszikus modell szerint a PARP-gátlók a NAD⁺- és ATP-deléció megakadályozásán keresztül fejtik ki protektív hatásukat. Ugyanakkor korábbi munkáink jelezték, hogy a PARP-gátlás szintetikus PARP-inhibitorokkal hatással van a jelátviteli folyamatokra. Három eljárást alkalmaztunk a PARP-1 gátlására: (1) szintetikus PARP-gátlókat, (2) a PARP-fehérjeszintézis elnyomását siRNA-sel és (3) a PARP DNS-kötő, de katalitikusan inaktív doménjének túlexpresszióját. Mindhárom módszerrel kimutatható volt a PARP-gátlás citoprotektív hatása, és hogy ez védte a mitokondriális membránpotenciál oxidatív stresszben indukált összeomlását. Mindhárom gátlástípusnál megfigyelhető volt egy Src-kináz-, PI-3-kináz mediálta Akt-aktiváció, és az, hogy a kinázszkádok specifikus gátlása felfüggeszti a PARP-gátlók protektív hatását, jelezve, hogy citoprotektív hatás jelentős mértékben az Akt-aktiváción keresztül valósul meg. A PARP-gátlási módszerek egy részénél kizárható volt a direkt mitokondriális hatás, így a mitokondriumot védő hatás is feltehetően a jelátviteli folyamatok modulálásán keresztül lép fel, melyet jól alátámasztott az is, hogy az Src-kináz-PI-3-kináz-Akt-aktiváció gátlása felfüggesztette a PARP-gátlók mitokondriumvédő hatását. A PARP-gátlás okozta citoprotektív hatás meghatározó része tehát az Src-kináz-PI-3-kináz-Akt-aktiváción keresztül valósul meg, alapvetően új értelmezést adva a PARP-gátlók citoprotektív hatásának.

E1-02 Az öröklődő pancreatitis molekuláris mechanizmusai

Sahin-Tóth M.
Dept. of Molecular and Cell Biology; Boston Univ, Boston, MA, USA

A hereditár pancreatitis dominánsan öröklődő autoszómális betegség, ami az esetek túlnyomó többségében a kationos tripszinogén génjének valamilyen pontmutációjához társul. Kísérleteinkben irányított mutagenézissel előállított mutáns humán tripszinogének biokémiai vizsgálatával kerestük azt a közös mechanizmust, melynek révén a különböző mutációk pancreatitishez vezethetnek. Eredményeink szerint: (1) A következetesen kimutatható fenotipikus változás a mutáns tripszinogének fokozott autoaktivációja, ami egyaránt kimutatható az aktivációs peptid és a tripszinmutánsok esetében. (2) A kationos tripszinogénnel kívül más, a tripszinogénrendszerhez funkcionálisan kapcsolódó gének mutációi is vezethetnek fokozott tripszinaktivitáshoz. Az egyik ilyen genetikai tényező a pancreatikus szekretoros tripszininhibitor génjének olyan mutációja, amely csökkenti az inhibitor tripszinaktivitással szembeni védő hatását a pancreasban. (3) Az egyik humán tripszin izoenzim, az ún. mezotripszin funkciója az, hogy képes lebontani a tripszininhibitorokat. Potenciálisan a mezotripszin fokozott aktivitása a tripszinaktivitás növekedéséhez vezethet a pancreasban. (4) Megismertünk olyan, az anionos tripszinogén génjét érintő mutációkat, melyek a tripszinogén fokozott lebomlásához vezetnek. Ezek a mutációk – szemben a kationos tripszinogénmutációival – csökkent tripszinaktivitást eredményeznek és védő hatásúak a pancreatitis kialakulásával szemben. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a hereditár pancreatitis kialakulásának molekuláris mechanizmusában a közös nevező a kórosan megemelkedett intrapancreatikus tripszinaktivitás lehet, ami szöveti emésztődéshez és következményes gyulladáshoz vezet.

E2 – Szerkezeti biológia

E2-01 Dajkafehérjék és sejtvesztés hálózatok

Csermely P., Kovács I., Szalay M., Korcsmáros T., Sóti Cs.

SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

A dajkafehérjék (más néven molekuláris chaperonok, stresszfehérjék vagy hő sokkfehérjék) a tradicionális, molekuláris szintű kép szerint a sejtekben frissen szintetizálódott vagy natív konformációjukból kibillent, károsodott fehérjék aggregáció elleni védelmében, illetve helyreállításában segédkező fehérjék nagy családját alkotják. Az elmúlt tíz évben néhány mérföldkőnek számító kísérleti megfigyelés és a rendszerszintű adatok nagy tömege ráirányította a figyelmet arra, hogy a dajkafehérjék funkcionális jelentősége egy másik szinten, a sejt szintjén is tetten érhető. A kibontakozó kép szerint a dajkafehérjék némelyike a sejtvesztés hálózatban igen sajátos helyet foglal el. E dajkafehérjék alacsony affinitású, tranzien (gyenge) kötésekkel kötődnek a többi fehérjéhez, és a sejtvesztés által alkotott komplexeket (csoportokat, modulokat) kötik össze egymással úgy, hogy e modulok átfedéseiben foglalnak helyet. E dajkafehérjék olyan fehérjékhez kötődnek, amelyeknek sok szomszédja van az adott sejtvesztés hálózatban, azaz amelyek csomópontoknak tekinthetők. A dajkafehérjék modulok, modulokat összekapcsoló szerepe a sejtvesztés hálózatának kapcsolódási pontjain is megfigyelhető. Itt a sejtvesztés a mitokondriumok szétválasztásához vezet, amely a sejt túlélésének igen hatékony és a molekuláris szintű védelemnél magasabb szinten jelentkező eszköze. A dajkafehérjék e tulajdonságai minden bizonnyal hozzájárulnak ahhoz, hogy a sejt jelátvitelében és génextpressziójában pufferelő szerepet töltenek be, és a külső (vagy betegségből illetve öregedésszerű fakadó „belső”) stressz hatásait a sejt ugrásszerű változásai tudják konvertálni. E tulajdonságukkal a dajkafehérjék igen fontos szerepet töltenek be az evolúció sebességének szabályozásában.

E2-02 Egy új 16,2 kDa hő sokkfehérje citoprotektív hatásának jellemzése

Bellei Sz.^{1,2}, Szigeti A.^{1,2}, Boronkai Á.^{1,2}, Bognár Z.¹, Hocsák E.¹, Solti Izabella¹, Pozsgai É.¹, Gallyas F.¹, Sümegei B.¹

PTE, ÁOK, ¹ Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, ² Onkoterápiás Intézet

Génbank-adatbázisban homológiai keresés során fedeztünk fel egy eddig ismeretlen funkciójú fehérjét, melynek szekvenciája hasonlóságot mutatott az alphaB-crystallin fehérjéhez. A fehérje cDNA-ét a génbank adatai alapján placenta teljes-mRNS-készletből erősítettük ki PCR módszerrel, majd expressziós vektorokba klónoztuk. Az expresszált rekombináns fehérjével szemben poliklonális nyúl ellenanyagot fejlesztettünk ki. Mivel hő sokk hatására a fehérje megnövekedett mennyiségben termelődik különféle sejtvesztés hálózatokban, homológiai mutató az alphaB-crystallin fehérjével, és a móltömege 16,2 kDa, kis molekulatömegű hő sokkfehérje 16,2-nek (Hs16,2) neveztük el. HeLa sejtekben, ahol nagy mennyiségben termelődik a Hs16,2 fehérje, dsRNA technikával való elnyomása hatására a sejtvesztés fokozottabb pusztulását tapasztaltuk Taxol- és hidrogén-peroxid-kezelés során. azonban, NIH3T3 egérfibroblaszt-sejtekben való túlexpresszió hatására citoprotektív hatását figyeltük meg azáltal, hogy gátolta a proapoptikus citokróm c kiáramlását a mitokondriumból, az AIF nukleáris transzlokációját és a kaszpáz-3 enzim aktivációját. A rekombináns Hs16,2 fehérje direkt módon adva védte a mitokondriális membránpotenciál kalciumindukálta összeomlását *in vitro* rendszerben. Aggregátumokat alkot, továbbá specifikusan kötődik a Hsp90 fehérjéhez. A Hsp90 gátlása geldanamycinnel felfüggesztette a fehérje citoprotektív hatásait, amely alapján következtetjük, hogy a hatásmechanizmus egyik útvonala feltehetőleg Hsp90-mediált. Hs16,2 túlexpresszió hatására fokozott „lipid-raft”-képződést figyeltünk. A fehérje túlexpressziója és elnyomása során a jelátviteli útvonalak vizsgálá-

ta során megfigyeltük, hogy a citoprotektív hatásért felelős az Akt-, Erk-útvonal aktivációja és a p38 útvonal gátlása. Humán neuroektodermális daganatokban a grádus fokozódásával növekedett a fehérje expressziója, változott az intracitoplazmatikus lokalizációja.

E2-03 Escherichia coli IbpA és IbpB a sejt membránjainak őre

Balogi Zs.¹, Glatz A.¹, Jósavay K.¹, Nagy E.¹, Balogh G.¹, Debreczeny M.¹, Juhász K.¹, M. Matuszewska², K. Liberek², A. Mogk³, B. Bukau³, P. Goloubinoff⁴, Vigh L.¹, Horváth I.¹

¹ MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ² Univ. Gdansk, Gdansk, Poland;

³ Univ. Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁴ Univ. Lausanne, Lausanne, Switzerland

Az *Escherichia coli* két kis molekulatömegű hőszokkfehérjeje (sHsp) az IbpA és az IbpB. Ezek a sHsp-k extrém magas hőmérsékleten gátolják a proteinek denaturációját *in vivo*. Szignifikáns mértékű fehérjevédelmet azonban csak huzamosabb idejű hőstressznek kitett sejtekben mutatnak. Ugyanakkor több sHsp-ről (pl. a cianobakteriális Hsp17, a *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16,3) ismeretes, hogy képesek megóvni nemcsak a fehérjék épségét, de a membránok integritását is különféle stresszhatások során. Vad típusú, $\Delta ibpAB$ és IbpA+, IbpB+, IbpAB+ „revertáns” sejtekkel végzett tesztek arra engednek következtetni, hogy az *E. coli* sHsp-k közvetlenül befolyásolják a sejtmembránok fizikai tulajdonságait. Az IbpA és IbpB hatékonyan képesek regulálni a membránok permeabilitását és azok perifériális régiójának fluiditását jellemzőit *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Minthogy a membránvédelemben az IbpA, a dajkafehérje funkcióban pedig az IbpB mutatkozik hatásosabb védelmi eszközként, kirajzolódni látszik egy, az IbpA-IbpB-összetétel változtatásával szabályozható, kettős védelmi tulajdonsággal rendelkező heterokomplex működése magas hőmérsékleti stressz során.

E2-04 A matrilin-2 oligomer szerkezete

O. Sicora¹, Kravjár I.¹, S. Müller², Rottenberger Zs.¹, H. Sheng¹, R. Wagener², Deák F.¹

¹ MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ² Univ. Cologne, Medical Fac., Center for Biochemistry, Cologne, Germany

A matrilin-2 a tömött- és lazarusos kötőszövet sejt-közötti állományának alkotórésze, de többféle hámsejt is termeli. Korábban elektroforézissel és elektronmikroszkópiával a fehérjét mono-, di-, tri- és tetramerek keveréként mutattuk ki. Ugyanakkor az oligomerképződésért feltételezésünk szerint felelős, a fehérjelánc COOH-végén található 35 aminosav *in vitro* α -helikális *coiled coil* struktúrát képez, amely trimert formát. Tehát az oligomerizációt a fehérje többi része is befolyásolja. Ennek felderítésére mini matrilin-2 fehérjeváltozatokat termeltettünk 293-EBNA emlősejtvonalban, tisztítottunk sejt-kultúra-folyadékból és jellemeztünk Mindegyik rekombináns fehérjeváltozat hordozta a fehérje második von Willebrand-faktor A-modulját és a *coiled-coil* oligomerizációs modul. A kettő közötti, mintegy 75 aminosav, a matrilin-2 egyedi zsemgense vagy hiányzott, vagy kétféle formában volt jelen, amelyek alternatív RNS-vágás következtében 19 aminosavban különböztek. Immunblot- és MALDI-ToF-analízissel bizonyítottuk, hogy a matrilin-2 alapvetően trimert képez, de kimutattuk a két teljes fehérjéből és egy *coiled-coil* részből felépülő részleges trimert is, amely proteolitikus hasítással jön létre. A hasítás helye az egyedi modul. A hosszabb matrilin-2 monomert hordozó trimerek viszont multimerékké kapcsolódnak az egyedi modul közepén lévő egyetlen cisztein révén. Tehát a matrilin-2 – alternatív RNS-vágás és egyedi moduljában bekövetkező proteolitikus hasítások révén – többféle oligomerizációs formát alakít ki, amely szükséges a fonalas hálózat szerkezeti és funkcionális komplexitásához. (OTKA T034729, T049608, GVOP 3.1.1.-2004-05-0267/3.0)

E2-05 Retrovirális proteázok összehasonlító specifikitásvizsgálata

Tózsér J., Eizert H., Sperka T., Kádás J., Miklóssy G., Boross P. és Bagossi P.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A HIV-1 proteáz (PR) kiváló kemoterápiás célpontnak bizonyult az AIDS-terápiában, és számos PR-inhibitorot használnak napjainkban a klinikai gyakorlatban, azonban viszonylag gyakran fejlődik ki rezisztencia ellenük. Számos, a rezisztenciában megjelenő aminosav-oldallánc megtalálható más retrovirális PR-ekvivalens helyén, ezért a retrovirális proteázok összehasonlító specifikitásvizsgálata segíthet a rezisztencia molekuláris okainak megértésében és rezisztencia kialakulásával szemben ellenálló inhibitorok tervezésében. Tizenegy olyan retrovirális proteáz szubsztrátspecifikitását hasonlítottuk össze, melyek közt mindegyik

retrovírus-alcsaládnak legalább egy képviselője volt. A vizsgálatokhoz egy szisztematikusan felépített, HIV-1 Gag hasítási helyen alapuló oligopeptid-sorozatot használtunk. A molekuláris modellezéssel vizsgált proteázok hasonló P1-preferenciát mutattak, míg a P2 hely kritikusnak mutatkozott a szubsztrátspecifikitás meghatározásában. Nagyobb változatosságot észleltünk a P3-as és P4-es pozíciókban. A proteázok specifikitásai jól korreláltak a proteázszekvencián alapuló filogenetikus rokonsággal. További vizsgálatainkban retrovírusok természetes hasítási szekvenciáit tartalmazó peptidsorozatban mért kinetikai állandókat hasonlítottuk össze néhány reprezentatív enzim esetében. Vizsgálataink alapján kapott általános szubsztrátszekvenciák hasonlóságot mutatnak retrotranszpozon hasítási helyek szekvenciáival. A proteázok inhibitorosorozattal felvett gátlási profiljai azt sugallják, hogy a retrovirális proteázok szubsztrátspecifikitása lényegesen jobban konzervált, mint érzékenyséjük az inhibitorokkal szemben. (OTKA T43482, F34479, F35191)

E2-06 Egy tripszinszerű, autoaktiválódásra képes mutáns kimotripszin térszerkezete

Jelinek B.¹, Katona G.², Venekei I.¹, Fodor K.¹, Gráf L.¹

¹ ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék; ² LCCP/IBS, Grenoble, France

Az S189D+A226G kimotripszin kettős mutáns az eddigi legsikeresebb próbálkozás a kimotripszin specifikitási profiljának tripszinszerűvé alakítására, és a mutáns a tripszinhez hasonlóan autoaktiválódásra képes. A tripszinszerű tulajdonságok szerkezeti hátterének vizsgálatához meghatároztuk a mutáns kristályszerkezetét, 2,2 Å felbontással. A kimotripszinszerű S189D mutáns szerkezetével összehasonlítva jól látszik, hogy az A226G csere jelentős változásokat okoz az S1 szubsztrátkötő hely szerkezetében: a 226-os alanin és a 191-220 diszulfid közötti kölcsönhatás megszűnt, így a diszulfid a kettős mutánsban a zseb belsejéből kifordulva a vad típushoz hasonló pozícióba kerül. Másik fontos különbség a tripszinszerű specifikitásért felelős Asp189 pozíciója: a kettős mutánsban – ahogyan azt a specifikitási profil előrejelezte – az oldallánc a tripszinhez hasonlóan a szubsztrátkötő zseb belsejé felé néz. Az Asp189 új konformációját stabilizáló kölcsönhatások azonban jelentősen eltörzítik a zsebet alkotó hurkok szerkezetét. Feltehetően ez okozza, hogy – az S189D mutánshoz hasonlóan – az Asp194 oldallánc zimogénszerű konformációban van, és az oxianion üreg sem alakul ki. Az autolízishurok konformációja is hasonló: a szubsztrátkötő hely jelentős részét elfoglalva H-kötést alakít ki a 195-ös aktív szerinnel. A kristályban megfigyelt szerkezetből az enzimaktivitás teljes hiánya következik, ezért feltételezzük, hogy oldatban más, aktív szerkezet(ek) is kialakulhat(nak). Ezt erősítik meg pH-függésvizsgálataink is. Eredményeink és korábbi mérések azt mutatják, hogy az S1 szubsztrátkötő helyre bevitt mutációk az egész aktivációs domén stabilitását befolyásolhatják.

E2-07 Egy immunológiai szempontból jelentős szerin proteáz enzim autoaktiválódásának mechanizmusa

Gál P.¹, Kocsis A.¹, Harmat V.², Barna L.¹, Ambrus G.¹, R. B. Sim³, Náray-Szabó G.², Závodszy P.¹

¹ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ² ELTE, TTK, MTA Fehérszerkezet Kutatócsoport, Budapest; ³ MRC, Immunochemistry Unit, University of Oxford, UK

A proteáz enzimek szabályozásának egyik fontos mechanizmusa az, hogy ezen enzimek általában zimogén formában képződnek, és aktivitásukat – megfelelő helyen és időben – egy belső peptidkötés hasadása révén nyerik el. Számos esetben egy másik aktív proteáz hasítja a zimogént, azonban vannak autoaktiválódó enzimek is, ahol a belső peptidkötés hasítása más, külső proteáz közreműködése nélkül valósul meg. Ilyen, valódi autoaktiválódó enzim az általunk vizsgált, mannózkötő lektinhez kapcsolódó szerin proteáz-2 (MASP-2), amely a természetes immunválasz kialakításában játszik fontos szerepet. A MASP-2 autoaktiválódási mechanizmusának felderítése céljából röntgendiffrakció segítségével meghatároztuk az aktív és a zimogén forma térszerkezetét. Megmutattuk, hogy a szintetikus szubsztráton inaktív zimogén forma fehérjeszubsztrát hatására képes átbillenni az aktív konformációba anélkül, hogy a belső peptidkötés elhasadna az enzimből. Különböző zimogén mutánsok használatával bebizonyítottuk, hogy autoaktiváció esetén egy zimogén molekula képes hasítani és ezzel aktiválni egy másik zimogén molekult. Az aktív és zimogén térszerkezetek összevetéséből megállapítottuk, hogy autoaktiváció során egy nyolc flexibilis peptidhurokból álló régió, az ún. autoaktivációs domén konformációja változik jelentős mértékben. A két-fajta térszerkezetet felhasználva *in silico* modelleztük az autoaktivációs folyamatot. Tudomásunk szerint ez az első olyan modell, amely egy valódi autoaktivációs folyamat szerkezeti hátterébe enged betekintést.

E2-08 Az APC TPR alegységei funkcionális alkompexeket alkotnak

Pál M., Nagy O., Deák P.

MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged

Az APC komplexnek alapvető szerepe van az eukarióta sejtosztódás szabályozásában. Legalább 11 evolúciósan konzerválódott alegységből áll, amelyek közül négy strukturálisan hasonló, 9-10 *tetratricopeptide-repeat* (vagy TPR-) motívumot tartalmazó fehérje. A TPR alegységek szerepe még nem ismert, azonban a TPR domének fehérje-fehérje kölcsönhatást kialakító képességéből, valamint élesztő TPR-mutások egy-egy fenotípusából arra következtettek, hogy az APC vázszerkezetének kialakításában vesznek részt. Munkánkban a TPR alegységek funkcióját

vizsgáltuk genetikai módszerekkel az *Drosophila melanogaster* kísérleti rendszerben. Mutánsizolálással és transzgenikus RNS-interferenciátechnikkával eltávolítottuk az egyes TPR alegységeket, és meghatároztuk ennek fenotípusos következményeit. Három alegység eltávolítása egymástól lényegesen eltérő egyedfejlődési és mitotikus rendellenességeket, programozottsejthalál-indukciót és APC szubsztrátfehalmozódást eredményezett. A negyedik TPR alegységnek a többi APC alegységtől eltérően nincs létfontosságú funkciója, szerepe a komplex funkciójának finomszabályozása lehet. Eredményeink azt mutatják, hogy a strukturálisan hasonló TPR alegységek eltérő mértékben járulnak hozzá az APC funkciójához, elképzeléseink szerint funkcionális alkompexeken keresztül.

E3 – DNS-károsodás, oxidatív stressz

E3-01 A PRINS nemkódoló RNS funkciójának vizsgálat a géncsendesítésével

Szell M.¹, Szegedi K.², Sonkoly E.², Nagy N.², Bata-Csörgő Zs.^{1,2}, Kemény L.^{1,2}, Dobozy A.^{1,2}

SZTE, ¹ MTA Dermatológiai Kutatócsoport, ² Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szeged

Munkacsoportunk a közelmúltban azonosított egy nemkódoló RNS-gént (PRINS: *psoriasis susceptibility-related RNA gene induced by stress*), mely géncsökkentés eredményeink szerint szerepet játszik a pikkelysömörre való hajlam, valamint a sejtek stresszválaszának kialakításában. Munkánk célja az volt, hogy siRNS módszerrel csendesítsük a gén expresszióját HeLa sejtekben, és vizsgáljuk, hogy a csendesítés milyen hatással van a sejtek viabilitására, illetve hogy milyen egyéb gének kifejeződését befolyásolja. Eredményeink szerint a PRINS gén expressziójának csendesítése csökkenti a HeLa sejtek viabilitását stresszkörülmények (széruméheztetés) között, ami arra utal, hogy a PRINS génnek szerepe van a HeLa sejtek stresszválaszának kialakításában. Azt a megfigyelést tettük, hogy a PRINS-csökkentett HeLa sejtek a kontrollsejtekhez viszonyítva megnyúlt, orsó alakot vesznek fel, és a sejtkultúra növekedése során a sejt-sejt kapcsolatok kialakulása is eltér a kontrollkultúrákban megfigyeltétől. cDNS *microarray* kísérletben vizsgáltuk, vajon milyen géncsökkentés állhatnak az eltérő sejtmorfológia hátterében. A *chip*kísérlet eredményei szerint 66 transzkriptum mutatott eltérő szintű géncsökkentést a PRINS-csökkentett sejtekben a kontrollsejtekhez viszonyítva, ezek közül 24 expressziója alacsonyabb, 42 kifejeződése pedig magasabb volt. A géncsökkentés különbségeket RT-PCR módszerrel validáltuk, és a validált géneket tovább vizsgáltuk. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek a gének hogyan fejeződnek ki pikkelysömörben, ezért összehasonlítottuk expressziójukat egészséges, pikkelysömörös tünetes, valamint tünetmentes epidermiszben. Az azonosított transzkriptumok közül a továbbiakban azokat vizsgáljuk részletesen, amelyek kifejeződése nagymértékben eltér a pikkelysömörös mintákban, tehát feltehetően szerepet játszanak a pikkelysömörre való hajlam és/vagy a pikkelysömörös tünetek kialakításában.

E3-02 Uracil-DNS nukleáz: egy új nukleáz család

Békési A.¹, Muha V.¹, Pukáncsik M.¹, Leveles L.¹, Zagyva I.¹, Felföldi F.², Hunyadi-Gulyás É.³, Klement É.³, Burkovics P.⁴, Haracska L.⁴, Medzirhadszky F. K.³, Erdei A.⁵, Vértessy G. B.¹

¹ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ² MolCat Kft., Budapest;

³ MTA SZBK, Proteomikai laboratórium, Szeged; ⁴ MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged; ⁵ ELTE, TTK, Immunológia Tanszék, Budapest

Az uracil rendszerint hibaként értelmeződik a DNS-ben, ahova két módon kerülhet: (1) a citozin dezaminálódása folytán, (2) magas dUTP/dTTP arány esetén a replikáció során timint helyettesítve. Rendhagyó módon a *Drosophila* lárvális szövetéből két alapvető javító fehérje is hiányzik: (1) a fő uracil-DNS glikoziláz (UNG) génje nem található meg a genomban, (2) a dUTP/dTTP arány szabályozásában kulcsszerepet játszó dUTPáz nem fejeződik ki a lárvális szövetekben. Így a lárvákban uracil-DNS halmozódhat fel. Az uracil-DNS-nek a metamorfózishoz kapcsolódó apoptózisban betöltött szerepét vizsgálva 3. stádiumú lárvákból uracil-DNS-t felismerő fehérjét izoláltunk. A fő lálat nem mutat távoli homológiát sem ismert fehérjékkel. Homológiai csupán teljes átalakulással fejlődő organizmusok genomjában található. A rekombináns fehérje uracil-DNS-re szigorúan specifikus nukleáz- (UDE) aktivitást mutatott, aminek egyediségét fémion-függelensége mellett a hasított DNS-termékek analízise is alátámasztja. Az UDE fehérje expressziója közvetlenül a bábozódás előtt indukálódik. Egyedülálló specifikitása és szekvenciája folytán az UDE fehérjét egy új nukleáz család első vizsgált képviselőjének tarthatjuk, amely új betekintést adhat az uracil hiba és/vagy jel szerepébe.

E3-03 A replikációs villa menekítése és a karcinogenezis kapcsolata

Blastyák A., Hajdú I., Pintér L., Unk I., Haracska L.

MTA SZBK, Genetika Intézet, Szeged

Ha a replikációs apparátus a DNS megkettőződése során olyan DNS-károsodással találkozik, mely károsodás nem javítódott ki korábban valamilyen reparációs mechanizmus által, akkor a replikatív polimeráz szigorú szubsztátspecifikitása miatt a károsodott bázis blokkolja a replikációs villa továbbhaladását. Egyetlen ilyen blokkolt replikációs villa is megakadályozhatja a sejtciklus S-fázisának befejeződését, ami a sejt halálához vezethet, gyakran pedig a genom olyan szerkezeti megváltozásához, mely közvetlen összefüggésbe hozható malignus transzformációval. A genetikai információ megőrzése érdekében kialakult különböző reparációs mechanizmusok közül az úgynevezett posztreplikációs reparációs (PRR) út az, mely hatékonyan képes a blokkolt replikációs villa menekítésére. A replikációs villa megfordulása, mint egy lehetséges útja a PRR-nek már évtizedekkel korábban felvetődött, azonban az intenzív próbálkozások ellenére sem sikerült olyan fehérjét azonosítani eukariótákban, amely biokémiailag igazolhatóan szerepet játszana ebben a folyamatban. Bemutatjuk, hogy az élesztő PRR-ben szerepet játszó egyik gén fehérjeterméke képes replikációs villa modellszubsztrátok megfordítására *in vitro*. Az általunk vizsgált élesztőgén humán homológjainak szerepe emésztőrendszeri daganatok és melanómák kialakulásában megapozottnak látszik, és legalább a humán homológok egyike szintén rendelkezik a villa megfordításához szükséges enzimaktivitással. Eredményeink remélhetőleg hozzájárulhatnak a karcinogenezis folyamatának mélyebb megértéséhez és hatékony diagnosztikus eszközök kifejlesztéséhez.

E3-04 A poli-(ADP-ribóz) polimeráz-2 szerepe a PPAR γ által szabályozott transzkripcióban

Bai P.^{1,3}, S. M. Houten^{2,4}, A. Huber¹, V. Schreiber¹, M. Watanabe², Kiss B., G. de Murcia¹, J. Menissier-de Murcia¹, J. Auwerx²

¹ CNRS UMR 7175 ESBS, Illkirch, France; ² IGBMC - ICS, Illkirch, France;

³ DE, OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ⁴ Laboratory Genetic Metabolic Diseases, AMC, Amsterdam, The Netherlands

A peroxiszómaproliferátor-aktivált receptor- γ (PPAR γ , NR1C3) központi szerepet játszik a zsírszövet differenciálódásában és funkciójában egyes kulcsfehérjék expressziójának szabályozásán keresztül. Munkánk során egy DNS hibajavító fehérje, a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-2 (PARP2) lehetséges szerepét vizsgáltuk a PPAR γ -szabályozta transzkripcióban. A PARP2^{-/-} egerek fehér zsírszöveve abnormalis szövettani képet mutatott. Több, PPAR γ által szabályozott gén expressziója csökkent annak ellenére, hogy a PPAR γ_1 és a PPAR γ_2 szintje normális volt a szövetekben. A PARP2^{-/-} eger embrionális fibroblasztok csökkent adipocita irányú differenciációt mutatnak, és emiatt a PPAR γ *target* gének alacsony expressziójával jellemezhetőek. A PARP2 siRNS csökkenti a PPAR γ alapaktivitást, illetve a PPAR γ ligandfüggő aktivációját. Kimutattuk a PARP2 és a PPAR γ DNS-függő kölcsönhatását is kromatin immunprecipitáció és EMSA segítségével. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a PARP2 a PPAR γ kofaktor. (INSERM, NCRS Université Louis Pasteur, EU LSHM-CT-2004-512013, NIH DK 067320, a FEBS Long Term Fellowship)

E3-05 Poli-(ADP-ribóz): jelátvivő anyag?

Virág L.

DE, OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A poli-ADP-ribóziláció olyan posztranszlációs fehérjemódosítás, melynek során a poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) családba tartozó enzimek a NAD-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítva az utóbbiból

hosszú, elágazó láncú polimereket szintetizálnak megfelelő akceptor-fehérjék glutamát- vagy aszpartát-oldalláncjaihoz kapcsolva. A polimer rapid lebontásáért a poli-(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) felelős. A reverzibilis poli-ADP-ribóziláció jelentőségét számos sejtfolyamat, így a kromatinszerkezet, a transzkripció, a DNS-hibajavítás szabályozásában igazolták. A PARP enzimsalád legismertebb tagja, a PARP-1 DNS-törések hatására aktiválódó enzimmé vált ismertté, de a legújabb eredmények a

PARP-1, és a PARP enzimsalád más tagjainak foszforiláció révén történő aktivációját is leírják. A PARP-1 esetében az is ismeretes, hogy az enzim nem csupán végpontja egyes kinázok számára, de a PARP1 aktivációja, egyelőre még nem tisztázott mechanizmussal, újabb kinázok (pl. a MAP kináz JNK) aktivációjához vezet. Az előadásban szeretném áttekinteni a poli-ADP-ribóziláció helyét és szerepét a genotoxikus stressz által kiváltott jelátviteli folyamatokban. (OTKA K60780)

E4 – Programozott sejthalál

E4-01 A galectin-13 indukálta apoptózis molekuláris mechanizmusai

Boronkai Á., Bellyei Sz., Szigeti A., Hocsák E., Németh V., Sümegi B. PTE, ÁOK, Biokémiai Intézet, Pécs

A galectin-13 két identikus, 139 aminosavhosszú, 16 kDa aleggységből álló protein. Northern- és Western-blot-vizsgálataink szerint elsősorban a méhlepényben, a magzati májban és lépben expresszálódik, de EST-klónjait leírták számos humán szövetben, tumorban egyaránt. Aminosav-szekvenciája nagyfokú homológiát mutat a „Charcot Leyden Crystal Protein”-nel, mely a béta-galaktozidoktáz (galectin) fehérjecsald tagja. Típus szerkezeti modellezésével korábban megállapítottuk, hogy a fehérje a galectinekre jellemző „jellyroll” szerkezettel rendelkezik. Affinitáskromatográfia és fluoreszcencia spektroszkópia segítségével bizonyítottuk cukorkötő aktivitását, ezen alapuló hemagglutinációs képességét. ³¹P NMR spektroszkópiával detektáltuk gyenge endogén lizofoszfolipáz aktivitását. Affinitáskromatográfia, PAGE, MALDI-ToF MS és PSD módszerekkel igazoltuk, hogy a galectin-13 az annexin-II-t, illetve a béta- és gamma-aktint köti nagy specificitással. Immunhisztokémiai és konfokális mikroszkópos módszerek eredményei alapján a lépényi syncytiotrophoblast-sejtekben expresszált galectin-13 más galectinekhez hasonlóan a sejtfelszínre jutva a kefeszegélyben jelenik meg. Transzfekciós technikával előállított transziens túlexpresszált U-937 sejtvonalon végzett vizsgálataink a galectin-13 korábban is feltételezett sejthalál-indukáló hatását igazolták. A fehérje a transzfektált sejtek érzékenységét fokozza olyan exogén sejtkárosító tényezők iránt, melyek a kontrollsejtcsoportra számottevő hatást nem gyakorolnak. Kis dózisu H₂O₂- és Taxolexpozíció során tett megfigyeléseink alapján a fehérje a sejthalál mind nekrotikus, mind apoptotikus folyamatát képes potenciózni, a kiváltó tényezőtől függően. A galectin-13 sejthalál-indukáló hatásában tehát részben mitokondriális, részben MAPK-mediált folyamatok valószínűsíthetőek.

E4-02 Kísérlet a humán szöveti transzglutamináz Ca²⁺-kötőhelyeinek felderítésére irányított mutagenézis alkalmazásával

Király R.^{1,2}, Csósz É.³, Kurtán T.³, Keresztessy Zs.³, Fésüs L.^{1,3}

¹ MTA Apoptózis és Jelátviteli Kutatócsoport; ² DE, TTK, Szerves Kémiai Tanszék; ³ DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A transzglutaminázok Ca²⁺-függő aciltranszferázok, a fehérjék glutamin és lizin oldalláncjai között hoznak létre kovalens izopeptidkötést. A szöveti transzglutamináz (TG2) fontos szerepet játszik a programozott sejthalál során, valamint számos jelentős biológiai folyamatban. Ezt a sokrétű funkciót a fehérje összetettsége és többféle enzimaktivitása is alátámasztja, többek között G-fehérje funkcióval és GTPáz aktivitással is rendelkezik. A TG2 Ca²⁺-kötő helyeit még nem azonosították. Equilibrium dialízisvizsgálatok alapján megállapították, hogy a humán TG2 6 Ca²⁺ kötése képes, TG3 krisztallográfias vizsgálat során 3 Ca²⁺-kötőhelyet azonosítottak. Célul tűztük ki a TG2 Ca²⁺-kötőhelyeinek pontos lokalizálását helyspecifikus mutációk alkalmazásával. Mivel a TG2 nem rendelkezik tipikus Ca²⁺-kötő doménnal, három modellezéssel megtalált negatív felületi potenciálú helyen, valamint két, a TG3 fehérjével homológ helyen egyszeres és többszörös mutációkat készítettünk. A rekombináns TG2-t E. coli-ban GST- és HIS-fúziós formában termeltük, és glutation-Sepharose, illetve nikkel-affinitáskromatográfias oszlopon tisztítottuk. A mutáns enzimek magas Ca²⁺-koncentrációnál is csökkent transzglutaminázaktivitással rendelkeznek. Ca²⁺-kötő képességük ⁴⁵Ca equilibrium dialízisvizsgálat alapján különböző mértékben csökkent. CD-spektroszkópiás eredmények azt mutatják, hogy a mutációk nem okoztak jelentős szerkezeti változásokat. A mutánsok a vad típushoz hasonló GTPáz aktivitással rendelkeznek, két szuper GTPáz mutáns kivételével. Eredményeink arra utalnak, hogy a mutagenizált felületek jelentős szerepet játszanak a humán TG2 Ca²⁺-kötésében és aktivitásában.

E4-03 Endotél sejtek inváziójának szabályozása avb3 integrineken keresztül

Czirók A.¹, C. D. Little²

¹ ELTE, TTK, Biológiai Fizika Tanszék; ² University of Kansas Medical Center, Dept. of Anatomy, Kansas City, KS, USA

Az endotél sejtek viselkedésének szabályozása az avb3 integrineken keresztül gyógyszerileg is ígéretes stratégia lehet. Nagyszámú endotél sejt viselkedését analizáló funkcionális vizsgálatainkkal igyekeztünk minél közvetlenebb módon megállapítani az avb3 integrin szerepét és az azt moduláló tényezőket. *In vivo* képképző rendszerrel megmutattuk, hogy a vaszkulogenezis során a korai embrionális érhálózatot invazív endotél sejtek hozzák létre. Ez az invazív viselkedés nagymértékben csökkenthető a funkcionális avb3 integrin blokkolásával. Endocardiumpárna-explantátumtenyésztések segítségével nagyobb felbontással analizáltuk az invázió folyamatát 3D kollagén-I gélekben. Ebben az *in vitro* modellben az invazív endotél sejtek perzisztens migrációja gátlható az avb3 integrin és a mátrix metalloproteáz MMP2 kötődését specifikusan blokkoló reagensek segítségével. Ugyanakkor az integrin-MMP2 asszociáció irreleváns a nem invazív endotél sejt populáció mozgásában. A fenti funkcionális eredmények összevetése az av vagy b3 integrinre kiütött egér gyengén megváltozott fenotípusával arra enged következtetni, hogy kompenzáló mechanizmusok jelenléte miatt egy receptorfehérje teljes hiánya nem mindig ekvivalens a funkcionális receptor blokkolásával.

E4-04 A szöveti transzglutamináz szerepe a vörösvértestek elhalásában

Sarang Zs., Mádi A., Szondy Zs.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az érett vörösvértestek elhalásuk során a sejttaggal rendelkező sejtek apoptózisához hasonló mechanizmussal halnak el, melynek során a sejtek zsugorodnak és felszínükön foszfátidil-szerin (PS) jelenik meg, amelyet felismerve a makrofágok bekebelezik őket. Az elhalás során a sejten belüli Ca²⁺-koncentráció megemelkedik, melynek következtében a Ca²⁺-szabályozott cisztein proteáz m-kalpain és szöveti transzglutamináz (TG2) aktiválódik. A TG2 számos membrán alatti vázfehérjét keresztköve felelőse tehető az elhaló vörösvértestek Ca²⁺-indukált tartós alakváltozásért és a membrán deformálhatóságának elvesztéséért. Kalcium-ionofórral kezelt TG2^{-/-} vörösvértesteket használva kimutattuk, hogy a TG2-hiányos sejteknek, a vad típusú sejtekhez hasonlóan, csökken a makrofágok általi felvétele. Ennek hátterében feltételezhetően a felszínükön történő lassabb a PS-megjelenítés állhat. Ugyanakkor a sejtfelszíni PS eloszlásában nem tapasztaltunk eltérést a két sejt között. A lassult PS-megjelenítés specifikus volt a kalcium ionoforos kezelésre, mivel hiperosmotikus sokk és oxidatív stressz kiváltotta sejtelhalásokban nem tapasztaltunk eltérést a PS-kifordulásban a két sejt típus között. Kimutattuk, hogy az aktivált TG2 képes keresztkötni a sejten belül nem kovalensen asszociált kalpain kis és nagy alegységet. Hogy meghatározzuk a TG2-függő kalpain-keresztkötés hatását, megmérjük *in vitro* az enzim aktivitását TG2^{-/-} és +/+ vörösvértestekben ionoforkezelés előtt és után, valamint időben követtük a vörösvértestekben a kalpain szubsztán membránvázfehérje, a spektrin lebomlását. Azt találtuk, hogy a kalpain-aktivitás a kalcium-ionofórral kezelt TG2-sejtekben volt a legnagyobb. Adataink arra engednek következtetni, hogy a TG2 a kalpainaktivitás szabályozásán keresztül elősegíti a vörösvértestek elhalását. (OTKA T049445, ETT 100/2003)

E4-05 Egy BH3 domént tartalmazó mitokondriális permeabilitástranzitot indukáló fehérje azonosítása

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Bognár Z., Gasz B., Szabó Z., Bognár E., Hocsák E., Komlósi K., Várbíró G., Melegh B., Janáky T., Sümegi B., ifj. Gallyas F.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Adatbázis-keresés és szekvenenciaanalízis segítségével BH3 domént azonosítottunk a hemkötő protein 2 / SOUL fehérjében, melyből arra következtettünk, hogy a fehérjének valamiféle szerepe lehet a sejthalál folyamatában. Ezt a gondolatmenetet követve, túlexpresszáltuk a fehérjét olyan sejtvonalban, mely egyébként nem termeli e fehérjét, és siRNS-technikával elnyomtuk olyanban, ami fiziológiásan is magas szinten tartalmazza azt, majd oxidatív stressznek tettük ki a sejteket. A hemkötő protein 2 jelenléte fokozta a hidrogén-peroxid vagy a Taxol által indukált sejthalált, és elősegítette a mitokondriális membránpotenciál összeomlását. Növelte még a citokrom c kiáramlását a mitokondriumból, valamint az apoptózisindukáló faktor és az endonukláz G magba történő transzlokációját is. A mitokondriális proapoptotikus fehérjék kiáramlását gátolni lehetett ciklosporin A-val, ami a mitokondriális permeabilitástranzíció jól ismert gátlószere. A hemkötő protein 2 túlexpressziója alatt kialakuló sejthalál döntően nekrotikus, melyet propidium-jodidos festődés és a kaszpázaktiváció hiánya is bizonyít. Rekombináns hemkötő protein 2 izolált mitokondriumokban *in vitro* indukálta a mitokondriális permeabilitástranzíció és a mitokondriális membránpotenciál összeomlását alacsony kalcium- és foszfátszintek mellett is. A fehérje elnyomása siRNS technikával hemkötő protein 2-t fiziológiásan is kifejező sejtekben csökkentette a hidrogén-peroxid vagy Taxol által indukált sejthalál mértékét, és segített fenntartani a mitokondriális membránpotenciált. Ezen adatok alapján sikerült bizonyítani az első mitokondriális permeabilitástranzíciót indukáló fehérje (MPTIP1) létezését.

E4-06 Humán makrofágok apoptofagocita-génjeinek expressziós mintázata

Zahuczky G., Májai Gy., G. Petrovski, Fésüs L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az emberi szervezetben a naponta ~600 milliárd elhaló sejt eltávolítását különböző fagocitasejtek végzik el. Az elhaló és a bekebelező sejtek közötti kapcsolat molekuláris elemeinek szisztematikusan vizsgálatát végeztük el egy általunk konfigurált *array*rendszerben, amellyel 95 apoptofagocita-gén – köztük fagocitareceptorok, integrinek, hídképző fehérjék, különböző szignálútvonalak elemei, effektor fehérjék, citokinek – mRNS-szintjét tudtuk egyidejűleg kvantitatív módon meghatározni. Elsőként a monocita-makrofág-differenciálódás során fel- vagy leszbályozódó apoptofagocita-géneket határoztuk meg. 37 gén mRNS-szintjében szignifikáns változást tapasztaltunk: 27 gén esetében növekedést, 10 gén esetében csökkenést. Különböző donorokból származó humán makrofágok expressziós mintázatait összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a gének különböző szintű variabilitással rendelkeznek. Glükokortikoidkezelés hatására a makrofágok fagocitáló képessége jelentősen növekszik, ami eredményeink szerint különböző receptor-, illetve hídképző fehérjék génexpresszió-növekedésével jár együtt. Mivel a fagociták többszörösen redundáns molekuláris „fagocitáló gépezettel” rendelkeznek, megvizsgáltuk, hogy a különbözőképpen elhaló sejtek (autofágia, anoikis-indukált autofágia, UV-indukált apoptózis) bekebelezése során különböző géncsoportok aktiválódnak-e a humán makrofágokban. A gének egy csoportja a fagocitált sejtek típusától függetlenül aktiválódik, míg más gének csak meghatározott módon elhaló sejtek fagocitózisa során aktiválódnak.

E5 – Anyagcsere-betegségek, műszeres analitikai módszerek

E5-01 Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz

Bánhegyi G.

SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest
A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PDH) az endoplazmás retikulum (ER) luminális kompartmentumának legfontosabb NADPH-generáló enzime. Szubsztrátellátását az ER glükóz-6-foszfát transzportere (G6PT) biztosítja. A termelt NADPH-t különböző reduktázok, egyebek között a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa (11 β HSD1) használják fel. Ez az enzim kulcsszerepet játszik a glükokortikoidok prereceptorális aktiválásában, s így a metabolikus szindróma feltételezett patogenezisében is. Kísérleteinkben a H6PDH szerepét vizsgáltuk különböző sejttípusokban. Patkány máj mikroszomális vezikulákat vizsgálva megállapítottuk, hogy az intraluminális piridinnukleotidok túlnyomórészt redukált állapotban vannak, és a redoxstátusz fenntartásában a H6PDH aktivitásnak fontos szerepe van. A H6PDH és a 11 β HSD1 szoros kooperációját a kolokalizáció és a közös kofaktorkészlet biztosítja. Humán granulocitákban kimutattuk a G6PT, H6PDH és 11 β HSD1 jelenlétét. A G6PT gátlószerei apoptózist okoztak, melyet antioxidánsokkal, illetve a 11 β HSD1 redukált szubsztrátaival ki lehetett védeni. Az eredmények szerint az ER intraluminális NADPH-szintjének fenntartása antiapoptotikus hatású a granulocitákban. A G6PT – H6PDH – 11 β HSD1 rendszer elemeit patkányepididimális zsírszövetből származó mikroszomákon is kimutattuk. Feltevésünk szerint adipocitákban a rendszernek szerepe lehet a szénhidrátanyagcserét követő lisszális glükokortikoid-aktivációban, s így a triglicerid raktározásban. Összefoglalva, a H6PDH alapvető fontosságú az ER lumen redox homeosztázisának fenntartásában. Emellett az enzim – a G6PT-rel együtt – molekuláris célpont lehet a metabolikus szindróma farmakológiai befolyásolásában.

E5-02 Különböző betegségsmodellekben fellépő inflammációs és egyéb folyamatok követése mágneses magrezonanciás módszerekkel

Berente Z.¹, Radnai B.¹, Nagy G.², Veres B.¹, Gallyas F.¹, Mandl J.², Sümegi B.¹

¹ PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; ² SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

A mágneses magrezonancia (MR) sajátosságainál fogva alkalmas nem invazív és nem destruktív vizsgálódásra. A különféle képpalkotó (MRI) és spektroszkópiai (MRS) módszerek együttesével a morfológiai elváltozásoktól a sejt- és szöveti szintű változásokon át egyes metabolitok koncentrációjának meghatározásáig terjedő széles skálán vizsgálódhatunk, ráadásul mindezeket a méréseket gyakorlatilag egyidejűleg, térben feloldva és akár *in vivo* is végrehajthatjuk. Elsősorban két betegségsmodellel szerzett tapasztalatainkba szeretnénk bepillantást nyújtani: egyrészt bakteriális lipopoliszachariddal kezelt egerekben (szepintikus sokk), másrészt acetaminofennel kezelt egerekben (májkárosodás) vizsgálódunk többféle képpalkotó módszerrel, továbbá *in vivo* és *ex vivo* spektroszkópiai eljárásokkal.

E5-03 Az endoplazmás retikulum szerepe az acetaminofen által kiváltott májkárosodásban

Nagy G.¹, Wunderlich L.¹, Szarka A.², Bánhegyi G.¹

¹ SE, MTA Endoplazmás Retikulum Munkacsoport; ² BME, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest

Az acetaminofen (AAP) túladagolása akut májkárosodáshoz vezethet. Az AAP metabolizmusát kísérő glutationdepláció, illetve oxidatív stressz lényeges szereppel bírnak a pathomechanizmusban. Az endoplazmás retikulum (ER) biotranszformációs enzimeiről réven közvetlenül vesz részt az AAP metabolizmusában. Az ER működéséhez lényeges a redoxstátusz fenntartása, ez sérülhet oxidatív stresszben. Mindezek okán felmerült, hogy az AAP által kiváltott akut májkárosodás során ER stressz jön létre, és az ER saját, mitokondriumfüggetlen jelpályákat indít be. Kísérleteinkben hím CD-1 egereket kezeltünk szubletális dózisu AAP-vel, majd az ER oxidatív státuszát és fontos ER stresszmarkereket vizsgáltunk a károsodás korai fázisában. A mikroszomális szubletális redukált glutation (GSH) szintje a kontrollérték 10%-ára esett vissza AAP adása után. A PDI oxidoreduktázok családjába tartozó ERp72 tiolcsoportjainak AMS-jelölése azt mutatta, hogy a fehérje kizárólag az oxidált formájában van jelen AAP-kezelést követően. 3 órával a kezelést követően a CHOP/GADD153 és az ER membránjához kötődő prokaspáz-12 fehérjék indukcióját, továbbá az ER stresszválaszban szerepet játszó ATF6 fokozott aktivációját találtuk. Lényeges ugyanakkor, hogy a legfontosabb ER-chaperonok (PDI, ERp72, GRP78, GRP94) egyike sem indukálódott, ugyanakkor az effektor kaspázként működő kaspáz-3 aktivációja volt megfigyelhető. *In vivo* eredményeink tehát arra engednek következtetni, hogy szubletális dózisu AAP hatására az ER lumen redoxegyensúlya felbillen, továbbá hogy az ER stresszválasz proapoptotikus komponensei aktiválódnak. Az apoptotikus történések azonban megszakadnak, vélhetően az oxidatív károsodás miatt.

E5-04 Optikai immunszenzorok fejlesztése

Székács A.

MTA NKI, Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztály, Budapest

A bioanalitikai eljárásokban az analitikai rendszer három alapvető egysége (felismerés, jelátalakítás és detektálás) közül legalább az egyik biológiai/biokémiai természetű. Az immunanalitika ezen belül specifikus antitest-antigén-kölcsönhatásokon alapuló bioanalitikai módszerek összessége, amelyek döntően az immunoglobulinok kiemelkedő érzékenységét és specifikusát állítják az analitikai felismerés szolgálatába. A korszerű immunanalitikai rendszerek jelentős képviselői az immunszenzorok, melyekben az immunkomplex kialakulása megfelelő elektronikai vagy optikai tulajdonságú szenzorfelületen megy végbe. Specifikus antitest-antigén-kölcsönhatásokon alapuló optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiai (OWLS) szenzorokat fejlesztünk különböző célvegyületek, így makromolekulák és kis molekulájú célvegyületek – előbbi

csoportban fehérjetermészetű anyagok, utóbbiban döntően humán vagy ökotoxikológiai szempontból jelentős vegyületek (növényvédő szerek, toxinok, hormonok stb.) – kimutatására. A módszerfejlesztés kulcs lépése a szenzorfelületen történő kémiai lekötés tökéletesítése, melynek segítségével az antitest–antigen-komplex mindkét tagját sikeresen rögzíthetjük kovalens kötéssel, s a kapott immunszenzorokkal a célvegyületek mind nem versengő, mind versengő rendszerben detektálhatók. Az OWLS technika lehetővé teszi, hogy az immunkémiai folyamatot rendkívüli érzékenységgel, szinte molekuláris léptékben, s egyszerre mind valós idejű követéssel detektáljuk. A módszerfejlesztésben együttműködő partnerünk a MikroVákuum Kft., az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, valamint a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet. (NKFP 3A058-04, GVOP-3.1.1.-2004-05-0429/3.0, BIO-73/2001, OMF 02193/1999, OTKA T032232, T033021, MikroVákuum Kft.)

E5-05 A GSK3 szerepe a zsírsav-bioszintézis szabályozásában lipogén enzimek foszforilációján keresztül

Farkas V., Jakus P., Sándor A.
PTE, ÁOK, Biokémia Intézet, Pécs

Hideghatásnak (5 °C 1 héti), majd semleges hőmérsékletnek (28 °C 24 és 48 órán át) kitett patkányokban vizsgáltuk a szabad zsírsavak (FFA) és a glükóz metabolizmusában bekövetkezett változásokat a barna és fehér zsírszövetben (BAT, WAT), valamint az izmokban. A BAT érintett fehérjék

között két lipogén enzimet, az acetyl-CoA karboxilázt (ACC) és az ATP-citrázt vizsgáltuk behatóan. BAT esetében mindkét lipogén enzimnél mind a teljes, mind a foszforilált alak expressziója fokozódott a hideg hatására, míg a WAT esetében expressziójuk csökkent. Fontos, hogy BAT esetében csak a ACC1 izoenzim felszabályozódása s az ACC2 változatlan mennyisége volt megfigyelhető. Ezen enzimek tényleges aktivitásai és az *in vivo* FFA-szintézis szintje hasonló trend szerint változott, vagyis növekedett a BAT és csökkent a WAT esetében. A WAT tehát saját szintetikus aktivitásának csökkentésével FFA-t és glükózt biztosít a BAT számára, így működve együtt azzal a hőmérsékletszabályozott termogenezisben. Az ACC *in vivo* foszforilációs szintje a GSK3-aktivitással korrelált, ami arra utal, hogy a GSK3 foszforilálhatja az ACC-t. A hidegben mutatózó, lecsökkent inzulín- és glükózsintek ellenére a BAT szövetben az Akt és GSK-3 fehérjék fokozott kifejeződését és foszforilációját tapasztaltuk, míg az izomszövetekben ilyen változás csak a reakklimatizációs időszakban volt tapasztalható. Ekkor e fehérjék túlexpressziója lépett fel, míg a szérum inzulínszintje a normál érték fölé emelkedett. Ezzel párhuzamosan a piruvát dekarboxiláz enzimaktivitása csökkent. Ezen együttes hatások lehetnek felelősek a hideghatás után újra akklimatizálódott patkányokban a BAT – a szakirodalomban korábban ismertett – szélsőséges glikogénfelhalmozódásában.

E6 – A génkifejeződés szabályozása

E6-01 A matrilin-1 gén promóterének funkcionális analízise

Kénesi E., Nagy A., Molnár A., S. T. Oommen, Sinkó I., Kiss I.

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A porcspecifikus matrilin-1 gén egyedi tulajdonsága, hogy expressziója a növekedési korong meghatározott zónáira korlátozódik. A gén szabályozó régióinak előzetes vizsgálata transzgenikus egerekben arra utal, hogy a magas szintű génkifejeződéshez egyaránt szükség van a távoli promóter és az introni elemek jelenlétére. A hosszú promóter önmagában, illetve a rövid promóter az introni serkentővel (*enhancer*) a transzgenexpressziót a növekedési korong proliferatív és prehipertróf porcszövetbe irányította. Ezen transzgenekben a rövid promóter volt a közös elem, ami Sox9 és NFI kötőhelyeket tartalmaz. Felmerül a kérdés, hogy ez a régió játszik-e szerepet a zonális kifejeződés mintázat kialakításában. Ennek megválaszolására luciferázfúziós konstrukciókat hoztunk létre, melyek a rövid promótert (vagy ennek mutáns formáit) és a különböző hosszúságú disztális promótert tartalmazták. A rövid promóterelemek szövetspecifikus génműködésben játszott szerepének kiderítésére Sox9 és NFI kötőhelyek mutáns változatát hordozó konstrukciókat is előállítottunk. A konstrukciók aktivitását transziens expressziós kísérletekben különböző sejt kultúrákon (fibroblaszt, kondenzálódó mesenchyma és chondrocyta) vizsgáltuk. A megfelelő aktivitást mutató DNS-kombinációkat *LacZ* riportergén elé építettük, és mikroinjektálással megtermékenyített egérpetesejtek hím pronukleuszába juttattuk. A transzgenexpressziót az injektálásból származó embriók X-gal festésével és hisztológiai módszerekkel detektáltuk. Sikertől pontosabb képet alkotnunk a rövid promóter és a távoli promóterelemek közötti kölcsönhatásról, valamint a szövetspecifikus aktivitásban betöltött szerepükről. (OTKA T049608, PD05006, GVOP-3.1.1-2004-05-0290/3.0)

E6-02 Egy lipidek által szabályozott transzkripció faktor a PPAR γ működése a makrofágok gyulladásos állapotának a függvénye

Szántó A., Dezső B., Nagy L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A PPAR γ a magreceptorok családjába tartozó oxidált zsírsavszármazékok által aktivált transzkripció faktor. Fontos szerepe van a zsírszövet differenciálódásában, a makrofágok lipidanyagcserejének, gyulladásos folyamatoknak a szabályozásában. Összehasonlítva a szervezet különböző szerveiben levő makrofágokat, azt találtuk, hogy a PPAR γ kifejeződése nem egyenletes: vannak olyan, úgynevezett alternatívan aktivált makrofágok, melyek szinte mind nagy mennyiségben fejeznek ki PPAR γ -t, míg a klasszikus, gyulladásos makrofágok általában alacsonyabb szintet mutatnak. Azaz, a makrofágok egy része PPAR γ -pozitív, más része -negatív, míg az alternatívan aktivált makrofágok, mint pl. a perivaszkuláris vagy alveoláris makrofágok nagy része PPAR γ -pozitív. Ezt modelleztük *in vitro*: humán CD14-pozitív monocitákat illetve vad típusú és makrofágspecifikus PPAR γ -kiűtött egerek csontvelői sejtjeiből differenciáltatott makrofágokat aktiváltunk IL-4-gyel, hogy alternatívan

aktivált és IFN γ -val, TNF α -val, LPS-sel, hogy klasszikusan aktivált makrofágokat nyerjünk. Az IL-4 indukálja a PPAR γ kifejeződését, míg a gyulladásos citokinek, bakteriális származékok gátolják azt. Nemcsak a PPAR γ szintje, hanem a receptor aktivitása is szabályozódik a fenti körülmények hatására. Ezek a folyamatok reverzibilisek, a gyulladásos környezet változtatásával változik a PPAR γ aktivitása. Globális génexpressziós vizsgálatokkal meghatároztuk a PPAR γ által szabályozott célgéneket, és mind a fel-, mind a leregulált gének esetén azt találtuk, hogy a PPAR γ hatása szinte kizárólag az IL-4-kezelt, alternatívan aktivált makrofágokban figyelhető meg. Ezek az eredmények új megvilágításba helyezik az eddigi PPAR γ -kutatókat, hiszen a receptor által szabályozott folyamatok egy sejtpopulációhoz, az alternatívan aktivált makrofágokhoz köthetők.

E6-03 A p53 fehérje szerepe PC12 patkányphaeochromocytoma-sejtek differenciációjában

Fábián Zs., Vecsernyés M., Pap M., Szeberényi J.

PTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs

A PC12 patkányphaeochromocytoma-sejtek idegi növekedési faktoros (NGF) kezelés hatására neuronális irányú differenciációt mutatnak. A folyamat során az NGF a Ras/Raf/MEK/ERK jelátviteli pálya elnyújtott aktivációját váltja ki. E jelátviteli út központi elemei az ERK 1 és 2 mitogén-aktivált protein kinázok (MAP kinázok), NGF indukálta aktivációjuk az úgynevezett korai válasz génnek fokozott transzkripcióján keresztül a sejt ciklus leállításához vezet. Az NGF hatásra bekövetkező másik fontosnak tűnő biokémiai esemény a p53 tumorszuppresszor fehérje nukleáris translokációja, azonban a p53 és Erk rendszerek közti kapcsolat egyelőre nem teljesen tisztázott. A kérdés vizsgálatára vad típusú és domináns negatív hatású mutáns p53 fehérjét stabilan expresszáló PC12-sejtvonalak segítségével tanulmányoztuk az NGF-kezelést követő Erk- és p53-közvetített jelátviteli eseményeket. Eredményeink szerint a p53 funkció nélkülözhetetlen az NGF-indította differenciációhoz. A jelenség hátterében az Erk, p38 és SAPK/JNK MAP kinázok NGF-kiváltott aktivációjának kinetikájában bekövetkező eltérések állhatnak.

E6-04 ADA2b adaptorfehérjéket tartalmazó hiszton acetyltransferáz komplexek vizsgálata, avagy van-e összefüggés a hisztonok általános acetylációja és a gének aktivációja között

Pankotai T.¹, Zsindely N.¹, Újfaludi Zs.¹, Komonyi O.¹, Ciurciu A.², Boros I.^{1,2}

¹ SZTE, TTK, Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék; ² MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A transzkripció iniciációjában fontos szerepe van a kromatinszerkezetet módosító folyamatoknak. Az egyik legintenzívebben tanulmányozott hisztonmódosítás a hisztonok aminoterminalis végének acetylációja, ami hozzájárul a kromatin fellazításához, és ezáltal elősegíti a transzkripció iniciációt. A hisztonacetylációban a katalitikus hatású acetyltransferázok

mellett sok más, részben ismert koaktivátor és adaptor is szerepet játszik. Ilyen evolúciósan konzervált adaptorok a GCN5 hiszton acetyltransferáz tartalmazó komplexekben megtalálható ADA2 fehérjék. *Saccharomyces cerevisiae* fajban egy, *Drosophila melanogaster* és számos további magasabbrendű élőlényben két eltérő funkciójú Ada2 gén (*Ada2a* és *Ada2b*) ismert. Legújabb eredményeink azt bizonyítják, hogy *Drosophila* fajban az *Ada2b* génről alternatív darabolás (*splicing*) során két mRNS-forma képződik. A róluk kifejeződő fehérjék a N-terminális régiója azonos, míg C-terminális régiójukban eltérést mutatnak. Az egyes ADA2-formákat kódoló DNS-darabok – bár eltérő hatékonysággal – külön-külön is képesek a mindkét izoformát inaktíváló *Ada2b*-mutáns állatok menekítésére. A két fehérje eltérő sejten belüli lokalizációt mutat, az ADA2^b a sejtmagban, az ADA2^a a citoplazmában figyelhető meg. Az ADA2^a hiányában a hiszton H3 lizin 9 és 14 acetyláció csökkent mértékű, az ADA2^b hiánya azonban nem okoz ilyen rendellenességet. DNS-microarray kísérletben közel 400 gént azonosítottunk, amelyek szintje az *Ada2b* mutáció hatására szignifikáns csökkenést mutat. Ezek közül többről bizonyítottuk, hogy expressziójuk több nagyságrenddel csökken az ADA2^b fehérje hiányában, de az ADA2^a hiánya nem befolyásolja lényegesen expressziójukat. Adataink szerint a citoplazmatikus lokalizációt mutató ADA2^a fehérje a hisztonok általános acetylációjában vesz részt, míg a sejtmagi lokalizációt mutató ADA2^b fehérje egyes gének promoterspecifikus aktivációjának nélkülözhetetlen faktora.

E6-05 Membránperturbáció is kiválthatja az enyhe hőstresszel analóg stresszfehérjeválaszt

Nagy E.¹, Balogh G.¹, Balogi Zs.¹, Gombos I.¹, Török Zs.¹, A. Maslyanko¹, L. Sistonen², P. Slotte², Horváth I.¹, Vigh L.¹

¹ MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ² Abo Akademi University, Turku, Finland

Környezeti stresszhatásokra minden élőlény evolúciósan nagymértékben konzervált molekuláris stresszválasszal reagál. Ennek része a génkifejeződési mintázat megváltozása, a hőszokkfehérjék (Hsp-k) szintézisének növekedése. A sejtmembrán nem csupán a celluláris károsodás egyik célpontja, de központi szerepet bír a stressz-szignál érzékelésében, a stresszelhárító mechanizmusok működtetésében is. A membránfluiditást növelő benzil-alkohol- (BA) kezelés izotermális körülmények között stresszválaszt indít el, indukálja a hsp70 és hsp27 expresszióját, miközben a fehérjék denaturációját nem fokozza. A hsp70-indukció és a ROS-termelés mértéke alapján a BA-kezelés az enyhe hőstresszhez hasonlítható. A hsp-k indukációjáért az aktiválódó HSF1 felelős. A HSF1 központi szerepét

alátámasztja, hogy HSF1-et nem tartalmazó HSF1^{-/-} sejtekben membránperturbációt követően a hsp-indukció nagyon kis mértékű a HSF1^{+/+} sejtekhez képest. A BA által elindított válaszreakció, a hőszokkhoz hasonlóan, képes termotoleránssá tenni a sejteket. A BA-kezelés nagyobb mértékű fluiditásváltozást idéz elő, mint az enyhe hőstressz. A 2-fenil-etanol is hatékonyan fluidizálja a membránt, ám a hsp70 indukcióját nem indítja el. A BA azonban a fenil-etanolhoz képest nagyobb mértékben képes átalakítani a szignalizációban is központi szerepet játszó koleszterolban gazdag membránmikrodomének szerkezetét. Ez arra utal, hogy a stressz-szignál képzésében a membrándomének finomszerveződésének megváltozása játszik döntő szerepet, és nem a membránok általános fluiditása változása.

E6-06 A mobil genetikai elemek szerepe az *Escherichia coli* mutációs folyamataiban

Fehér T., Cseh B., Umenhoffer K., Karcagi I., Pósfai Gy.

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A baktériumok evolúciós sikeressége jórészt a változékonyság képességén múlik. Az állandóan változó külső körülményekhez való adaptációval összefüggésben a genomi mutációs ráta is dinamikusan változik. Bár hatalmas irodalma van a bakteriális sejtek mutagenézisének, a vizsgálatok többnyire speciális mutációjátfákra és fiziológiai állapotokra fókuszálnak. Növekedő *E. coli* kultúrákat vizsgálva átfogó képet szeretnénk volna kapni a sejt mutációs folyamatairól, a mutációk fajtáiról és azok relatív súlyáról normál és stresszes körülmények között, különös tekintettel a mobil genetikai elemek szerepére. Kidolgoztunk egy D-ciklozozin-rezisztencia (*cycA* mutáns) detektálásán alapuló fluktuációs mutációanalízis rendszert. A módszer alkalmas gyakorlatilag a teljes mutációs spektrum detektálására, a detektálási folyamat neutrális a sejtek növekedése szempontjából (nem befolyásolja az eredményt), és nem igényel speciális genetikai hátteret. Megállapítottuk, hogy vad típusú K-12 (MG1655) sejtekben a *cycA* gén spontán mutációs rátája 6.54×10^{-6} ; a spektrumot a pontmutációk (kereteltolódás, báziscsere) dominálják. A mobil IS-elemek (IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS150) a mutációk 24%-át teszik ki. A vad típusból kialakított multidelációs (MDS42) törzsben a mobil elemek hiányában a spektrumnak ez a szegmense hiányzik. Fehérje-túltermelésre, illetve egyes toxikus plazmid-DNS-konstrukciók hatására a *cycA* mutációs ráta mérsékelten emelkedik; ezért elsősorban az IS-elemek okozta mutációk felelősek. Szelekciós hatások (növekedési előny) révén azonban a mérsékelt mutációs-ráta-emelkedés is drámai változásokat eredményez a stresszt okozó gén stabilitásában és a kultúra összetételében, s ebben domináns szerepe lehet az IS-elemeknek.

E7 – Jelátvitel

E7-01 A „PI4K230” foszfatidil-inozitol 4-kináz izoforma nukleoláris előfordulásának kísérletes vizsgálata

Kakuk A.¹, Kása A.¹, Friedländer E.², ifj. Vereb Gy.², Balla A.³, Balla T.³, Vereb Gy.¹

¹ DE, OEC, ² Orvosi Vegytani Intézet, ³ Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen; ³ Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

A jelátvitelben meghatározó szerepű foszfatidil-inozitol 4-kináz „PI4K230” izoformája etanollal fixált agyi metszeteken és különféle sejtvonalakban intenzív nukleoláris immunfluoreszcenciás jelet ad, amely a nukleolinnal kolokalizál és az enzimfehérje négy különböző epitópjára elleni antitesttel egyaránt kimutatható. A nukleoláris immunreaktivitás – a citoplazmatikus elterőlen – formaldehid (PFA) fixálás után nem észlelhető, azonban a PFA maszkírozó hatása utólagosan alkalmazott forró citrát-pufferes (pH 6,0) kezeléssel megszüntethető. Feltételezzük, hogy a PFA a PI4K230 izoformát és egy vele asszociáló nukleoláris komponens keresztkötve maszkírozza a PI4K230 epitópjait. A nukleoláris és citoplazmatikus PI4K230 azonosságára utal, hogy a PI4K230-specifikus siRNS-sel transzfekált COS-7 sejtekben az immunreaktív fehérje a nukleoluszból és a citoplazmából is gyakorlatilag teljesen eltűnik. Az siRNS a transzfekciót követő 24 órán belül a PI4K230 mRNS szintjét jelentősen csökkenti és a sejtek pusztulásához vezet. Permeabilizált HeLa sejtek ribonukleáz-A-kezelésekor a PI4K230 a nukleoluszból eltűnik, ami arra utal, hogy a PI4K230 RNS-függő módon kötődik a nukleolusznak. Eredményeink a PI4K230 nukleoláris lokalizációjának reverzibilitására és a foszfatidil-inozitol 4-kináz izoformák közül egyedülálló nukleoláris szerepére utalnak. (OTKA T 042975)

E7-02 A protein kináz C közvetlen hatása a p110/p85 foszfatidilinozitol 3-kinázra

Sipeki Sz., Faragó A.

SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

A tirozin kinázzal indított jelpályákban aktiválódó p110/p85 foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) produktuma kulcsszerepet játszik számos sejtfunkció szabályozásában: a túlélési jel kiváltásában, a transzláció fokozásában, illetve bizonyos jelpályák esetén specifikus sejtválaszokban, mint például a HGF/scatter faktor által indukált sejtszóródás vagy az inzulin által stimulált metabolikus változások. A PI3K 85 kDa regulátor alegysége a tirozin kináz receptor, illetve a receptor által foszforilált dokkoló fehérje megfelelő foszforozójaihoz kötődik. A PKC bizonyos receptorokat, illetve dokkoló fehérjéket foszforilálva, csökkenteni képes azok tirozin foszforilációs képességét. A HepG2 sejtek szóródását kiváltó HGF jelpályáit vizsgálva megállapítottuk, hogy a PI3K hozzájárul az Erk1/2 MAP kinázok aktiválásához is, amelyek hosszantartó aktiválódása elengedhetetlen a sejtmorzogáshoz. Megfigyeltük, hogy a HGF jelpályában a PKC a sejtmorzogás negatív modulátora, és mind az Erk1/2 MAP kinázok, mind a PI3K aktiválódásának időtartamát csökkenti. Ezzel szemben, sem a cMet-receptor, sem a Gab1 dokkoló fehérje tirozin foszforilációjában nem találtunk PKC-dependens csökkenést, a PKC negatív modulátor szerepe ilyen közvetett hatással nem magyarázható. *In vitro*, rekombináns enzimek segítségével kimutattuk, hogy a PI3K p110 α /p85 α izoformájának katalitikus alegységét a PKC foszforilálja és a foszforiláció az enzim aktivitásának csökkenését eredményezi. Összehasonlítva a p110 α , p110 β , valamint a p110 δ alegységeket tartalmazó PI3K komplexeket, kiderült, hogy a PKC a legintenzívebben a p110 β /p85 α komplex katalitikus alegységét foszforilálja. Valószínű, hogy a PKC közvetlenül is modulálhatja a PI3K aktivitását, és ezáltal azokat a folyamatokat, amelyekben a PI3K aktivitás mennyiségi paramétereinek döntő szerepe van.

E7-03 PKC izoenzimek szerepe a kalcineurin aktivitásának és expressziójának gátlásában forbolészterrel és Ca-ionoforral stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben

Szijgyártó Zs.¹, Szűcs K.¹, Bíró T.², Sipka S.³, Gergely P.¹

DE, OEC,¹ Orvosi Vegytani Intézet,² Élettani Intézet,³

³ III. sz. Belyógyászati Klinika, Debrecen

Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy mind az SLE kórképben, mind az egészséges donoroknál a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben csökkent a kalcineurin aktivitása 5 μ M Ca-ionofor (A23187) és 50 ng/ml forbolészter (PMA, forbol-12-mirisztát-13-acetát) együttes alkalmazásakor. Vizsgálni kívántuk a PMA-val és Ca-ionoforral stimulált, egészséges donoroktól származó perifériás mononukleáris sejtjeiben mért kalcineurinaktivitás csökkenésének lehetséges mechanizmusát, elsősorban azokat a jelátviteli folyamatokat, amelyekben a PKC és a kalcineurin kulcsszerepet játszik. Specifikus, sejtpermeabilis PKC-inhibitorokat alkalmazva (GF109203x, Gö6976, Rottlerin) vizsgáltuk, vajon a kalcineurinaktivitás-csökkenés a Ca-ionofor és/vagy a PMA hatásához rendelhető-e, és melyek azok a legfontosabb PKC izoenzimek, amelyek részt vesznek a folyamatban. Megfigyeltük, hogy mind a PMA, mind a Ca-ionofor hozzájárul a kalcineurin aktivitásának csökkenéséhez az enzim mRNS- és fehérjeszintjének modulálása nélkül. A két szer együttes alkalmazásakor a kalcineurin mRNS- és fehérjeszintje csökkent, és az enzimaktivitás jelentős mértékben gátlódott. Kimutattuk, hogy a szerek által stimulált jelátviteli útvonalban a klasszikus PKC izoenzimek (α , β , γ) játszanak kulcsfontosságú szerepet, mivel a Gö6976 cPKC inhibitor önmagában is képes volt a kalcineurin aktivitásában és expressziójában bekövetkező csökkenést visszaszorítani a kezelések után. Igazoltuk, hogy a jelátviteli molekula szerepét a PKC és a kalcineurin között a hiperfoszforilált endogén kalcineurininhibitor (cain) töltheti be. (OTKA T60620)

E7-04 A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma-fehérje foszforilációjának szabályozásában

Kiss A.¹, Lontay B.¹, Márkász L.², Oláh É.², Gergely P.¹, Erdődi F.¹

DE, OEC,¹ Orvosi Vegytani Intézet;² Gyermekklinika, Debrecen

A retinoblasztóma-fehérje (pRb) foszforilációja fontos szerepet játszik a sejtciklus során a G1/S-átmenet szabályozásában, valamint a pRb degradációjának gátlásában. A pRb defoszforilációjában a protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegységek (PP1c) szerepét feltételezik, a folyamatot szabályozó regulátor alegységet azonban még nem azonosították. Irodalmi adatok a pRb és a miozin foszfatáz holoenzim regulátor alegysége (MYPT) kölcsönhatására utalnak. Ezért THP-1 leukémiás sejtekben tanulmányoztuk foszfatáz inhibitorok és a MYPT lehetséges szerepét a pRb foszforilációs szintjének degradációjának szabályozásában. Az apoptózist indukáló daunorubicin- (DNR) kezelés növelte a sejtek foszfatázaktivitását. A protein foszfatázokat gátló kalikulin-A (CLA) jelenlétében a DNR-kezelte sejtek fokozott túlélése volt megfigyelhető. A CLA csökkentette a DNR által kiváltott kaszpáz-3-aktiválódás és pRb-degradáció mértékét is. Immunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk a MYPT és a pRb kölcsönhatását. Tanulmányoztuk a kezelések hatását a MYPT foszforilációjára és sejten belüli lokalizációjára is. Kontroll és DNR-kezelte sejtekben a defoszforilált MYPT főleg a sejtmagban található. A CLA-kezelés hatására megfigyelhető a MYPT foszforilációja, a MYPT és a PP1c részleges transzlokációja a citoplazmába, valamint a MYPT részleges degradációja is. Mindezek a tényezők a foszfatázaktivitás átmeneti csökkenését és a pRb foszforilációs szintjének növekedését eredményezhetik. Eredményeink szerint a PP1c pRb szubsztráthoz történő irányításában a MYPT fontos szerepet játszhat és ez a miozin foszfatáz új szabályozó funkciójára utal. (OTKA T043296)

E7-05 Kalciumérzékeny jelátviteli útvonalak az *in vitro* porcképződés szabályozásában

Zákány R.¹, Matta Cs.¹, Juhász T.¹, Fodor J.², Szijgyártó Zs.³, Csernoch L.², Módos L.¹, Gergely P.³

DE, OEC,¹ Anatómiai Intézet;² Élettani Intézet;³ Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A porcdifferenciáció tanulmányozásának széles körben elfogadott modellje a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer nagysűrűségű kondrogenikus mezenchimális sejt kultúra. E kísérleti rendszer közismerten rendkívül érzékeny a tenyésztő médium Ca-koncentrációjának változásaira. Kísérleteink során egyes, az intracelluláris Ca-koncentráció változására érzékeny, jelátviteli folyamatokban fontos szerepet betöltő enzimeknek (PKC izoenzimek, kalcineurin/PP2B) a porcdifferenciáció

szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk: a fenti enzimek expressziós mintázatának és aktivitásának változásait detektáltuk a porcdifferenciáció különböző fázisaiban. Vizsgáltuk az enzimek farmakológiai inhibitorainak a porcképződésre, a porcspecifikus transzkripció faktor Sox9 expressziójára és foszforilációjára, a porcmatrixkomponensek (II. típusú kollagén, aggregán) termelésére, a porcsejtek életképességére és proliferációs kapacitására gyakorolt hatásait. Azonosítani kívántuk a kalcineurin és a PKCmu *target* jelátviteli molekuláját(i)t. A porcsejtben zajló Ca-érzékeny jelátvitel egyik fő mediátorának az ERK1/2 tűnik. Jelenleg folyó kísérleteinkben keressük az összefüggést a differenciálódó porcsejtben mérhető intracelluláris Ca-koncentráció változásai és a fenti enzimek aktivitása között, valamint eddigi eredményeink megerősítésére tranziens transzfekciós technikával vizsgáljuk a kalcineurin, a PKCmu és a PKCdelta szerepét a porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli folyamatokban. (OTKA K-60620, DE OEC Mecénatúra)

E7-06 Az intracelluláris Ca-koncentráció változásai az *in vitro* porcdifferenciáció során

Matta Cs.¹, Juhász T.¹, Fodor J.², Deli T.², Csernoch L.², Módos L.¹, Gergely P.³, Zákány R.¹

DE, OEC,¹ Anatómiai,² Élettani Intézet;³ Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában több, az intracelluláris kalciumkoncentráció változására érzékeny enzim vesz részt (PKC, PP2B). Arra a kérdésre kerestük a választ, milyen mintázatot követ a porcképződés során a differenciálódó sejtekben mérhető intracelluláris Ca-szint. Kísérleteinket csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer kondrogenikus mezenchimális sejttenyészeteken végeztük. A mérés előtt a sejteket Fura-2-AM fluoreszcens festékkel töltöttük fel: a kalciumot kötött festék abszorpció maximuma eltér a kalciumot nem kötött festékétől, így a két különböző abszorpció maximumnak megfelelő hullámhosszon gerjesztve a sejtet, az emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából a Ca-koncentráció kiszámolható. Kontrollkörülmenyek között a kerek morfológiájú kondrocitákban és a nyúlványos fibroblaszt típusú sejtekben is jelentős Ca-emelkedést mutatható ki a tenyésztés 3. napján. Megfigyeltük, hogy a folyamatosan adagolt 2 μ M ciklosporin-A (PP2B-inhibitor) hatására – mely előző kísérleteink alapján porcképződést gátló hatásúnak bizonyult – a kerek és a nyúlványos sejtekben is magasabb a Ca-szint, ugyanakkor a kontrollkörülmenyek között megfigyelhető, 3. napi „csúcs” elmarad. A kondrogenikus sejtek a Ca-szint emelkedésével reagálnak az extracellulárisan adagolt ATP-re; a sejtválasz mintázata ionotróp P2X-receptor jelenlétére utal. Ezt a választ azonban kizárólag a 3. napon kapjuk. Jelenleg folyik az ATP által kiváltott választért felelős receptor azonosítása és a fő intracelluláris Ca-kötő fehérje, a kalmoldulin expressziós mintázatának vizsgálata. (OTKA K-60620, DE OEC Mecénatúra)

E7-07 Primer porcosodó sejt kultúrák tranziens transzfekciójának optimalizálása

Juhász T.¹, Matta Cs.¹, Mészár Z.¹, Nagy G.⁵, Hajas Gy.⁵, Szijgyártó Zs.³, Dobrosi N.³, Czifra G.³, Karácsonyi Z.⁴, Bíró T.³, Módos L.¹, Gergely P.³, Zákány R.¹

DE, OEC,¹ Anatómiai Intézet;² Orvosi Vegytani Intézet;³ Élettani Intézet;⁴ Orthopédiai Klinika;⁵ Bőrklinika, Debrecen

Csirkeembriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor-sejtekből előállított primer sejt kultúrákban kerestük azt a transzfekciós módszert, amely nagy hatékonysággal képes idegen DNS bejuttatására anélkül, hogy számottevő citotoxikus vagy apoptotikus hatása lenne. Három lipofekciós (Lipofectamine2000, SuperFect Transzfekciós Reagens, DMRIE-C Reagens), egy amfipatikus reagenst (Saint Mix) használó, valamint egy nukleofekciós (amaxa) módszert próbáltunk ki az optimális transzfekciós technika beállításához. A FACS módszerrel végzett hatékonyságvizsgálat eredményeként a nukleofekciós módszer esetében magas effektivitást láttunk, azonban az elektroporáció komoly károkat okoz a sejtmembrán integritásában, így a sejtek folyamatos pusztulása miatt a kísérlet utolsó napjára porctelepeket nem tudtunk detektálni. A Saint Mix és a Lipofectamine2000 transzfekciós reagens segítségével megfelelő transzfekciós hatékonyságot kaptunk, valamint az apoptózis mértéke is elfogadható volt, de a GFP-expresszió a porcképződés mértékének is szignifikáns csökkenését eredményezte. Az egyes transzfekciós módszerek nem gyakorolnak számottevő hatást a sejtek életképességére, de az osztódási ráta erőteljesen visszaesik, különösen GFP-expresszió esetén. A transzfekciós reagensnek önmagukban nem okoztak csökkenést a Sox9 és az aggregán mag- (core) protein mRNS-expressziójában, azonban a Saint Mix reagenssel történő transzfekció kivételével, a GFP expressziója csökkent

Sox9-mRNS-expressziót okozott. Vizsgálataink alapján a Saint Mix reagenst felhasználó transzfekciós módszer a legalkalmasabb a nagy sűrűségű kultúrák transzfekciójára. (OTKA K-60620, DE OEC Mecenatúra)

E7-08 A laminin–diztroglükán-kölcsönhatás szerepe a sejtmotogás és -húzóerő szabályozásában

Méhes E., Czirikó A.

ELTE, TTK, Biológiai Fizika Tanszék, Budapest

Kísérleteinkben C2C12-egermioblaszt-sejtvonalat ültettünk laminin-1 fehérjékkel bevont rugalmas aljzatra. Az egyes sejtek mozgását egy számítógépes rendszerrel követtük és elemeztük. Eközben a rugalmas aljzaton a sejtek által létrehozott deformációkat fluoreszcens technikával vizualizáltuk, majd képelemzéssel kiszámítottuk a sejtek által kifejtett erőket. Megmutatjuk, hogy a laminin-1 megnöveli a C2C12-sejtek motilitását. Ezt a hatást a lamininreceptoroként ismert diztroglükán (DG) és az integrinek közvetítik. A laminin-1 motogén hatását nagyrészt ki tudtuk védeni a DG-laminin-kötést specifikusan gátló (funkcióblokkoló) ellenanyaggal. A sejtek sebessége a DG blokkolása után egy órán belül lecsökken, viszont a sejtek által kifejtett erő jóval később megnő. Ezzel ellentétben, az integrin-laminin-kötést kompetitíven gátló RGD-szekvenciát tartalmazó oligopeptid nem változtatja meg a C2C12-sejtek sebességét, azonban a sejtek által kifejtett erőket néhány órán belül tartósan lecsökkentik. Az eredmények egyrészt demonstrálják, hogy nincsen szoros összefüggés a sejtek vándorlási sebessége és az általuk az aljzatra kifejtett erő nagysága között, másrészt arra utalnak, hogy a DG részt vesz a sejtmotilitás szabályozásában a DG–Grb2–Sos1–Rac1–PAK1 útvonalon, de közvetlenül nem vesz részt a mechanikai hatások közvetítésében.

E7-09 A szöveti transzglutamináz gátolja a májsejtek Fas-közvetítette sejtelhalását és a szívizomsejtek ischemia-reperfúziós károsodását

Sarang Zs.¹, Molnár P.², Németh T.², Váradi J.³, Nagy N.³, Tócsai Á.³, P. G. Mastrobardino⁴, M. Pacentini⁴, Fésüs L.¹, Szondy Zs.¹

DE, OEC¹ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet,² Patológiai Intézet,

³ Gyógyszerhatástani Intézet, Debrecen; ⁴ Univ. Tor Vergata, Dept. of Biology, Rome, Italy

A szöveti transzglutamináz (TG2) multifunkcionális fehérje, amely fehérje-keresztalkotó aktivitásán kívül, G-fehérjeként, BH3 doménnel rendelkező fehérjeként is működik, és különféle fehérje-fehérje interakciókban vehet részt. Az intézetünkben folyó kutatómunka először arra hívta fel a figyelmet, hogy az enzim működése hozzájárulhat a sejthalálprogram zavartalanulásához. Itt TG2-kiűtött egerek vizsgálatán keresztül arról számoltunk be, hogy a TG2 egyes sejtekben a sejthalállal szembeni védő funkciót is elláthat. A májban a TG2 az alfa-1B adrenerg jelátviteli útvonalon G-fehérje szerepet tölt be. Kísérleteinkben azt mutatjuk be, hogy ez a jelátviteli útvonal gátolja a májsejtek Fas-közvetítette sejtelhalását, s így májsérülések kapcsán a FasL proliferációs és regenerációs jelet tud biztosítani a májsejtek számára. A szívizomsejtekben viszont még nem ismert mechanizmuson keresztül befolyásolja a mitokondrium ATP-termelését. TG2 hiányában az ATP hiányos szívizom fokozottan érzékeny az ischemia-reperfúziós károsodással szemben. (OTKA:T049445)

E7-10 A CB1- és GABA_B-receptorok kölcsönhatása a patkánygy hippocampális membránjaiban

R. Cinar¹, K. Mackie², Freund T. F.³, Szűcs M.¹

¹ MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ² Depts. of Anesthesiology, Physiology and Biophysics, University of Washington School of Medicine, Seattle, USA; ³ MTA KOKI, Budapest

Mind több bizonyíték utal arra, hogy a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok homo- és heterooligomereket alkothatnak, és a létrejött multiprotein-komplekxek ligandumkötési és jelátviteli tulajdonságai módosultak. Kísérleteinkben a GABA_B- és CB1-cannabinoidreceptorok részletes jellemzését végeztük ligandumstimulált [³⁵S]GTPγS-kötési teszt segítségével patkánygy hippocampális membránkészítményben. A CB1-agonista Win55,212-2 potensen stimulálta a [³⁵S]GTPγS-kötést, ED₅₀=33±6 nM, E_{max}=48±2,5%, mely hatást a CB1-antagonista SR141716 teljes mértékben gátolta, igazolva hogy a CB1-receptorok funkcionálisak. A GABA_B-agonista baclofen és SKF 97541 71% és 66% maximális [³⁵S]GTPγS-kötésnövekedést eredményezett. A GABA_B-antagonista phaclofen mikromólos koncentrációban gátolta, nanomólos koncentrációban nem befolyásolta a baclofen hatását. Ugyanakkor a Win55,212-2 különböző dózisával együtt adott phaclofen nano- és szubnanomólos dózisban kismértékben ugyan, de csökkentette a [³⁵S]GTPγS-kötés maximális értékét a Win55,212-2 egyedüli hatásához képest. A specifikus CB1-antagonista AM251 és a GABA_B-receptor agonista SKF97541 együttes alkalmazása szintén az egyedi receptoroktól eltérő ligandumkötő profilt eredményezett. Eredményeink arra utalnak, hogy a CB1- és GABA_B-receptorok egymással kölcsönhatásban állnak patkánygy hippocampusban, amely az egyedi receptoroktól eltérő farmakológiai sajátosságokat eredményez és heterooligomerizációval jöhet létre. (NKTH DNT 08/2004)

E7-11 A hízósejt által termelt hisztamin szerepe a tumorelles immunválaszban

Hegyesi H., Tóth S., Molnár V., Falus A.

SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

Feltételezzük, hogy a dermatofibrosarcoma-sejtek (DFS) termelte hisztamin (HA) autokrin módon fokozza a tumornövekedést, és a lokális immunválasz Th2 irányú polarizációját segíti elő. Megvizsgáltuk hogyan módosítja a tumorprogressziót a humorális immunválaszban résztvevő hízósejt jelenléte, s ez mennyiben függ az általa termelt HA-tól. HA-szintézisre képtelen hisztidin-dekarboxiláz-hiányos (HDC KO) állatokban modellezhető a szisztémás HA-hiány hatása, valamint HA-termelésre képtelen hízósejtek izolálásával *in vitro* kísérleteket is tervezhettünk. Modellünkben DFS sejtvonalat *syngraft*ként oltottuk az egerek egyik oldalára, míg másik oldalukon a tumor mellett csontvelőből differenciált hízósejtszuszpenziót (HDC vad- típus vagy HDC KO) is adtunk. Vizsgáltuk a Th1/Th2 egyensúlyt jellemző citokinek expresszióját. Mértük az interleukin-12 (IL-12) és interleukin-10 (IL-10) mRNS mennyiségét, kvantitatív RT-PCR módszerrel. *In vitro* „co-culture” tenyészetben vizsgáltuk a tumorsejt-hízósejt-interakciót: proliferáció, migráció és citokintermelés szempontjából. A HDC-vad egereken gyorsabban nő a tumor, s ez a hatás hízósejtekkel tovább fokozható. A HDC KO egerek tumoraiban az IL-12 mennyisége három és félszeresére növekedett a vad típusú egerekre oltottakhoz képest. A tumorindukált HDC KO hízósejtek migrációs képessége fokozott, a tumorsejt hatására kevesebb IL-10-et, IL-12-t és TGF-β-t termelnek, mint a vad típusú hízósejtek. Megállapítottuk, hogy a HA, feltételezhetően az IL-12-termelés gátlásával csökkenti a tumorelles immunválaszt.

E8 – Új gyógyszercélpontok azonosítása

E8-01 Jelátviteli folyamatok szerepe a poli-(ADP-ribóz) polimerázok gátlószereinek kardioprotektív hatásában

Kovács K., Pálfi A., Berente Z., ifj. Gallyas F., Sümegi B.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

A klasszikus elképzelés szerint a poli-(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) gátlószerei azáltal fejtenek ki kardioprotektív hatást oxidatív stressz során, hogy megakadályozzák a sejtekben a NAD⁺ és az ATP deplécióját, amelyet az enzim oxidációs DNS-károsodás indukálta aktiválódása okoz. Korábbi eredményeink azonban arra utaltak, hogy az enzim gátlása jelentősen befolyásolja számos jelátviteli kinázaskad aktivitását, amelyeknek komoly szerepe lehet a kardioprotekcióban. Ennek igazolására két rendszerben is vizsgáltuk a PARP-gátlók (4-hidroxi-kinazolin és L-2286) hatását; Langendorff-perfundált izolált szívben ischemia-reperfúzió (IR) során és a krónikus szívelégtelenség patkánymodelljében, az izoproterenol indukálta miokardiális infarktusból (ISO). Eredményeink szerint,

a 4-hidroxi-kinazolin jelentősen javította a posztischemiás szív energiametabolizmusát (31P NMR spektroszkópiás eredmények alapján) és a vizsgált szívfunkciós paramétereket. Továbbá, csökkentette az IR indukálta lipidperoxidációt, proteinoxidációt, a képződött szabad gyökök mennyiségét és az infarktuszagyságát, eközben megnövelte az Akt és GSK-3β foszforilációját. A PI3-kináz blokkolása, amely megakadályozza az Akt aktiválódását, lerontotta a PARP-gátló pozitív hatásait. Az L-2286-kezelés szignifikánsan csökkentette a posztinfarktusos szívelégtelenséget, meggátolta a hipertrófiát és az intersticiális fibrózist, valamint megőrizte a respirációs komplexek integritását. Eközben, az L-2286 lecsökkentette a hipertrófiával asszociálható megnövekedett panPKC, PKC α/β és PKC δ foszforilációját, amely hatások eredményezhetik az antihipertrófiás GSK-3β aktiválódását. Mindezek az eredmények bizonyítják, hogy a PARP-gátlók kardioprotektív hatása jelentős mértékben mediálódik citoprotektív jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül, továbbá új terápiás célpontot szolgáltatnak a posztinfarktusos szívkárosodások kivédésére.

E8-02 Ischémiás szívkárosodások kivédése egy új, SOD-mimetikus mPT-inhibitorral

ifj. Gallyas F., Bognár Z., Kálai T., Pálfi A., Hideg K., Sümegi B., Várbíró G. PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

A fejlett országokban az akut miokardiális ischémia vezet halálok, a túlélő betegeknek pedig következményes károsodások jelentősen ronthatják a beteg életminőségét. Az egészségügyi ellátás, kiesett munkaidő és csökkent munkaképesség mind az egyed, mint a társadalom számára jelentős terheket ró, ezért új terápiás eljárások kifejlesztéséhez komoly gazdasági érdek is fűződik. Ischémia-reperfúzió (IR) során a megnövekedett intracelluláris kalcium- és reaktív oxigénspeciesz- (ROS) szint mitokondriális permeabilitástranzió (mPT) okoz, ami jelentős szerepet játszik a következményes sejtkárosodások és a sejthalál mediálásában. Az mPT gátlása csökkenti a nekrotikus sejthalált, de a reperfúzió során folyamatosan képződő ROS hozzájárulhat a permeabilitás pórus időleges megnyílásához, ezáltal az elhúzódó apoptotikus sejthalál kialakulásához. Ezen folyamatok minél hatékonyabb gátlása érdekében, az amidaron szubsztituálásával kifejlesztettük az első szuperoxid-dizmutáz- (SOD) mimetikus mPT-inhibitor (HO-3538). A HO-3538 gátolta az mPT-t és a mitokondriális proapoptotikus fehérjék felszabadulását izolált mitokondriumokban. Továbbá ROS-elimináló és antiapoptotikus hatású volt kardiomioblaszt-sejtvonalban oxidatív stresszben, valamint szignifikánsan javította a mitokondriális energiametabolizmust és a funkcionális szívparamétereket, egyszersmint csökkentette a lipidperoxidációt, proteinoxidációt és infarktuszórt Langendorff-perfundált izolált szívben IR során. Mindezen hatásaiban előnyösebb volt, mint a két összetevője, az amidaron és a SOD-mimetikus pirrolszármazék. Az eredmények bizonyítják, hogy a SOD-mimetikus mPT-inhibitorok ideális gyógyszerfejlesztési célpontok lehetnek a posztinfarktuszórt szívkárosodások kivédésére.

E8-03 Tirozinkináz-gátlók makrofág-funkciókra gyakorolt toxikus hatásai

Hrabák A.¹, Örfi L.^{2,3}, Bökönyi Gy.¹, Kéri Gy.^{1,3}

SE,¹ Orvosi Vegytan Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet;

² Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest; ³ Vichem Kft., Budapest

A receptor tirozinkinázok (RTK) daganatok kialakulásában játszott szerepe miatt nagy jelentősége van olyan inhibitorok szintézisének, amelyek hatékonyan és jelentősebb mellékhatások nélkül képesek RTK gátlásra. A makrofágok nitrogén-monoxid- (NO) termelésének szerepet tulajdonítanak a tumorsejtek elleni immunválaszban. Hat, kémiai szerkezetüket tekintve különböző, de kis koncentrációban is hatékony kinázgátló vegyület hatását hasonlítottuk össze patkánymakrofágok NO-szintézisére és fagocitáló képességére, mint alapvető immunológiai szerepükre. Az RTK-gátlók között voltak olyanok, amelyek erősen gátolták a *M. luteus* baktériumok komplementfüggő fagocitózisát makrofágokba, anélkül, hogy a baktériumok sejthez kötődését csökkentették volna. A legerősebb hatást a 6-(2,6-diklor-fenil)-2-(4-hidroxi-fenil-amino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]-pirimidin-7-on mutatta, míg három kinázgátló nem befolyásolta a fagocitózist. Ugyanezek a vegyületek a makrofágok NOS-expresszióját is csökkentették, valamint apoptózist indítottak el a makrofágokban, amit a mitokondriális potenciál megszűnése alapján detektáltunk. A fagocitózis és az NO-termelés károsodása nem befolyásolta az RTK-gátlószerek hatását COS 7 sejtvonalra, mind az élő-sejtszám-csökkenés, mind az apoptózis változatlan maradt. A kísérletek lehetővé teszik olyan tirozinkináz-gátló vegyületek kiválasztását a gyógyszerfejlesztésben, amelyek hatékonyságuk mellett nem mutatnak kedvezőtlen mellékhatásokat az immunrendszer sejtjeire. Jelentősebb számú tirozinkináz-gátló tesztelése alapján QSAR módszerrel lehetséges azoknak a vegyületcsaládoknak a kiválasztása, amelyek eleget tesznek ezeknek a követelményeknek.

E8-04 A ferulaldehid hatása az LPS indukálta endotoxikus sokkra egerekben

Radnai B., Tucsak Zs., Hocsák E., Vető S., Németh V., Bognár E., Grász D., Berente Z., ifj. Gallyas F., Sümegi B.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, MTA Mitochondrium

Funkciói és Betegségei Kutatócsoport, Pécs

A szeptikus sokk súlyos szisztémás bakteriális fertőzés eredményeként alakul ki, és csak az USA-ban évente megközelítően 50 ezer ember esik áldozatul. A betegség kezelésében az antibiotikumok hatástalanságának oka, hogy a sokkot nem közvetlenül a baktérium anyagcsereje, hanem a sejtfallában található lipopoliszacharid (LPS), más néven endotoxin váltja ki. Az LPS kinázokad-rendszeren (MAPK, Akt) keresztül transzkripció faktorokat (NFκB) aktívál, melyek a sejt számára káros inflammatorikus citokinek (TNF-α, TF) és kemokinek elválasztásához vezetnek;

hipotenziót, lázat, szöveti nekrozist, hemodinamikai kollapszust és több szervre kiterjedő károsodást, ezáltal végül halált okoznak. Kísérleteinkben egy antioxidáns tulajdonságú ferulaldehid, a ferulaldehid hatását vizsgáltuk az LPS okozta endotoxikus sokk kialakulásának mechanizmusára, egerekben. Azt találtuk, hogy a ferulaldehid (6 mg/kg) jelentősen megnövelte az egerek túlélését az LPS-kezelést követően. A gyulladásos folyamatokat *in vivo* NMR-leképezési technikával követtük nyomon, amelynek segítségével markáns különbségeket detektáltunk a ferulaldehiddel kezelt és a kezeletlen állatok thoracális és abdominális régióiban. A ferulaldehid szignifikánsan csökkentette az LPS okozta JNK- és AKT-foszforilációt, és gátolta az NFκB-aktivációt és annak nukleáris transzlokációját a kezelt egerek májában. Az LPS indukálta TNFα szérumkoncentrációja közel harmadára esett vissza a ferulaldehid-kezelést követően. Ezen kísérleteink azt bizonyítják, hogy a ferulaldehid jelentős szerepet tölthet be az LPS indukálta endotoxikus sokk kivédésében.

E8-05 Glukuronidtranszporterek az endoplazmás retikulumban

Csala M.

SE, Orvosi Vegytan, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

A gyógyszerek metabolizmusában a membránokon keresztüli transzport fontos szerepet játszik, s az érintett transzporterek jellemzése és azonosítása lehetővé teszi, hogy jobban megismerhessük a farmakokinetikai folyamatokat, illetve hogy új farmakológiai célpontokat határozhatunk meg. Célul tűztük ki a humán sejtek endoplazmás retikulumban (ER) működő glukuronidtranszporter fehérjék jellemzését, valamint a működésüket befolyásoló hatóanyagok keresését. Funkcionális vizsgálataink azt mutatták, hogy az ER-ban több glukuronidtranszporter található, és ezek specificitása elsősorban az aglikon méretén alapul. Bakteriális homológokat már sikeresen használták fel a megfelelő humán transzporterek génjének azonosítására. Humán EST adatbázisokban *in silico* az *E. coli* glukuronidtranszporterének (GUS-B) lehetséges humán homológjait kerestünk, és találtunk egy klónt, amely egy ismeretlen funkciójú fehérjét kódol. A szekvencia prediktív analízise szerint ez egy 10-12 transzmembrán hélixet tartalmazó integráns membránfehérje nagy valószínűséggel transzporter. Tartalmaz egy ismert konzervatív domént („Na⁺/melibioszimporter és rokon transzporterek”), amelyet számos bakteriális monoszacharid-, diszacharid-, galaktozid- és glukuronidtranszporterben mutattak ki. A fehérje génjét a humán, egér- és patkánygenomban egyaránt megtaláltuk; ezek egymással nagyfokú hasonlóságot mutatnak. A gén expresszióját humán májban RT-PCR módszerrel sikerült kimutatni. A szövetspecifikus expresszió és a fehérjetranszporter funkciójának vizsgálata folyamatban van.

E8-06 Az oszteoklasztogenezist befolyásoló gének expressziós változása Paget-kórban

Nagy Zs.¹, Gergely P.¹, Donáth J.², Poór Gy.¹

ORFI,¹ Molekuláris Biológiai Laboratórium,² Reumatológiai és Metabolikus

Oszteológiai Osztály, Budapest

A csontok Paget-kórja ismeretlen etiopatogenezisű, fokozott oszteoklaszt- és oszteoblaszt-tevékenységgel járó megbetegedés. Jóllehet a betegség kapcsán több gén kóros szerepe is felmerült, a csontmetabolizmusban lényeges sejtszintű folyamatok génexpressziós változásai Paget-kórban nem vagy csak kevésbé ismertek. Legújabbban a sequestosoma 1 gén (SQSTM1) gén mutációit hozták összefüggésbe a betegséggel, a gén kifejeződésének hatása azonban ismeretlen. A betegség patogenezisének feltárásában a csontbiopsziás anyag mellett teljes vér monociták is alkalmasak lehetnek az oszteoklasztogenezisben szerepet játszó gének vizsgálatára. Hazai sporadikus és familiáris előfordulású Paget-kóros betegek génexpressziós vizsgálatát végeztük el monocitákon és limfocitákon. 20 Paget-kóros beteg és 20 egészséges, korban és nemből illesztett kontrollégyént vizsgáltunk. Teljes perifériás vér monocitából és limfocitából totál RNS-t izoláltunk, amelyen a csontanyagcsereben lényeges gének (RANK, RANKL, OPG, TNF-α, TRAF6 és SQSTM1) expressziós vizsgálatát végeztük, az SQSTM1 7. és 8. exonjának mutációit szekvenálással detektáltuk. Paget-kórban az oszteoklasztogenezisben szerepet játszó gének expressziós mintázata jellegzetes képet mutatott, és szignifikánsan különbözött a kontrollokétól. Az NF-κB és RANK-RANKL génjei konkvensen túl-, míg a TNF-α géneje alulexpresszált volt. A monocita/limfocita génexpressziós arány Paget-kórban a SQSTM1 által kódolt p62 mRNS tekintetében tért el a kontrollétól. A génexpressziós adatok alapján nemcsak az etiopatogenezis válhat világosabbá, de új kezelési célpontok is körvonalazódhatnak, melyek felvetik a lehetőségét biológiai terápiák alkalmazhatóságának Paget-kórban.

E9 – Bioinformatika, rendszerbiológia

E9-01 A transzkripció kezdőpont körüli szekvenciák nukleotidelozslás- és motívumtípusvizsgálata különböző emlős- és rizs promótereknél

Pálffy T., Sebestyén E., Nagy T., Tóth G., Barta E.
MBK, Bioinformatikai Csoport, Gödöllő

A több évtizede folyó kutatások ellenére a transzkripció iniciációjának pontos szabályozása – különösen a magasabb rendű élőlényekben – valójában nagyon kevésbé ismert. Munkánk során az eddig általában használt módszerektől eltérő megközelítést alkalmaztunk. Négy mag (core) promóter adatkészletet hoztunk létre. Az elsőt a DBTSS adatbázisból 30964 db humán, a másodikban az EPD adatbázisból 13046 rizs transzkripció kezdőpont- (TSS) környéki régiót (TSS ± 50 bázispár, összesen 101 bp) gyűjtöttük össze. A harmadik adatkészletet a csoportunkban kifejlesztett DoOP adatbázis (<http://doop.abc.hu>) alapján hoztuk létre úgy, azon emlősszekvenciákat tartalmazó ortológ promótercsoportokból, amelyeknek 500-as szekvenciájában levő humán szekvenciájához DBTSS által annotált TSS-t tudtunk rendelni. Ezután a promóterszekvenciák DIALIGN általi illesztése alapján kivettük a megfelelő TSS-környéki szekvenciákat az előzőekhez hasonlóan. A negyedik mintában olyan promóterszekvenciákat gyűjtöttünk össze, amelyek TATA-box-szekvenciát tartalmaznak, ellenben a kísérleti eredmények szerint transzkripció mégsem történik róluk. A kapott és a TSS-t pontosan az 51. pozícióban tartalmazó szekvenciákot vizsgáltuk az összes lehetséges 1–6 bp-os oligonukleotidok gyakoriság eloszlását a TSS-hez képest mért pozíció függvényében, kétféle módon. Több olyan motívumot is találtunk, melyek felülreprezentáltsága lehetséges fontos szerepükre utal. Ezek együttes előfordulását, illetve az ezek alapján létrehozott csoportokat is elemeztük. Eredményeink alapján háromféle szempont szerint lehet széjelválasztani a promótereket a TSS-környéki szekvencia sajátosságai alapján: (1) tartalmaznak-e TATA boxot a TSS előtt, (2) tartalmaznak-e egy pirimidin-purin (PyPu) dinukleotidot a TSS-nél, (3) tartalmaznak-e GC boxokat a TSS két oldalán? Meglepetésünkre úgy tűnik, hogy a hat típus bármelyik kombinációja előfordulhat együtt, bár bizonyos preferenciákat is lehet találni, így például a TATA boxot tartalmazó igazi promótereknél magasabb a PyPu és alacsonyabb a GC-boxok előfordulása.

E9-02 Új megközelítés a gyógyszertervezésben: a molekuláris interakciós ujjlenyomat

Simon Z.¹, Z. Yang¹, Hetényi Cs.¹, Bikádi Zs.², Málnási-Csizmadia A.¹
¹ ELTE, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest; ² Virtua Drug Kft., Budapest

A gyógyszerek engedélyezésének nem feltétele a gyógyszer célfehérjének, hatásmechanizmusának pontos ismerete, ugyanakkor nemkívánatos mellékhatások léphetnek föl, melyek számtalan potenciális gyógyszer-molekula elvetéséhez vezetnek. Csoportunk új megközelítést alkalmaz a lehetséges mellékhatásoknak már a gyógyszertervezés korai szakaszában történő kiküszöbölésére, mely a költséghatékonyság jelentős növekedését eredményezheti. Az FDA által elfogadott, 1000-nél is több gyógyszer-molekulának és ezek célfehérjének (néhány száz fehérje) kölcsönhatásait vizsgáltuk inverz dokkolással úgy, hogy minden ligandumra dokkolunk az összes fehérjét. Az eredmény egy körülbelül 300*1000-es mátrix, mely a dokkolásienergia-értékeket tartalmazza. Egy-egy ligandum vektora adja a minden ligandumra nézve különböző molekuláris interakciós ujjlenyomatot (*molecular interaction fingerprint*, MIF). Amennyiben egy új, az adatbázisban nem szereplő kis molekulára dokkoljuk az összes fehérjét, és annak ujjlenyomatát összevetjük a többi ujjlenyomattal, megkapjuk a várható kölcsönhatási mintázatot, mely egyben a potenciális mellékhatások egy részét is előrejelzi. Ennek ismeretében pedig lehetőség nyílik a célirányos, ezeket kiküszöbölő gyógyszertervezésre.

E9-03 A cirkadián óra és a sejtciklus kapcsolatának modellje

Csikász-Nagy A.¹, Zámorszky J.¹, C. I. Hong²

¹ BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék és BME-MTA Molekuláris Hálózatok Dinamikája Kutatócsoport, Budapest; ² Dept. of Genetics, Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA

Csaknem minden élőlényre hatással van a nappalok és az éjjelek váltakozása, ám e külső hatásoktól függetlenül is lüktet bennünk a belső cirkadián óra, amire már a 17. században felfigyelték tudósok. A sejtek életciklusát irányító „gépezet” megismerésével egyidőben, a 70-es években felmerült a napi ritmus és a sejtciklus-oscillátorok kapcsolata, de akkor még egyik rendszer molekuláris alapjait sem ismerték. Az elmúlt években már az emlőssejtek cirkadián és sejtciklus-szabályzó hálózatáról is részletes képet kaphattunk, sőt felfedezték, hogy a sejtciklus G2-M átmenetének (mitózisba lépésének) egyik kulcsenzime, a Wee1 cirkadián szabályzás alatt áll. A két komplex rendszer kapcsoltságának vizsgálatára matematikai modellt alkottunk és számítógépes szimulációkkal analizáltuk a kapott differenciálegyenlet-rendszert. A modell megalkotásához egy korábban publikált részletes emlőssejtciklus-modellt (mely tartalmazza az emlősökre jellemző négy Cdk/ciklin komplexet és a restriktív pont szabályzását) és egy egyszerűsített cirkadiánóra-modellt használtunk. A mitózist gátló Wee1 transzkripcióját a cirkadián óra BMAL1/CLOCK fehérjekomplex aktivitásától tettük függővé. A kapott cirkadián oscillátor képes szinkronizálni egy populáció sejtjeinek ciklusidejét, amennyiben a közel áll a cirkadián ritmus 24 órájához. Ha a sejtek átlagban ennél lassabban vagy gyorsabban osztódnak, és a cirkadián óra hatása erős a sejt-ciklusra, akkor kvantált sejtciklusidőket figyelhetünk meg. Szintén felfedeztük, hogy erős kapcsoltság megnöveli a sejtciklusidők szórását amennyiben azok átlaga nagyban eltér 24 órától, ellenben lecsökkenti a szórását, ha a tömegduplázódási idő közel áll 24 órához. Régióta vitatott, hogy emlőssejteknel megfigyelhető-e az élesztőknél tapasztalt, méret-kontrollfüggő sejtciklus-szabályzás jelensége. Modellünk azt mutatja, hogy a napi ritmus hosszához közeli sejtciklusidőknél a méretkontroll nem megfigyelhető, míg ettől eltérő növekedési sebességeknél a méretkontroll szerepe fontos lehet.

E9-04 Immunom: rendszerbiológiai kutatások az ember immunrendszerén

Ortutay Cs. P.¹, M. Vihinen^{1,2}

¹ Institute of Medical Technology, FI-33014 University of Tampere, Finland; ² Research Unit, Tampere University Hospital, FI-33520 Tampere, Finland

A rendszerbiológia (*system biology*) új, interdiszciplináris megközelítés komplex biológiai rendszerek működésének tanulmányozására. Ennek a megközelítésnek kiváló célpontja az emberi immunrendszer, amelyet alaposan tanulmányoztak már a részt vevő szervek, sejtek, molekulák szintjén, de mindezek ellenére még hiányzik egy átfogó lista az immunfolyamatokban részt vevő génekről, illetve fehérjékről. Csoportunkban azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy elkészítjük az immunrendszer molekuláris definícióját, vagyis összegyűjtjük azokat a géneket és fehérjéket, melyek alapvető fontosságúak az immunfolyamatok szempontjából. Az elkészült lista 652 gént tartalmaz. Ugyancsak elkészült ezeknek a géneknek és fehérjetermékeiknek átfogó jellemzése. A továbbiakban ebből az adatbázisból kiindulva több irányban kezdünk el rendszerbiológiai vizsgálatokat bioinformatikai módszerekkel. Ezek során feltérképeztük az egyes gének, illetve a hozzájuk kapcsolódó funkciók, fehérjedomének evolúcióját. Ugyancsak vizsgáltuk ezen fehérjék között kialakuló fehérjekölcsönhatás-hálózat felépülését az evolúció során. A harmadik vizsgálódási irányunk a gének expressziójának összehasonlító vizsgálata *microarray*-kísérleti adatokból. Előadásom során a gének összegyűjtéséről, jellemzéséről, illetve az evolúciós vizsgálatok eredményeiről számolok be.

P – Poszterek

P-01 A magi capkötő komplex mutációja növényekben a szárazságtűrést befolyásolja

Papp I.¹, Bacsó R.¹, Koncz Cs.²

¹ BCE, KeTK, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék, Budapest;

² Max-Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany

Lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) azonosítottuk egy, az RNS-metabolizmusban résztvevő fehérjét kódoló gén mutációját (*cap binding protein 20*, CBP20). A CBP20 fehérje az mRNS érésének kezdeti lépéseiben vesz részt,

a sejtmagi capkötő komplex (nCBC) része. Az nCBC komplexnek szerepet tulajdonítanak az mRNS 3' végének érésében, hasításában, illetve a magból való exportjában. A komplex működése *Arabidopsis*-ban nem létfontosságú, hiánya viszont a növényi sejt működését úgy változtatja meg, hogy az abszcizinsav növényi hormonra fokozottan érzékennyé válik. Ennek következtében gázcserenyílásai a normálisnál gyorsabban záródnak, a növény kevesebb vizet párologtat, a szárazságnak jobban ellenáll. A mutáció a növény egyéb tulajdonságait csak kis mértékben érinti – a

mutáns a vad típusnál valamivel lassabban fejlődik, kompaktabb, egyéb tekintetben azonban ahhoz hasonló morfológiájú, fertilis. Az nCBC komplex résztvevőinek homológjai az állat- és növényvilágban széles körben megtalálhatók, az embert is beleértve. Mutáns fenotípus leírása azonban eddig az élesztő mellett csak *Arabidopsis* növény esetében ismert.

P-02 Caskin-1 és Abi-2 kapcsolatának vizsgálata idegsejtekben

Balázs A., Illés A., Solti Z., Lukács M., Bógel G., Buday L.
SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

Az adapterfehérjék – melyek számos domént tartalmaznak, és gyakran molekuláris állványfehérjeként szerepelnek, más proteinek kapcsolnak szignalizációs hálózatba – különösen fontosak a szinapszisokban, ahol a nagyobb fehérjekomplexek a pre- és posztzinaptikus jelátviteli útvonalak kulcsszereplői. Az egyik ilyen, szinapszisban előforduló állványfehérje a Caskin (*Cask-interacting-protein*). A Caskint elsőként a Cask nevű fehérjével való interakciója alapján írták le, szerkezetét tekintve N-terminális ANK-ismétlésekből, SH3 doménből, azt követő SAM doménekből, prolingazdag régióból és egy rövid C-terminális doménből áll. Élesztő kéthibrid módszerrel azt találtuk, hogy az Abi-2 fehérje SH3 doménjével kötődik a Caskinhoz. Ezt a kapcsolatot további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokkal is igazoltuk. Az Abi (*Abl-interactor*) fehérjét az Abl és Arg tirozin kinázok szubsztrátjaiként azonosították, az Abl fehérjék transzformálós képességét szabályozzák. Az Abi-2 egy olyan fehérjekomplex tagja, amelynek – az aktin citoskeletton szabályozásában fontos – Wave fehérjére gátló hatása van. Az Abi2 ubiquiter fehérje, legnagyobb mennyiségben az agyban fejeződik ki. Expressziója, hasonlóan a Caskinhoz, az embrionális időszak utolsó harmadában jelenik meg. Az idegrendszerben betöltött szerepe még nem tisztázott, de újabb kísérletek és a géntűtött egér vizsgálata arra utal, hogy fontos szerepe lehet az idegrendszer kialakulásában és fejlődésében.

P-03 A *Drosophila melanogaster* p53 tumorsuppresszor különféle DNS-károsodások hatására különféle célgének csoportját aktiválja

Újfaludi Zs., Boros I., Bálint É.

SZTE, Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A p53 a sejtet érő stresszhatásokra, például DNS-károsodás hatására transzkripciósi faktorként aktiválódik, és az általa indukált célgének válaszreakciókat – sejtciklus-leállítást, DNS-reparációt vagy apoptózist – indítanak be. A *Drosophila melanogaster* p53-ról (Dmp53) megállapították, hogy szükséges a röntgensugárzás utáni stresszválaszhoz, azonban szerepét az ultraibolya sugárzás (UV) által indukált folyamatokban eddig kevésbé vizsgálták. Megállapítottuk, hogy vad típusú *Drosophilák* esetén a félettáls dózis 150 J/m², míg a mutánsok esetében 40 J/m², tehát a Dmp53 nullmutáns *Drosophilák* fokozottan UV-érzékenyek. A Dmp53 által indukált célgének azonosítására UV-kezelést, illetve kezeletlen vad típusú, illetve Dmp53 nullmutáns lárvák mRNS-expressziós profilját vizsgáltuk *microarray* technológiával. Vad típusú állatokban 67 olyan gént találtunk, amely transzkriptumának szintje UV hatására indukálódott és a Dmp53 nullmutánsokban nem változott (ezek tekinthetők a Dmp53 specifikus célgénjeinek), továbbá 24 gént mutatott Dmp53-függő repressziót. További kísérleteink során néhány azonosított célgén, valamint bizonyos apoptotikus gének expressziójának változását vizsgáltuk UV- és röntgensugárzás hatására kvantitatív RT-PCR technika alkalmazásával. Azt találtuk, hogy az ebi, tou, ftz-f1 és Ark gének expressziója UV-kezelés hatására Dmp53-függően indukálódott, azonban nem változott röntgen hatására, ellenben a rpr mRNS-szintje röntgensugárzás hatására indukciót mutatott, de nem változott UV hatására. A rho és a hid gének expressziója mindkét hatásra Dmp53-függően megemelkedett. Eredményeink elsőként mutatják ki, hogy a Dmp53 különféle DNS-károsodás hatására különféle célgéneket aktivál.

P-04 Multidrogrezisztens HIV-1 proteinázok klónozási stratégiája, tisztítása és enzimatikai jellemzése

Bander P., Bagossi P., Boross P., Tózsér J.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A HIV-1 proteáz (PR) egy 11 kDa molekulatömegű aszpartil enzim, mely homodimer formában aktív. Az enzim nélkülözhetetlen a retrovírus életciklusában, a fertőzőképes vírusrészcsek kialakulásában, éppen ezért az egyik fő terápiás célpont. Napjainkban már számos proteinázinhibitor klinikai használatban van, de problémát okoz a magas mutációs ráta. A megjelenő mutáns formák esetében az inhibitorok hatékonysága nagyságrendekkel csökken, vagy hatástalanná válik a kezelés. Munkánk során antivirális terápiában résztvevő betegekből izolált, több proteináz

inhibitorra is rezisztens HIV-1 proteinázokat kívántunk megfelelő vektorrendszerben expresszálni, tisztítani és a vad típusú HIV-1 proteinázzal összehasonlítani. A klónozás során pMalC2-H₆ vektorrendszert használtuk. Az eredeti konstrukciót céljainknak megfelelően, PCR technika segítségével, inzerációs mutagenézissel módosítottuk. A fehérjét expresszáltuk és hatékony módszert kísérleteztünk ki a proteinek tisztítására. Teszteltük a fehérjék Xa enzimmel való hasíthatóságát, a kihatott proteáz tisztíthatóságát, aggregációs hajlamát. A vad és mutáns HIV-1 proteinázok részletes karakterizálása, enzimkinetikai jellemzése jelenleg zajlik. Molekuláris modellezés alapján arra utaló eredményeket kaptunk, hogy a mutációk hatására főleg az S1 és kisebb mértékben az S3 zseb növekedése tapasztalható. A vizsgálatok során kapott specifikációs eredményeket az enzimek molekuláris modelljeinek figyelembevételével értelmezzük. (OTKA T43482, T34479)

P-05 Gyulladások hatása porc eredetű sejtkultúrák génexpressziójára

Bárkai T., Kravjár I., Kiss L., Deák F.

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A különféle autoimmun- és kopáseredetű ízületi gyulladások hátterében alapvetően az immunrendszer fokozott működése áll. Újabb adatok valószínűsítik, hogy az ízületeket alkotó legfontosabb szövetek, a porc és az ízületi tok sejtei maguk is hozzájárulnak a gyulladás kifejlődéséhez. Hogy a jövőben közvetlenül a porcra ható gyógyszerjelölteket lehessen keresni, szükséges a porcban gyulladás hatására bekövetkező génkifejeződés-változások és aktiváló jelátviteli utak ismerete. Ehhez mindenek előtt egy tesztrendszert állítunk össze, melyben a porcsejtek viselkedését modellezni tudjuk. Az SW1353 humán chondrosarcomát és egy patkány-chondrosarcoma sejtvonalat választottuk kísérleteinkhez. Ezekben *Northern blot* hibridizációval és RT-PCR módszerrel kimutattuk, hogy a porc degradációjáért felelős metalloproteinázok, mint az MMP-13 és az MT1-MMP expressziója nő az idő függvényében a gyulladások hatására. Ugyanakkor a mester transzkripciósi faktor Sox9-et, és egyes porcmátrix-molekulákat kódoló mRNS-ek mennyisége csökken. Stabil transzfektáns klónok luciferázaktivitásmérésével bizonyítottuk, hogy az általunk tesztelt valamennyi gyulladások – IL-1 β , TNF α , PMA, PHA – növeli a gyulladás egyik fő mediátoraként ismert NF κ B aktív formájának mennyiségét. Az eddigi vizsgálatainkba bevont gyulladások csökkentőkkel kapcsolatos eredményeink eltérnek a várakozásoktól, ennek oka lehet az eltérő sejtvonal, más kísérleti körülmények, és sok egyéb tényező. Az SW1353 sejtvonal alkalmas modellrendszer lehet a porcsejtben ízületi gyulladás körülményei között végbemenő génműködésbeli változások és szabályozásuk tanulmányozására. (GVOP 3.1.1.-2004-05-0267/3.0, ETT 132/2003, OTKA 49608)

P-06 Nitroziláció hatása PC12-sejtek neuronális differenciációjára

Bátor L., Varga J., Harci A., Stark B., Tarjáni O., Szeberényi J.

PTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs

A jelátviteli fehérjék posztranszlációs módosulásai jelentős szerepet játszanak a szignáltranszdukció folyamatok szabályozásában. Munkánk célja a nitrogén-oxid (NO) esetleges moduláló hatásának tanulmányozása volt PC12-patkányphaeochromocytoma-sejtek NGF-jelátvitelében. Nitroprussid-nátriumot (SNP) használtunk NO-donorként. A NO egyrészt serkenti a guanil cikláz működését, másrészt kovalensen kötődik egyes fehérjékhez. Az általunk használt PC12-sejtek differenciációjában a cGMP jelátviteli út nem vesz részt, ezért a tapasztalt hatások valószínűleg a fehérjenitroziláció következményei. Kis dózisú SNP kezelés gyorsítja az NGF hatására bekövetkező differenciációt, nagyobb (de nem toxikus) koncentrációjú SNP-kezelés viszont gátolja azt. Megvizsgáltuk a jelenség biokémiai hátterét: rövid idejű SNP-kezelés dózissal arányosan megnöveli az Akt és ERK fehérjék foszforilációját. NGF-fel együtt adva felerősítik egymás hatását. Pár napos, differenciációt gátló koncentrációjú SNP-kezelés gátolja a CiklinD1 és p21 fehérjék NGF hatására bekövetkező indukcióját, míg ennél alacsonyabb koncentrációban nem gátolja az NGF hatását. Fos és Jun fehérjék mennyiségét az SNP dózisfüggő módon emeli. A Ras fehérje nitrozilációjának hatását a neuronális differenciációra domináns negatív Ras expresszázó PC12-szubklón vizsgálatával teszteltük. Az ERK SNP és NGF indukálta foszforilációja Ras-függő, míg az Akt fehérje foszforilációja nem. A p21(WAF-1), Ciklin D1, Fos és Jun fehérjéket az NGF Ras jelátviteli úton indukálja, míg a PCNA expresszióját csökkenti. Az SNP Ras-tól független úton befolyásolja ezen fehérjék expresszióját. (INTAS 51022, OTKA T037528, ETT 073/2001)

P-07 A P53 és a *Drosophila melanogaster* Bip2, valamint humán homologója, a taf3 közötti interakció funkcionális vizsgálata

Bereczki O., Pardi N., Bálint É., Boros I.

SZTE, Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A p53 tumorszuppresszor gén mutációja a leggyakrabban kimutatott rendellenesség rákos daganatokban. Stresszmentes, egészséges sejtekben a p53 fehérje szintje nagyon alacsony, viszont a sejtet érő különböző stresszhatásokra, DNS-károsodásra, hipoxiára vagy aktiválódott onkogénekre válaszként leállítja a sejtciklust vagy apoptózist indukál. A p53-at aktiváló mechanizmusok még nem teljesen ismertek, ezért fontosnak tartottuk olyan új fehérjék azonosítását, melyek képesek a p53 fehérje transzkripció aktivitását szabályozni. Élesztő kéthibrid rendszer alkalmazásával számos *Drosophila melanogaster* p53 fehérjével kölcsönható új partnert azonosítottunk. A kölcsönható fehérjék egyike, melyet további vizsgálatra kiválasztottunk a Bip2, mely egy eddig kevésbé jellemzett TATA-kötő fehérjeasszociál faktor (TAF), a TFIID, RNS polimeráz II transzkripció faktor egyik alegysége, humán homologója a TAF3. További élesztő kéthibrid kísérletben kimutattuk, hogy a Bip2 fehérje nemcsak a Dmp53-mal, hanem a hp53-mal, sőt a humán p53 géncsalád másik két tagjával a p73α és p73β fehérjékkel is képes interakcióba lépni. Ezt az eredményt GST pull-down módszerrel *in vitro* is megerősítettük. Továbbá megvizsgáltuk a Dmp53, a p53 és az egér TAF3 közötti lehetséges interakciót *in vitro*, és azt találtuk, hogy a TAF3 kötődött mind a GST-Dmp53-hoz, mind pedig GST-p53-hoz, de a GST gyöngyökhöz nem. Megvizsgáltuk a lehetséges kölcsönható partner túltermelésének hatását, és azt találtuk, hogy a TAF3 túltermelése mind a Hp53, mind a p73α és β transzkripció aktivitását csökkentette. Jelenleg az egér TAF3 és a Hp53 közötti kölcsönhatás meglétének *in vivo* megerősítését végezzük ko-immunprecipitáció módszerrel.

P-08 A Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH új delta-opioid peptidantagonista *in vivo* és *in vitro* jellemzése egérgyagi membránokban

Birkás B.¹, Tóth G.¹, T. Wen², J. Pintar², Szűcs M.¹

¹ MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ² Dept. of Neuroscience and Cell Biology, UMDNJ, Piscataway, NJ, USA

A Tyr-Tic-Phe-Phe-OH (TIPP) tetrapeptid a hatékony, szelektív δ-opioid-antagonisták egy új családjának a prototípusa. A TIPP alpmolekulának konformációsan gátolt és proteolízisrezisztens származékát, a Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH peptidet állítottuk elő abból a célból, hogy egérgyagi membránokban tanulmányozhassuk a receptorhoz való kötődési és a jelátadási folyamatokat. Az új ligandum szignifikánsan nem befolyásolta a [³⁵S]GTPγS-kötés alaktivitását a vizsgált GDP-koncentrációtartományban, igazolva antagonistá jellegét. A feltételezett δ₁-agonista DPDPE 137%-kal stimulálta a [³⁵S]GTPγS-kötést (EC₅₀ = 834 nM), amit a Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH igen hatékonyan gátolt, 100 nM koncentrációnál teljes gátlást okozott. Ugyanakkor a μ-opioidagonista DAGO [³⁵S]GTPγS-stimuláló hatását még 1 μM koncentráción sem befolyásolta. Míg a DPDE [³⁵S]GTPγS-kötődést stimuláló hatása jelentősen lecsökkent a δ-opioidreceptorra géniütiött egérgyagi membránokban, a DAGO hatása itt is hasonló volt, mint a vad típusban. A DPDE (8 μg) által kiváltott intrathecalis analgészia jelentősen csökkent, ha a Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH hasonló dózist adagoltuk. Ugyanakkor a feltételezett δ₂-agonista Ile5,6-deltorfin antinociceptív hatását a Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH nem antagonizálta. Eredményeink azt mutatják, hogy a Tyr-Tic-(2S,3R)βMePhe-Phe-OH igen potens, új, δ₁-specifikus opioidantagonista. (NKTH DNT 08/2004 (MS), OTKA TS-049817 (MS) és NIH DA-18592 (JP))

P-09 A C faktor hatásának proteomikai analízise streptomycesekben

Birkó Zs.¹, Medzihraszky K.², Hunyadi-Gulyás É.², Buzás K.², Biró S.¹

¹ DE, OEC, Humán genetikai Intézet, Debrecen; ² SZBK, Proteomikai Kutatócsoport, Szeged

A *Streptomyces* Gram+, fonalas növekedésű, szaprofita talajbaktériumok, a talajok természetes populációjának 1-20%-át alkotják és számos szekunder metabolitot termelnek. Ilyenek a gyógyászatban használt bioaktív anyagok is, melyeknek kb. 55%-át a *Streptomyces* termelik. A morfológiai differenciálódás bekapcsolásában és a differenciálódással összefüggő változások szabályozásában valószínűleg több, egymással kapcsolódó és egymásra ható regulációs rendszer működik közre. Ezekben a folyamatokban szerepet játszó gének azonosításában, az életciklus eltérő stádiumaiban való expressziójuk analizálásában kiindulási pontként a különböző differenciálódási rendellenességet mutató mutánsok szolgál-

nak. Az intézetünkben azonosított C faktor az első tiszta formában előállított, *Streptomyces*ekben azonosított fehérjetermészetű, extracellulárisan előforduló autoregulátor. Szilárd táptalajon a C faktort nem termelő *S. griseus* NRRLB-2682 vad típusú törzs légmicéliumot nem képző (kopasz), A faktort (a légmicélium-képzést és antibiotikum-termelést szabályozó regulációs kaszkádok működését kapcsolja be) nem termelő mutánsában légmicélium-képzést indukál, befolyásolja a sporuláció és antibiotikum-képzés folyamatát. Jelenlegi munkánk során proteomikai analízis keretében a fent említett vad típusú törzs, a kopasz mutáns és a kopasz mutánsnak a C faktort kis kópiaszámban hordozó transzformánsának extracelluláris expressziós mintázatát hasonlítjuk össze, annak kiderítésére, hogy a C faktor mely gének átírását szabályozza, melyek bekapcsolása légmicélium képzéshez az antibiotikum-termelés fokozásához vezet. Szeretnénk továbbá megállapítani, a C faktor és az A faktor által szabályozott regulációs rendszerek viszonyát, azaz hol van a kapcsolódási pont a két regulátor között.

P-10 A cortactin szerepe az integrinek funkciójában

Bögel G., Illés A., Balázs A., Solti Z., Buday L.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

A sejtek mozgásában kitüntetett szerepet játszik az aktin-citoskeleton, mivel a sejtek szélén polimerizálódó aktinszálak hozzák létre az előrehaladást lehetővé tevő széles sejtnyúlványokat, a lamellipódiumokat. Ezekben az aktinszálak elágazódásait a szabályozottan működő Arp2/3 komplex hozza létre. A cortactin fehérje az Arp2/3 komplex egyik aktivátora. N-terminális része képes ehhez a komplexhez kötődni, valamint ismétlődő szekvenciáival az aktinszálak oldalához kapcsolódhat, C-terminális része a szabályozásban és a fehérje-fehérje interakcióban játszik szerepet. Kísérleteink során szuszpenzióban tartott COS7 sejteket fibronektinre ültettünk, ilyenkor az integrin jelpálya aktivációjának következtében lamellipódiumok jelennek meg a sejtek szélén, ezáltal azok szétterülnek. A cortactin N-, illetve C-terminális részeit GFP fúziós fehérje formájában túlexpresszálok sejtek szétterülése jelentősen gátlódott. Ebből az következtetés vonható le, hogy cortactin N-terminális része nem elegendő az Arp2/3 komplex aktiválásához, hanem a C-terminális részéhez kapcsolódó fehérjék is szükségesek ehhez. A C-terminális rész feltételezésünk szerint ezeket a fehérjéket szekvesztrálja, és ezért domináns negatív módon viselkedik. További vizsgálataink során az endogén cortactin sejten belüli koncentrációját plazmidalapú hajtű-RNS-technikával jelentősen lecsökkentettük. A cortactinhiányos sejteknek nemcsak a szétterülése gátlódott, hanem jelentősen csökkent az adhéziós képességük is. A jelenségre több alternatív magyarázat is lehetséges. Az egyik szerint a cortactin a vezikulumtranszportban játszik szerepet, és hiányában nem jutnak a sejt felszínére az integrineket tartalmazó vezikulumok. Nem zárható ki az sem, hogy a cortactin az integrinek affinitásának szabályozásában, vagy clusterképzésükben játszik szerepet.

P-11 Egy módosított amiodaronanalóg és az amiodaron szerepének összehasonlítása apoptikus és nekrotikus sejthalálban

Bognár Z., Szántó Á., Szabó A., Hantó K., Kovács K., Veres B., ifj. Gallyas F., Sümegi B.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Ischemiareperfüzió során a megemelkedett kalciumszint és a reaktív oxigénradikálok (ROS) mitokondriális permeabilitástranzíciót (mPT) indukálnak, mely kulcsszerepet játszik különféle károsodások és a sejthalál mediálásában. Az mPT gátlása csökkenti a nekrotikus sejthalál kialakulását. A reperfüzió alatti folyamatos ROS-produkció hozzájárul a pórus átmeneti megnyitáshoz, ami a késleltett apoptotikus sejthalál kezdetét jelzi. Az amiodaron széles körben alkalmazott és hatásos antiaritmiás szer, de a vegyületnek nagy koncentrációban vannak toxikus mellékhatásai is. Összehasonlítottuk egy amiodaronanalóg, a HO3538 és az amiodaron mitokondriális energiametabolizmusra gyakorolt hatását perfundált szíven és izolált mitokondriumon, valamint megvizsgáltuk a mitokondriális funkciókat (respiráció, membránpotenciál és permeabilitástranzíció). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az amiodaron és a HO3538 védi a mitokondriális energiametabolizmust perfundált szíven ischemiareperfüzió alatt. Az amiodaron kis koncentrációban túlnyomórészt membránhoz kötött formában van jelen, védi a szívet és a mitokondriális energiametabolizmust ischemiareperfüziós károsodás esetén Langendorff-perfundált szívmodellben. 10mM-os koncentrációig a szer gátolja a Ca²⁺-indukált mitokondriális duzzadást, míg nagyobb koncentrációban, önmagában is indukál Ciklosporin-A- (CsA) független permeabilitástranzíciót. Kis koncentrációban a HO3538 az amiodaronhoz hasonló hatással bír, ugyanakkor meg-

gátolja az apoptózisindukáló faktor (AIF) ischiemiareperfúzió során történő nukleáris transzlokációját, nagyobb koncentrációban viszont nem indukál mitokondriális duzzadást. A ROS-képződéssel szemben is szignifikánsan jobban véd, mint az amiodaron. Az amiodaronanalógok, mint például a HO3538, tehát protektív hatással rendelkeznek, mivel gátolják a mitokondriális apoptotikus útvonalat: az mPT-₁ membránpotenciál esését és a proapoptotikus fehérjék felszabadulását.

P-12 A kissejtes tüdőrákra jellemző globális DNS-hipermetilációs mintázat analízise

Boros G., Buslig J., Miko E., Czimmerer Zs., Scholtz B.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A bronchogén carcinomák között 25%-os előfordulási gyakoriságú kissejtes tüdőrák egyik jellemző tulajdonsága, hogy már a kis méretű tumoroknál is kialakul az erős metasztázáló képesség, amely a betegséget rendkívül rosszindulatú, rossz prognózisú tumorfajtvá teszi. Éppen ezért fontos olyan molekuláris markerek azonosítása, amelyek lehetővé tennék a vizsgált tumor korai diagnózisát. Számos gén 5' promóter régiója CpG-szigettel fedt, amelyeknek aberráns hipermetilációja általánosan megfigyelt jelenség az egyes tumorokban, s amely az adott gén expressziójának gátlását váltja ki, így jelentősen hozzájárul a tumor kialakulásához, progressziójához. A különböző ráktípusok a rájuk jellemző hipermetilációs mintázattal rendelkeznek. Mivel a tumorsejtekből származó genom DNS a perifériás vérben is megjelenik, a tumorspecifikus hipermetilált DNS-szakaszok jól detektálhatóak, és potenciális biomarkerként funkcionálhatnak a korai rákdiagnózishoz. Azon célból, hogy feltérképezzük a kissejtes tüdőrákra (SCLC) jellemző potenciálisan hipermetilált géneket, cDNS-microarray segítségével vizsgáltuk a globális génexpressziós változásokat három SCLC-sejtvonal (H69, HTB-172, HTB-184) kezeletlen és kezelt mintáiban. A kezelést 5-aza-2'-deoxicitidin és TSA együttes alkalmazásával végeztük, amelyek a genom DNS-demetilációját és az addig hipermetiláció miatt gátolt gének újraaktiválódását idézik elő. A GeneSpring GX 7.3 microarray analízisszoftver segítségével 328 olyan gént azonosítottunk, amelyek expressziója mindhárom sejtvonalban legalább kétszeresére nőtt a kezelés hatására. Az ily módon kiszűrt gének közül azonosítottunk azokat, amelyek 5' promóter régiója CpG-szigettel fedett, ez összesen 114 gént eredményezett. A további megfontolások alapján kiválasztott célgének metilációs állapotát biszulfid-szekvenálással fogjuk ellenőrizni nemcsak a sejtvonalakon, hanem archiv, formalinfixált, paraffinba ágyazott primer tumorokból izolált genom DNS-en is.

P-13 A máj glikogénanyagcseréjének szabályozása izolált primer hepatocitákban

Brunyánszki A.¹, Docsa T.², Czifrák K.³, Felföldi N.³, Somsák L.³, Gergely P.¹

DE, OEC, ¹ Orvosi Vegytani Intézet; ² MTA Apoptózis és Jelátvitel Kutatócsoport; ³ TTK Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen

A diabetes mellitus genetikai és környezeti tényezők együttes hatására alakulhat ki. A betegek többsége nem szorul inzulinkezelésre (NIDDM). A vér normoglycaemiájának kialakításában, így a NIDDM gyógyításában a glikogén lebontásának a gátlása és szintézisének elősegítése lehet az egyik eredményes megoldás. A máj glikogéntartalmának jelentős szerepe van a vér glükózkoncentrációjának megfelelő szinten tartásában, így a vérben a glükózkoncentráció csökkentésének egyik lehetősége a glikogénfoszforiláz-aktivitásának gátlása megfelelően tervezett molekulákkal. Munkacsoportunk korábban *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel igazolta, hogy a β -D-glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH), amely hat szintetikus lépésben állítható elő, nemcsak hatékonyan gátolja a glikogén foszforiláz aktivitását ($K_i=5-10 \mu\text{M}$), hanem jelentősen fokozza a foszforilázaktív (foszforilált) formájának defoszforilációját is. Vizsgáltuk a TH hatását a máj glikogénmetabolizmusra humán hepatoma-sejtvonalon (HEP-G2) és Wistar patkányokból izolált primer hepatocitákban. 250 μM TH jelentősen fokozta a glikogénfoszforiláz-aktív formájának defoszforilációját (inaktiválódását) mind normoglycaemiás (5 mM glükóz), mind hyperglycaemiás (25 mM glükóz) körülmények között. A TH alkalmazása gyorsította a glükagon által megemelt glikogénfoszforiláz-aktivitás csökkentését is. Eredményeink arra utalnak, hogy a hyperglycaemia csökkenthető a máj glikogénfoszforiláz-aktivitását gátló és defoszforilációját elősegítő glükozanalóg vegyületekkel. (OTKA K60620)

P-14 A gyermekkori akut limfoblasztos leukémiára jellemző DNS-hipermetilációs mintázat meghatározása

Buslig J.¹, Miko E.¹, Boros G.¹, Kiss Cs.², Oláh É.², Scholtz B.¹

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Genomika Központ; ² Gyermekklinika, Debrecen

A DNS-hipermetiláció, mely a gének szabályozó régióit érintheti, a génexpresszió gátlását eredményezi, mint az a tumorszuppresszor gének esetében is megfigyelhető. Ez a folyamat jelentős szerepet játszik a tumorszifformációban. A különböző ráktípusok eltérő, az illető rákra jellemző hipermetilációs mintázattal rendelkeznek. A gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában (ALL) aberránsan hipermetilált gének meghatározásának érdekében globális génexpressziós analízist (Applied Biosystems *human microarray*) végeztünk három különböző ALL sejtvonalban (REH, MN60, Nalm6), 5-aza-2-deoxicitidin- és trichostatinkezelést követően. A demetiláció hatására magasabb szinten expresszálódó gének metilációs állapotát MIRA analízissel, illetve biszulfid-szekvenálással ellenőriztük. ALL-es páciensek csontvelőmintáiból, illetve kontrollmintákból izolált gDNS-en metilációs-specifikus kvantitatív RT PCR módszerrel határoztuk meg a kiválasztott gének metilációs állapotát. Eredményeink alapján sikerült olyan géneket azonosítani, melyek ALL-ben hipermetiláltak, de a normál klinikai mintákban nem. Vizsgálatainkat nagyszámú ALL-es páciensen kell elvégeznünk, annak érdekében, hogy megállapítsuk a hipermetilációs mintázat és a páciensek terápiára adott válaszreakciója közötti összefüggést. A kifejlesztett metiláció specifikus RT kvantitatív PCR *assay*-ket a minimális reziduális betegség nyomonkövetésére is szeretnénk felhasználni.

P-15 A kissejtes tüdőrák mikro-RNS-profiljának analízise stem-loop RT kvantitatív PCR módszerrel

Czimmerer Zs.¹, Boros G.¹, Dezső B.², Scholtz B.¹

DE, OEC, ¹ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Genomika Központ;

² Patológiai Intézet, Debrecen

A mikroRNS-ek (miRNS) 20-22 nukleotid hosszúságú nemkódoló RNS-molekulák, melyek részt vesznek a génexpresszió szabályozásában általában, hogy a *target* mRNS 3' UTR-régiójához kapcsolódva gátolják a transzlációt, illetve bizonyos esetekben az mRNS degradációját váltják ki. Az elmúlt két év kutatási eredményei azt mutatják, hogy a miRNS-ek hozzájárulhatnak a tumorszifformáció folyamatához. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az ismert miRNS gének 50%-a tumorokban deaktív/amplifikált kromoszómarégiókban található. A legismertebb ilyen miRNS-csoport a 13. kromoszómán lévő mir17-92 policisztron, mely régió amplifikációját illetve a kódolt miRNS-ek túlexpresszióját megfigyelték B-sejtes limfómákban és újabban kissejtes tüdőrákban (SCLC) is. A munkacsoportunk által vizsgált daganattípus egy neuroendokrin eredetű, korán metasztázáló tumor, a kissejtes tüdőrák (SCLC). Céluunk olyan miRNS-ek azonosítása, melyek megváltozott expressziója SCLC-ben a metasztázist elősegítheti. Az előkísérletekben munkacsoportunk összehasonlította négy SCLC sejtvonal és a normál tüdőszövet miRNS-profilját, miRNS *microarray* technológiával. Munkánk célja a *microarray*-eredmények alapján kiválasztott miRNS-ek expressziójának további vizsgálata volt, a *microarray*-adatok ellenőrzése, és további adatgyűjtés céljából. *Stem-loop* RT PCR technikával vizsgáltam a kiválasztott miRNS-ek expresszióját: a) normál tüdőszövetben, b) a *microarray*-kísérletekben használt SCLC sejtvonalakban, c) archivált, primer tumormintákból egymástól makrodisszekcióval elválasztott tumoros és normál fenotípust mutató szövetrészekből izolált RNS mintákban.

P-16 Immunreguláció és konzervált nemkódoló szekvenciák

Đuriš R.¹, Takács L.², W. M. Hempel², Fehér Zs.¹

¹ DE, OEC, Humán genetikai Intézet, Debrecen; ² Biosystems International,

Paris, France

A konzervált nemkódoló szekvenciák (CNS-ek) legalább 100 bp hosszú és a különböző gerinces fajok között legalább 75% hasonlóságot mutató régiók. Transzgenikus egereken bizonyították, hogy az 5q31 régióban az IL-4 és IL-13 gén között elhelyezkedő CNS1-nek az IL-4, IL-5 és IL-13 expressziójának keresztül szerepe van az allergiás folyamatok szabályozásában. A kísérleti adatokból arra következtethetünk, hogy az exogén eredetű CNS1 kitérít a nukleoplazmából azokat a transzkripciós faktorokat, melyek a genomai CNS1-hez kötődnek, így gátolja annak pozitív regulációs hatását. Céluunk tisztázni, hogy a CNS1 többszörös ismétlődő formában való klónozását retrovirális vektorban, mely alapja lehet az allergiás folyamatok génterápiás kezelésének. A retrovírus-transzfekeciót követően vizsgáljuk hatását a különböző immunológiai paraméterekre *in vitro* és *in vivo* rendszerekben. A kérdés az, hogy mindez egyedi eset-e, és csak a CNS1 biológiai szerepe ilyen, vagy más CNS-eknek is van hasonló génregulációs szerepe. Elvégeztük a 16q13-as régió – melyet a 16-os kromoszómagyulladási autoimmunbetegségre hajlamosító régiójának is neveznek – bioinformatikai analízist. Megállapítottuk, hogy a régióban olyan CNS-ek helyezkednek el, melyek közül több nagy valószínűséggel szerepet játszhat immunológiai, immunpatológiai folyamatok szabályo-

zásában. Megállapításunk alapja, hogy a CNS-ek elhelyezkedése összefüggést mutat a régióban elhelyezkedő gének (CCL22, CX3CL1, CCL17) lokalizációjával, tulajdonságaik alapján a régióban elhelyezkedő egyéb jellegű konzervált régióktól (UTR, exon) jól megkülönböztethetők, a szekvenciák – analízisünk alapján – releváns immunregulációs transzkripció faktorok kötőhelyei helyezkednek el.

P-17 A poli-(ADP-ribóz) glikohidroláz enzim siRNS-sel történő gátlásának következményei a549 sejtekben

Erdélyi K., Gergely P., Virág L.

DE, OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A poli-(ADP)-ribóziláció dinamikus, posztranszlációs módosítás, mely során a poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) a NAD-ot nikotinamidra és ADP-ribóz egységre hasítja, majd az ADP-ribóz egységekből polimert szintetizál, és azt megfelelő akceptorfehérjékhez kapcsolja. DNS-károsodás során a PARP-1 aktiválódik, és nagy mennyiségű poli-(ADP-ribóz) polimert szintetizál. Ezeknek a polimereknek az életideje viszonylag rövid, lebontásukért a poli-(ADP-ribóz) glikohidroláz enzim (PARG) felel. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy PARG-deficiens állati modellekben a felhalmozódó poli-(ADP-ribóz) polimerek korai letalitást okoznak. Munkánk során a PARG-gén represszióját gátló RNS segítségével próbáltuk megvalósítani. Ehhez egy vektoralapú ddrNSi módszert választottunk; a targetszekvenciát először egy GFP fúziós fehérjét tartalmazó vektorba klónoztuk, majd HEK239T, illetve A549 sejtekbe transzfektáltuk. A transzekciós hatékonyságot immunfluoreszcenciával ellenőriztük. Transziens transzekcióval közel 50%-os mRNS szintű gátlást értünk el. Jobb hatékonyság eléréséhez ezt a szekvenciát stabil transzekcióra is alkalmas vektorba klónoztuk. Ezzel az eljárással már 80%-os gátlást tudtunk elérni. A PARG enzimaktivitásának meghatározásához kifejlesztettünk egy sejtes alapú ELISA módszert, ennek segítségével *in vitro* meghatároztuk a transzfektált sejtek lizátumából nyert PARG-aktivitást; ez a kontrollsejtekhez képest jelentősen kisebbnek bizonyult. Hidrogén-peroxidos kezelést követően A549-sejtekben intenzív PARP-1-aktiváció következik be. Megfigyeltük, hogy a gátló RNS-sel transzfektált sejtekben jelentősen nő a polimerek mennyisége, és azok lebomlása nagymértékben elhúzódik. Vizsgáljuk, hogy a jelenségnek van-e szerepe a sejthalálban. (OTKA K60780)

P-18 siRNS alkalmazása egy multidrogrezisztencia-fehérje, az ABCG2 kifejeződésének gátlására

Fehér A., Türk D., Sarkadi B., Német K.

OGYIK, Hematológiai és Immunológiai Intézet, Kísérletes Génterápiás Laboratórium, Budapest

Az ABCG2/MXR/BCRP fehérje egy ABC-transzporter, melynek szerepe van a daganatok citotoxikus drogokkal szembeni védelemében, ezáltal hozzájárul a multidrogrezisztencia kialakításához. Erősen expresszálódik őssejtekben, majd szintje differenciálódás során lecsökken, pontos funkciója azonban ismeretlen. Célunk olyan kísérleti rendszer kialakítása, amely alkalmas az ABCG2-fehérje-kifejeződés szelektív gátlását követő funkcióvizsgálatok elvégzésére és lehetőséget kínál a génterápiás vonatkozások vizsgálatára. A kísérletek első szakaszában több, az ABCG2 génre specifikus shRNS-szekvenciát tervezünk, melyek génkifejeződését gátló hatását transziens transzekciós rendszerben teszteltük. Olyan vektort alkalmaztunk, amely a vizsgálandó szekvencián kívül a zölden fluoreszkáló GFP-t is kódolja, ezáltal ellenőrizni tudtuk a transzekció hatékonyságát. Az ABCG2 fehérje expressziójának alakulását (várható csökkenését) fehérje- valamint RNS-szinten is detektáltuk. Sejt felszíni epitópot felismerő antitest (5D3) segítségével áramlási citometriás (FACS) méréseket végeztünk, az így nyert eredmények megerősítésére az ABCG2 drogapumpáló funkcióját is megvizsgáltuk (*mitoxantron uptake*). A mRNS-szint meghatározására irányuló kvantitatív RT PCR méréseink eredményeit GAPDH belső standardre és a transzfektált sejtekben expresszálódó GFP-re normalizáltuk. A transziens rendszerben nyert eredmények alapján a két leghatékonyabbnak bizonyuló szekvencia 40-60%-os gátlást okozott a *nonsense*-kontrollszekvenciához viszonyítva, ezeket használjuk a gén kifejeződésének tartós gátlására alkalmas, stabil lentivírusrendszer kidolgozására.

P-19 Észteráz enzimek klónozása és alkalmazása gyógyszerintermedierek biokatalitikus előállítására

Felföldi E.¹, Tamás L.²

¹ MolCat Bt., Budapest; ² ELTE, TTK, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, Budapest

Az észterázok széles szubsztrátspecifitásuknak köszönhetően alkalmasak különböző kémiai anyagok sztereospecifikus előállítására is, s

különböző szintézisekben és rezolválási kísérletekben sikerrel alkalmazták a sertésmájából kinyerhető észteráz fehérjépreparátumot, mely több enzim keveréke. Az állati forrásból származó enzimek azonban nem alkalmazhatók gyógyszeranyagok előállítására. A sertésmájából izolált észterázpreparátumból gélkromatográfiai és elektroforézis módszerekkel két különböző enzimet különítettünk el és szekvenáltuk aminosav-szinten. Az így meghatározott szekvenciájú enzimek génjét sertésmájából készített cDNS-könyvtárból izoláltuk PCR módszerrel, majd klónoztuk. A nukleotidszekvencia meghatározását követően megfelelő fehérje-expressziós vektorokba klónoztuk és *Escherichia coli*, valamint *Pichia pastoris* gazdaszervezetekben termeltettük a fehérjét. A bakteriális rendszerben expresszált fehérjét inaktív, zárványtestes (*inclusion body*) formában kaptuk meg, melyet ezidáig nem tudtunk aktív formában renaturálni. *Pichia pastoris* élesztőt használva a termelt idegen fehérje enzimaktivitása mérhető, de igen alacsony kihozattal tudtuk csak előállítani. 14-napos fermentációt követően sem emelkedik az enzim mennyisége 17 µ/liter koncentráció fölé. Az előállított enzimek alkalmasak különböző nem természetes aminosavak specifikus rezolválására is ugyanúgy, mint a májból preparált észterázkészítmény, valamint szubsztrátspecifitásuk is eltérő, de fontos, hogy növeljük a fehérjeexpresszió hatékonyságát.

P-20 Az *Agrobacterium tumefaciens* PemIK toxin-antitoxin-rendszerének jellemzése

Ferenczi Sz., Papp P.

MBK, Genetikai Intézet, Gödöllő

Az utóbbi években jelentős figyelem fordult a prokariótákban található toxin-antitoxin- (TA) rendszerek felé. A két fehérjéből álló „addíciós modulok” esetében, a toxinalgység RNáz-aktivitása révén egy- vagy két-szálú RNS-ek, többnyire specifikus hasításáért felelős. A hasítás eredménye lehet a programozott sejthalál aktiválása (MazF, PemK fehérjék *E. coli* esetében), illetve valamilyen anyagcsere-útvonal (NtrR a *Rhizobium meliloti*-nál) vagy replikáció szabályozása (ParD az *E. coli* P1 plazmidjánál). Az antitoxin a toxinnal kapcsolódva egyrészt blokkolja annak enzimaktivitását, másrészt a TA-komplexben DNS-kötő képessége révén autoregulálja a két fehérje szintézisét. A TA-rendszerek kiváló lehetőséget nyújtanak új hatásmechanizmusú antibiotikumok, baktericid növényvédő szerek kifejlesztésére. A növénypatogén *Agrobacterium tumefaciens* genomja két feltételezett TA-rendszert tartalmaz. Az egyik, az *E. coli* *pemK* – a programozott sejthalált aktiváló gének – ortológja, s a jövőbeni antibakteriális szerek potenciális célpontjaként szolgálhat. Kimutattuk, hogy az *A. tumefaciens* *pemIK* génjei által kódolt fehérjék egy működő TA-rendszert alkotnak. A *pemK* gén expressziója letális, amelyet a *pemI* gén koexpressziója megszüntet. A két gén egy átírási egységet képez, primer extenzióval megállapítottuk, hogy a transzkripció startpont 18 nukleotiddal előzi meg a PEM transzlációs startpontját. Csak a TA-komplex rendelkezik szabályozó (*in vivo*), illetve specifikus DNS-kötő (*in vitro*) képességgel. A kötőhelyként szolgáló operátor szekvenciáját DNáz I- és hidroxilgyök-interferenciafootprintek segítségével azonosítottuk. Jelenleg a toxin target mRNS-ének azonosításán dolgozunk, hogy az RNS-bontó képességét jellemezzük, a PemIK TA-rendszer funkcióját meghatározzuk.

P-21 Katalitikus oldalláncok (R38 és K215) szerepe a humán 3-foszfoglicerát kináz (PGK) doménzáródásában

Flachner B.¹, P. Konarev², Varga A.¹, Szabó J.¹, Hajdú I.¹, Závodszy P.¹, D. Svergun², Kazinczyné Vas M.¹

¹ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ² EMBL, Hamburg Outstation, Germany

A PGK doménzáródásához mindkét szubsztrát kötődése szükséges, de a két domén között lévő csukló régió szerkezete alapján a konformációváltás mechanizmusát még nem értjük. Ismert, hogy az Arg 38 katalitikus oldallánc 2-3 Å és a feltehetően szintén katalitikus szerepű Lys 215 kb. 10 Å távolságnnyit mozdul el a doménzáródás során. Az oldalláncok katalitikus és a doménzáródásban betöltött szerepének vizsgálatára pontmutánsokat állítottunk elő (R38A, K215A), melyeket enzimkinetikai kísérletekkel és kisszögű röntgenszórással (SAXS) jellemeztünk. A két mutáns nagymértékű aktivitáscsökkenése az Arg 38 mellett a Lys 215 katalitikus szerepére is utal. A K_m értékek jelentősen megnöttek a mutációk hatására, ami valószínűsíti, hogy ez a két oldallánc stabilizálja a reakcióban átmenő foszfátot. Ezt támasztja alá a kristályszerkezetbe modellezett foszfocsoport elhelyezkedése. A szubsztrátok kötődésének gyengülése arra utal, hogy ezek az oldalláncok, már a biner komplexek kapcsolata lépnek a szubsztráttal, és azokkal együtt elmozdulva biztosítják az átmenő foszfát optimális helyzetét a katalízis során. SAXS analízissel a vad típusú PGK esetén a 3-foszfoglicerát kötődésének

hatására részleges, míg mindkét szubsztrát kötődése során teljes doménzáródást mutattunk ki. A K215A mutáns a vad típusú enzimmel azonos módon viselkedett, míg az R38A mutáns esetében nem tapasztaltunk doménzáródást. Az Arg 38 fontos szerepét a csuklóregió működésében, azaz a doménzáródásban molekuláris grafikai analízissel szemlélítettük.

P-22 Exo- β -1,3-glukanáz fehérje expressziója heterológ rendszerben

Fodor G.¹, E. Medvedeva¹, Ivanics M.², Takács K.³, Jenes B.², Tamás L.¹
¹ ELTE, TTK, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, Budapest; ² MBK, Gödöllő; ³ KÉKI, Budapest

A gén (*cmg*), melyet bakteriális fehérjeexpresszióra választottunk ki, a gombaparazita *Coniothyrium minutans* nevű gombából származik. Ezt a gombát sikeresen használták mind szabadföldi, mind üvegházi kultúrákban, például a *Sclerotinia sclerotiorum* gomba által okozott betegség ellen. A glukanáz fehérje sejtfalbontó enzimaktivitása révén védelmet nyújthat különböző gombák ellen, így génje felhasználható gombafertőzéssel szemben ellenállóbb transzgenikus növények előállítására irányuló programokban. A géntermék kimutatására szolgáló *Western blot* módszerhez szükség van specifikus antitestre, melyhez a fehérjét vagy a parazita gombából nyerhetjük ki, vagy heterológ rendszerben termeltethetjük. Munkánk során a glukanáz enzim génjét PCR módszerrel felszaporítottuk úgy, hogy a pET-expressziós vektorba való klónozáshoz megfelelő hasító helyekkel láttuk el mindkét végét. A His-taggal ellátott glukanáz fehérjét több gazdaszövetben expresszáltattuk. Legmegfelelőbbnek a BL21(DE3) *S*-sejt bizonyult, bár a fehérje nem maradt oldatban. OrigamiB- (DE3) sejtek esetében a fehérje oldatban maradt, de az előállított fehérje mennyisége nagyon alacsony volt. Ez bizonyára összefüggésben van az enzim fehérjebontó aktivitásával is. Tanulmányoztuk a baktériumban expresszált glukanáz enzim aktivitását p-nitro-fenil- β -D-glükopiranozid szubsztrát mellett. Az enzim ugyan mutatott hidrolázaktivitást, de nagyon alacsony szinten. Valószínűleg hiányzik néhány másodlagos módosítás, mely a baktériumban nem áll rendelkezésre. A termelt fehérje megfelelő antigénnek bizonyult antitest előállításához.

P-23 Are Cav channel subunits components of the store operated calcium channel of T lymphocytes?

A. Gamberucci, A. Colucci, R. Giunti, S. Senesi, A. Benedetti
 Dept. of Pathophysiology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy

The effect of nifedipine – an antagonist of L-type Ca^{2+} channels – on capacitative calcium entry (CCE) was studied in Jurkat T lymphocytes. CCE was induced by a variety of treatments depleting intracellular calcium stores, through different and unrelated mechanisms. Cells were treated with thapsigargin, ionomycin, anti-CD3 antibodies, and phytohaemagglutinin, or pre-incubated in a calcium free medium. Activity of CCE was evaluated with a calcium free/calcium readmission protocol, in Fluo-3 pre-loaded cells. Nifedipine (100 μ M) inhibited CCE in a time dependent manner, with a maximal inhibition at 4-5 mins of treatment. CCE inhibition was not due to unspecific effects on K^{+} channels. Nifedipine, in fact, did not cause any membrane depolarization, as revealed by measuring the plasma membrane potential with the fluorescent probe bis-oxonol. Moreover, experiments run under depolarizing conditions (i.e. by substituting for by Na^{+} with K^{+} ions in the medium) revealed that nifedipine could inhibit capacitative calcium entry independently of plasma membrane depolarization. We also demonstrated/confirmed the presence, in Jurkat T lymphocytes, of transcripts for $Ca_v1.2$ (α_{1C}), $Ca_v1.3$ (α_{1D}) and $Ca_v1.4$ (α_{1F}) L-type Ca^{2+} channels. We tentatively conclude that one or more subunits of L-type Ca^{2+} channels might participate in CCE, possibly as components of the store operated Ca^{2+} channels of Jurkat T lymphocytes.

P-24 Puroindolin polipeptidek bakteriális expressziója és funkcionális fehérjekinyerése

Bakó A., Fodor G., Gárdonyi M.

ELTE, TTK, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, Budapest

A minőség és a végfelhasználás szempontjából a szemkeménység a búza egyik legfontosabb tulajdonsága. A búzaszem keménységét a puroindolin a és b fehérjék határozzák meg. Ha mindkettő vad típusú, az adott búzafajta puhaszemű. Bármely puroindolin mutációja esetén a fenotípus kemény, mindkét puroindolin hiánya esetén (durum búza) különlegesen kemény. A biokémiai háttér nem tisztázott. A puha szemszerkezet kialakulásának jobb megértését tenné lehetővé a puroindolinok szerkezet-funkció-összefüggéseinek feltárása. A két fehérje elválasztása (nagy-mérvű hasonlóságuk miatt) búzaliszttól rendkívül idő- és munkaigényes.

Bakteriális rendszerben külön-külön termeltethetők, és mutáns változatok is gyorsan előállíthatók. A bakteriális citoplazmában azonban az eukarióta fehérjék feltekeredése nem tökéletes, oldásuk nehéz. Munkánk során többféle módszerrel kíséreltük meg funkcionális polipeptidek előállítását. Teljesfehérje-kivonatot nyertünk ki szonikálással, 8 M karbamid- és 6 M guanidin-hidroklorid-oldatokkal. Csak karbamiddal tudtunk számottevő mennyiségű fehérjét szolubilizálni. Az elvégzett *Western blot* analízis és funkcionális vizsgálat (kötés búza keményítőszemcsékhez) pozitív eredményt adott. Az oldat azonban nem volt stabil, a heterológ komponens igen hamar kicsapódott. Ezért zárványtesteket tisztítottunk a bakteriális kultúrákból. A preparátumok nagy tisztaságban tartalmaztak rekombináns puroindolint. A továbbiakban nátrium-acetát-pufferben kíséreltük meg oldani a fehérjéket. Csupán kis mennyiségű puroindolin oldódott, megerősítve, hogy a heterológ polipeptid feltekeredése hibás. Ezért, különböző pufferek és 50 mM β -merkaptó-etanol jelenlétében, 50%-os izopropanollal, 2 M guanidin-hidrokloriddal, illetve 50% izopropanol + 2 M guanídiummal tarttuk fel a zárványtesteket. Ezek az oldószerek rendre egyre nagyobb mennyiségben oldották a puroindolinokat.

P-25 A *glu-1bx* gén transzkripciója túltermelő és normáltermelő búzafajtákban az érés során

Gárdonyi M.¹, Szűcs P.², Bányai J.², Bedő Z.², Tamás L.¹

¹ ELTE, TTK, Növényélettani Tanszék, Budapest; ² MTA MGKI, Martonvásár

A búzaliszt sütőipari minősége szempontjából meghatározó a siker HMW-gluteninfehérje-alegység összetétele. A HMW gluteninalegységek közül a *Glu-1Bx* termelődik a legnagyobb mennyiségben. A *Glu-1Bx* alegységfehérje mennyiségében ugyanakkor jelentős eltérések vannak a különböző búzafajták között. A Bx alegységet nagy mennyiségben termelő (túltermelő) búzafajtákban a *Glu-1Bx* gén promótere tartalmaz egy 43 bp hosszú inszerciót. Ennek az inszerciónak a *Glu-1Bx* gén transzkripciójára gyakorolt hatása ugyanakkor nem ismert. Célunk a *Glu-1Bx* transzkripciójának vizsgálata túltermelő és normáltermelő búzafajtákban az endospermium fejlődése során. A *Glu-1Bx* mRNAs mennyiségét RT PCR segítségével mértük a virágzást követő 6. naptól a 30. napig, tíz különböző időpontban a Bx HMW fehérjét normál- (*Chinese Spring*), illetve túltermelő (*Glenlea*) fajtákban. Viszonyítási alapként a β -tubulin mRNAs mennyiségét használtuk, mely korábbi kísérletek szerint állandó. Eredményeink azt mutatják, hogy a két búzafajtában jelentős különbség van a *Glu-1Bx* gén átíródásában. A *Chinese Spring* esetében a *Glu-1Bx* mRNAs szintje már kb. 10 nappal a virágzás után elérte a maximumot, majd lassan csökkenni kezdett. Ezzel szemben a *Glenlea* endospermiumában a *Glu-1Bx* mRNAs szintje a virágzást követő 20. napig erősen emelkedett, majd a 25. nap után kezdett stagnálni. Az eltérő időbeli lefutáson túl a transzkripció erősségében is lényeges eltérés volt, a virágzás utáni 30. napon kb. két nagyságrenddel magasabb *Glu-1Bx* mRNAs-szintet mértünk a *Glenlea* búzában, mint a *Chinese Spring* fajtában. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy eldönthessük, vajon a transzkripció profilok eltéréseit a *Glenlea* fajta *Glu-1Bx* promóterében található inszerció okozza-e.

P-26 Evidence for Ca^{2+} leak channels in the endoplasmic reticulum membrane

R. Giunti, A. Gamberucci, R. Fulceri, Bánhegyi G., A. Benedetti
 Dept. of Pathophysiology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy

In the resting status the calcium ion (Ca^{2+}) content of the endoplasmic reticulum (ER) is important in both allowing cells to respond to extra cellular stimuli and to regulate certain activities located within the ER itself. The resting ER Ca^{2+} levels are assumed to reflect a balance between the active uptake SERCA pumps and passive efflux via "leak channels". The molecular nature of the leak mechanism is still largely undefined. In particular, no clear-cut, direct evidence for the existence of specific/independent Ca^{2+} channels have been provided yet. Pathways other than "leak channels", such as the SERCA pore itself, the Bcl2 oncogene or the proteinaceous translocon pore, have been involved in this phenomenon. Experimentally, ER Ca^{2+} leakage is revealed when SERCA pumps are inhibited (by drugs such as thapsigargin). Here, we have mechanistically studied the Ca^{2+} leak pathways in rat liver microsomal vesicles, passively pre-equilibrated with radiolabelled Ca^{2+} , and subsequently diluted in Ca^{2+} free media. The unspecific permeability of liver microsomes has been evaluated in parallel samples pre-loaded with radiolabelled sucrose and diluted as above. We show here that two major passive Ca^{2+} efflux pathways exist. One is unspecific, in that allows also the passage of uncharged compounds, such as sucrose. The other one is apparently specific, in that it allows the efflux of Ca^{2+} , requires counter ion influx, and is blocked by

inhibitors of cationic channels, such as Gd^{3+} . Additional experimental evidence: (i) ruled out the involvement of "leaky" $InsP_3/RyR$ channels, of the SERCA pore, and of the Bcl2 protein, and (ii) suggested that the sucrose efflux is mediated by the translocon pore. We conclude that, beside pore/channels unspecifically mediating ER Ca^{2+} efflux, "leak Ca^{2+} channels" are likely to be represented in the ER membrane. Their molecular nature, however, remains to be determined.

P-27 A humán tripszin 4-acilációjakor szerkezeti átrendeződés története

Gombos L., Tóth J., Simon Z., Medveczky P., Szilágyi L., Gráf L., Málnási-Csizmadia A.

ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

A humán tripszin 4 a szerin proteázok között egyedülálló módon arginin tartalmaz a 193-as pozícióban a konzervált glicin helyett. Bár ez az aminosavcsere nem befolyásolja a kisméretű szintetikus szubsztátokon mért egyensúlyi aktivitást, nagy hatással van több enzimikus funkcióra: rezisztenssé teszi kanonikus inhibitorokkal történő gátlással szemben, és beszűkíti a szubsztát-specifitását fehérjeszubsztátokon. Ezen aminosavcsere gyorskinetikai és termodinamikai hatásait a vad típusú és az R193G mutáns enzimeken tanulmányoztuk. A kísérletekhez választott 4-metilumbelliferil-4-guanidinobenzoát szubsztátanalógon a dezacilezés a sebességmeghatározó lépés, így tranziens kinetikai módszerekkel egyszerűen követhető a reakció, és el lehet különíteni egyedi reakciólépéseket, illetve meghatározni sebességi állandókat. Adataink alapján a korábbi reakciómechanizmust további lépéssel bővítettük: az acilációt megelőzi az első tetraédes intermedier reverzibilis kialakulása. A vad típusú enzim esetében ez a lépés erősen exoterm és nagymértékű entrópiacsökkenés kíséri, ezzel szemben az R193G mutánsnál enyhén endoterm, amit kismértékű entrópiánövekedés kompenzál. Ez az energetikai különbség arra utal, hogy a vad típusú humán tripszin 4 enzimben az R193G mutánshoz viszonyítva jóval kiterjedtebb szerkezeti, illetve dinamikai átrendeződések zajlanak az első tetraédes intermedier kialakulása során, ami szerepet játszhat ezen enzim biológiai funkciójában.

P-28 A NO-cGMP-PKG-függő jelátviteli út vizsgálata primer hypoxiás szívizomsejt-tenyészetekben

Görbe A., Giricz Z., Baka Zs., Dux L.

SZTE, ÁOK, Biokémiai Intézet, Kardiovaszkuláris Kutatócsoport, Szeged

Az iszkémiás szívbetegségek terápiájában már régóta alkalmazzák a nitrogén-monoxid-donor gyógyszereket. Az NO olyan citoprotektív molekula, mely hatását a cGMP-függő PKG jelátviteli úton fejt ki. Az NO hatásának kifejtése során a szolubilis guanilat cikláz hemcsoportjához kötődik, és aktiválja az enzimet. Kísérleteink alapját az szolgálta, hogy az IC cGMP-koncentráció növekedése protektív hatású az iszkémiás reperfüziós károsodásban. Azonban a *downstream* szignáltranszdukciós út és annak effektorai még nem ismertek. Célunk a cGMP-függő PKG jelátviteli út felderítése volt a citoprotekcióban. Munkánkat primer szívizomsejt-tenyészetben végeztük. Az első csoport kontrollként szolgált, míg a másodikat cGMP-analóg 8Br-cGMP-vel kezeltük. A 3. csoportban szintén cGMP-analóg 8Br-cGMP-t kaptak a sejtek, de emellett még protein kináz G inhibitor KT5823 vegyületet is. A 4. csoportban csak KT5823-mal kezeltük sejtjeiket. Az 5-ös számú tenyészetet NO-donor SNAP-pal inkubáltuk, illetve az utolsó csoportban SNAP mellett KT5823-t is kaptak a sejtek. A csoportokat egyrészt iszkémiás károsodásnak tettük ki, míg egy másik sorozatot normoxiás környezetben tartottunk, majd a sejteken viabilitás tesztet végeztünk. A kontrollcsoportokban 10-15%-os sejtpusztulás történt. A szimulált iszkémiás kezelés a sejtek 34%-ának pusztulását okozta, amelyet azonban a cGMP-analóg 8Br-cGMP szignifikánsan kivédett (13% $p < 0,001$). Azonban a 8Br-cGMP védő hatását a PKG-inhibitor KT5823 gátolta (34%). Hasonlóan a NO-donor SNAP is protektívnek bizonyult a sejtek számára, és a KT5823 vegyület ezt a védőhatást is megakadályozta. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a citoprotekció valószínűleg a cGMP-PKG útvonalon valósul meg. (RET 08/2004, OMF06/2005)

P-29 Az izopropil-malát dehidrogenázok (IPMDH) hőstabilitásbeli különbségeit denaturációjuk sebessége határozza meg

Gráczer É.¹, Varga A.¹, Hajdú I.¹, G. Semisotnov², Závodszy P.¹, Vas M.¹

¹ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ² OTA Protein Research Institute, Pushchino, Russia

A fehérjék stabilitását meghatározó tényezők szerepe a térszerkezet-kialakulás folyamatában még nem tisztázott. Denaturációs és renaturációs kinetikai vizsgálatokat végeztünk termofil, mezofil és hidegtűrő

IPMDH enzimekkel fluorimetriás módszerek (fehérje-fluoreszcencia, ANS-jelölés, FRET), tiolreaktivitás- és enzimaktivitás-mérés segítségével. A FRET a natív enzim Trp oldallánca(i) és a kötött NADH között alakul ki. A három enzim denaturációs kinetikája 8,5 M karbamidban nagymértékben különbözik: a felezési idők rendre 90 perc, 5 perc és 5 másodperc, azaz minél nagyobb hőstabilitású az IPMDH, annál lassabban denaturálódik. A szubsztátok nagy mértékben védenek a denaturációval szemben: a védő hatás a termofil enzim esetén a legkisebb, hidegtűrő enzim esetén a legnagyobb, így a szubsztát-komplekx denaturációja már hasonló időskálán zajlik. A denaturáció folyamatával ellentétben a renaturáció időgömbéi nem mutatnak lényeges különbséget a különböző hőstabilitású IPMDH-k esetén: a fehérje kompakt szerkezete (ANS-jelölés) és ezzel párhuzamosan az aktivitás néhány perces felezési idővel tér vissza. A natív fehérjére jellemző fluoreszcencia és FRET kialakulásának időgömbéi összetett folyamatokra utalnak. A kezdeti, néhány másodperces gyors szakasz alatt már natívszerű, de még inaktív intermedier alakul ki. Ezzel függhet össze az, hogy a szubsztátoknak nincs kimutatható hatása a renaturáció sebességére. Az IPMDH-k stabilitásbeli különbségei kizárólag denaturációjuk különböző sebességének tulajdonítható. Renaturációjuk azonos sebességét pedig az IPMDH funkcióhoz szükséges speciális térszerkezet határozza meg.

P-30 Humán lipid kinázok expressziója intracelluláris Ca^{2+} -felszabadulást vált ki élesztősejtben

Grósz G.¹, Liliom K.², Baksa A.², Szirák K.¹, Takács L.³, Fehér Zs.¹

¹ DE, OEC, Humán genetikai Intézet, Debrecen; ² MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ³ Biosystems International, Paris, France

A szfingozin-1-foszfát (S1P), amely a szfingozin kináz terméke, az emlősejtek különféle jelátviteli folyamataiban részt vevő másodlagos hírvívó molekula. Többek között a hízósejtek degranulációját stimulálja s ezzel elősegíti az allergiás tünetek kialakulását. A huSPHK1-et és 2-t korábban már klónozták és jellemezték. Az SPHK1-gyel való homológia alapján további két izoforma géneinek tartott huSPHK3 és 4 cDNS-ét is klónozták. Munkánk célja az volt, hogy élesztőexpressziós rendszerben fejtszük ki a huSPHK3 és 4 fehérjét, és vizsgáljuk enzimaktivitásokat, melyikük funkcióképes szfingozin kináz. A négy különböző cDNS-t pYES2/CT expressziós vektorba klónoztuk indukálható GAL promóter mögé, és létrehoztuk velük az élesztőtranszformánsokat. Genetikai keresztezéssel a génextpressziós kísérletekhez jól használható, élesztő-szfingozinkinázt nem tartalmazó $\Delta cb4\Delta cb5$ és $\Delta cb4\Delta dpl1$ kettős mutánsokat készítettünk, amelyeket PCR segítségével azonosítottunk. $\Delta cb4\Delta dpl1$ törzsből készült szferoplasztot használtunk humán szfingozin kináz által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás Fluo-4 Ca^{2+} -indikátorral történő detektálásához. Az SPHK1 egy korai magas csúcsot, míg az SPHK2 egy kisebb csúcsot adott, SPHK3 és 4 esetében késői csúcsot kaptunk. Az SPHK3 ceramid kináznak (CERK1), az SPHK4 pedig egy szélesebb szubsztát-specifititású lipid kináznak (MuLK) bizonyult. Tisztázni szeretnénk, hogy utóbbi esetekben mi a Ca^{2+} -felszabadulás mechanizmusa.

P-31 Az aktomiozinrendszer tapadási sűrűlődséért a loop 4 felelős

Gyimesi M.¹, Kintses B.¹, Kellermayer S. Z. M.², Málnási-Csizmadia A.¹

¹ ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék; ² PTE, ÁOK, Biofizikai Tanszék, Pécs

A miozin enzimikus ciklusában fontos szerepet tölt be az aktinnal való kölcsönhatása, amely stimulálja a miozin aktivitását. Mindkét fehérjén kiterjedt kölcsönhatási felület található, amelyek közül számos felszíni hurokról bebizonyították, hogy fontos szerepet játszanak az aktomiozin kölcsönhatásban. Mindmáig nem tisztázott azonban egyértelműen, hogy a miozinon elhelyezkedő loop 4 szerepet játszik-e az aktinkötésben, illetve az aktomiozin-komplex stabilitásában. A kérdés eldöntésére mutációkat terveztünk egy egy-triptofánt tartalmazó (W501+) *Dictyostelium* motordomén-konstrukcióba: a kölcsönhatásban feltételezhetően nagy szerepet játszó glutaminsavat glutaminra (E365Q) cseréltük, illetve a teljes hurok-szekvenciát 3 glicinnel helyettesítettük (ΔAL). Széleskörű fluoreszcens és gyorskinetikai vizsgálatot alkalmaztunk felhasználva a fehérjék belső fluoreszcenciáját, a pirénjelölt aktinfluoreszcenciát, továbbá a fényszórásváltozásból származó jelváltozást. Kísérleteink bizonyították, hogy mindkét mutáció gyengíti az aktomiozin-kölcsönhatást, amelyet a megnövekedett disszociációs állandó (K_D) értékek mutatnak mind apo, mind ADP kötött állapotban, mely hatást elsősorban a leválási sebességi állandók (k_{off}) növelésén keresztül fejtik ki. A mutációk jelentősen emelik az ATP indukálta aktomiozindisszociáció sebességét. Továbbá az aktinindukált ATPáz-aktivitás K_M értékét egy nagyságrenddel növelik. A ΔAL mutáns

aktin csúsztatási sebessége 2,2-szeresére emelkedett az *in vitro* motilitáseszenben. További fontos megfigyelés, hogy a mutások jelentősen csökkentett hajlamot mutattak az aktinfilamentumok törésére. Bebizonyítottuk tehát, hogy a *loop 4* funkcionális aktinkötő régió, amely az aktomiozinkomplex stabilitásáért felelős, továbbá elsődleges meghatározója az aktomiozin tapadási sírlődésének.

P-32 A PPARg-receptor szerepének vizsgálata monocita-makrofág-differenciálódásban

Gyöngyösi A., Szántó A., Nagy L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A sejtmagban előforduló receptorok ligandum által aktivált transzkripciós faktorok. Aktiválódásuk után képesek szabályozni célgenjeik kifejeződését, így szerepet játszanak a sejtek differenciálódásában, proliferációjában és metabolizmusában. A PPARg-receptorokról korábban igazolták, hogy szerepük van a mieloideredetű makrofágok érésében. Munkacsoportunk igazolta, hogy a PPARg-receptor expressziója a monocita-makrofág-éréskor gyors indukciót mutat az alternatív aktivációs út során, míg a receptor kifejeződési szintje lecsökken a klasszikus aktivációt követően. Munkánk során célunk, hogy feltárjuk azt a közvetlen környezeti tényezőt, ami a PPARg-receptor expresszióját szabályozza. Ebben a folyamatban szerepet játszhat, hogy a monociták az érpálya elhagyása során kapcsolatba kerülnek extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéivel. Ezt a folyamatot modelleztük *in vitro* körülmények között, amely során a humán vérből izolált monocitákat különböző ECM-fehérjékkel kezelt tenyésztőedényekben növesztettük. A tenyésztés során a sejtek kitapadnak az edény falához és az ECM-fehérjékhez a monociták felszínén előforduló integrinmolekulákon keresztül, ami jelet indít a sejtmag felé, ez pedig felelős lehet a PPARg gén megnövekedett expressziójáért. Az esetleges további környezeti faktorok befolyásoló hatásának a receptor kifejeződésére szérumentes tenyésztési környezetben növesztjük az izolált monocitákat. A letapadás közvetlen hatását teflon-, illetve *Costar ultra low attachment* felszínnel ellátott tenyésztőedényekben vizsgáljuk. A PPARg letapadástól függő expressziós változásait az eltérő tenyésztési körülmények függvényében RT kvantitatív PCR módszerrel határozzuk meg. Feladatunk megtalálni és igazolni, melyik típusú ECM-fehérje és integrin az, ami indukálja ezt a jelátviteli utat. A szignálutban részvevő egyes molekulák feltérképezéséhez specifikus antitesteket használunk. Mivel a monocita-makrofág-átalakulás kezdeti lépése a gyulladási folyamatok és az atherosclerosis kialakulásának, ezért lényeges megismerünk a differenciálódási folyamatot a betegségek megismerése és gyógyítása érdekében.

P-33 A protein kináz C (PKC) moduláló szerepe az N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) által kiváltott, poli-(ADP-ribóz) polimeráz- (PARP) függő citotoxicitásban

Hegedűs Cs.¹, Gergely Sz.², Bai P.¹, Erdélyi K.¹, Bakondi E.¹, Gregus A.⁴, Szabó É.³, Virág L.¹

DE, OEC, ¹ Orvosi Vegytani Intézet; ² Kardiológiai Klinika; ³ Bőrgyógyászati Klinika; ⁴ Immunológiai Intézet

Az MNNG DNS-alkiláló hatású citosztatikum, hatására egérimocitákban aktiválódik a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1). Ez az enzim főleg DNS-sérülés hatására aktiválódik, de leírtak alternatív (foszforiláció révén bekövetkező) aktivációt is. A PARP-1 túlzott aktivációja kimerítheti a sejt energiatakarékait, ezzel annak pusztulását eredményezheti. Irodalmi adatok alapján a PARP-1 *in vitro* szubsztrátja a protein kináz C (PKC) enzimmel. A PARP-1 PKC általi foszforilációja az enzim gátlásához vezet. Jelen munkánk célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk a PKC és a PARP-1 szerepét az MNNG által kiváltott citotoxicitásban. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a PARP-gátló PJ-34 és a PKC-t aktiváló forbolészter (PMA) gátolta a propidium-jodid felvételt. A forbolészterek citoprotektív hatása PKC-gátlószerekkel (GF109203X, G6976) kivédhető volt. MNNG kezelés hatására a sejtek DNS-károsodást szenvedtek, amit sem a PARP-gátló PJ 34, sem pedig a PKC-t aktiváló PMA nem befolyásolt. A DNS-törések hatására PARP-aktivációt mutattunk ki. A polimer mennyisége a forbolészter-előkezelés hatására csökkent, s e hatás PKC-gátlószerekkel mérsékelhető volt. Immunprecipitálva a PARP-1-et, majd foszfoszerin elleni antitesttel *Western blot* eljárással azt találtuk, hogy a PMA hatására foszforilálódik a PARP-1. PKC-gátlószerek hatására a PARP foszforilációjának mértéke csökken. Ennek alapján elmondható, hogy az MNNG által kiváltott DNS-törés PARP-aktivációhoz és PARP-függő sejthalálhoz vezet. A PKC a PARP-1 foszforilációjával gátolja annak aktivitását és ennek révén citoprotektív hatású. (OTKA K60780)

P-34 Miozin Va: egy 3 aminosavat kódoló alternatív exon és egy dinein-könnyűlánc

Hódi Zs.¹, Németh A.¹, Kardos J.¹, Radnai L.¹, Hetényi Cs.¹, Schlett K.²,

Bodor A.³, Perczel A.³, Nyitray L.¹

ELTE, TTK, ¹ Biokémiai Tanszék, ² Élettani és Neurobiológiai Tanszék, ³ Szerves Kémiai Tanszék, Budapest

A 10 kDa-os dinein-könnyűláncról (DLC), az eukarióták egyik legkonzervatívabb fehérjéjéről már korábban bizonyították, hogy a miozin Va-nak (mioV) is alegysége, és szerepet játszhat a kargókötésben és/vagy a motorfehérje regulációjában. Érdekes információ, hogy a DLC szintje sok rákos sejtbem megemelkedik. Gélzűréssel, natív PAGE és *pull-down assay* eljárással, kalorimetriával és spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk különböző méretű mioVa-fragmentumok és a DLC kötődését. Azonosítottuk a pontos DLC kötőhelyet, jellemeztük a komplexet és a kötés hatására fellépő szerkezetváltozásokat. A mioV farokrégiójának mediális és disztális *coiled-coil* doménja között található DLC kötőhely (Ile1280-Ile1294) tartalmazza a mindössze 3 aminosav hosszú, alternatíván kifejeződő (agyspecifikus) B-exont, aminek hiánya esetén a kötés nem jön létre. Ezt először transzfekcióval *in vivo* is bizonyítottuk. ITC mérések alapján a kötés erőssége (K_D) 47 nM. CD mérések bizonyítják, hogy a két *coiled-coil* régió közti szerkezet nélküli domén a kötés hatására kissé rendeződik, viszont a határoló *coiled-coil* domének hőstabilitása jelentősen növekszik, a DLC mint „molekuláris ragasztó” hat a dimer mioV farokrégióra. NMR és molekuláris dokkolás igazolja, hogy a 15-tagú mioVa peptid a többi ismert partneréhez hasonlóan kötődik a DLC-hez. Feltételezésünk szerint a homodimer DLC aszimmetrikusan kötődik a dimer miozinhoz; az egyik kötőárkat a mioV-szekvencia, a másikat pedig a kargómolekula foglalja el. A kargók szállítását a DLC foszforilációja szabályozhatja: a Ser88Glu mutáns nem kötődik a miozin Va konstrukcióhoz, bár a fehérje stabil marad.

P-35 Apoptotikus sejtek fagocitózisának dinamikája és szabályozása humán rendszerben

Katona K., Májai Gy., R. Ruehl, Zahuczky G., Fésüs L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Molekuláris Medicina Kutató Központ, Debrecen

A fagocitózis fontos szerepet játszik az apoptotikus sejtek szervezetből történő eltávolításában. Számos kutatási eredmény született ezen a területen, de ennek a folyamatnak a dinamikája és molekuláris szintű szabályozása pontosan nem ismert. Kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a humán monocitából differenciáltatott makrofágok fagocitáló képessége időfüggő módon növekszik, de 6 óra után kialakul egy telítettségi állapot, mely nem változik, azaz fagocitáló képessége már nem növekszik, ha újabb apoptotikus neutrofileket adunk hozzá. Ezzel párhuzamosan a fagocitáló makrofágok esetében növekedett koleszteroltartalmat határoztunk meg. Abban az esetben, ha a makrofágok membránját, a kísérletet (fagocitózist) megelőzően koleszterollal feltöltöttük, a makrofágok fagocitózisa jelentősen lecsökkent. Az időfüggő génextpressziós vizsgálat során – mely tükrözi a telítési folyamatot – találtunk olyan jól ismert fagocitóziszreceptor-géneket (pl. *oxidized LDL receptor 1*) és az apoptotikus sejtek opszonizációjában szerepet játszó molekulákat (pl. thrombospondin), melyeknek mRNS-szintje megemelkedik a fagocitózis elején. A telítettségi állapotban viszont ezen gének mRNS-szintje lecsökken. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a bekebelezett apoptotikus neutrofilek valamely biokémiai komponense, különösképpen a koleszterol, fontos szerepet játszik a fagocitózis dinamikájának szabályozásában.

P-36 Egérelőtumor-vírus (MMTV) env-génszekvenciák jelenlétének vizsgálata humán emlőtumor-sejtvonalakban

Kecskés Sz., Miklóssy G., Bagossi P., Tózsér J.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az nőknem gyakori és igen heterológ betegség. A viszonylag ritkán előforduló familiáris emlőtumorok kivételével a betegség etiológiája nem ismert. Az utóbbi időben a humán emlőtumorok esetében felvetődött, hogy részben betaretrovírus-fertőzés következménye lehet. Egyes emlőtumorok retrovirális eredete már több mint 60 éve ismert, és az egérelőtumor-vírus (MMTV) felfedezéséhez vezetett. Később számos kutató felvetette egy hasonló emberi MMTV-szerű vírus (HMLV) szerepét az emberi emlőtumorok kialakulásában. Sokáig nem sikerült bizonyítékot találni a HMLV létezésére vonatkozóan, valamint feltételezték, hogy a kimutatott szekvenciák nem exogén HMLV-fertőzés következményei, hanem endogén retrovírus- (HERV) expresszióknak tulajdonítható. A HERV- és HMLV-szekvenciák nagy biztonsággal történő megkülönböztethetősége azonban megfelelő PCR primerek használatával lehet-

séges. Mindamellett mind a mai napig ellentmondásos az irodalom arra vonatkozóan, hogy ténylegesen van-e integrált HMLV-szekvencia humán emlőtumor-sejtekben. Vizsgálatainkat négy humán emlőtumor-sejtvonalból izolált genomális DNS-mintán végeztük. A polimeráz láncreakcióhoz 2 primerpárt használtunk, melyekkel egy 254 bp és egy 600 bp hosszúságú szakaszt kívántunk felszaporítani az MMTV env génből. Gradiens PCR alkalmazásával két sejtvonalban tudtuk a rövidebb szakaszt felszaporozó primerpárral a várt méretűvel megegyező méretű PCR-terméket kimutatni. Az így kapott szakaszokat klónoztuk és szekvenálással ellenőriztük, azonban ezek a szekvenciák endogén szekvenciáknak bizonyultak. Így kísérleteink alapján a vizsgált emlőtumorsejt genomja nem tartalmaz exogén MMTV-szekvenciát. (OTKA T43482, ETT 088/2003)

P-37 Anaerob körülmények között szerves halogénvegyületeket lebontó baktériumtörzsek komparatív genomanalízise

Keresztes G., H. Nonaka, M. Inui, H. Yukawa
Microbiology Research Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth, Kyoto, Japan

A halogéntartalmú szerves vegyületek jellemzően igen stabilak. Ezen molekulák a természetben, bár előfordulnak, viszonylag ritkák, emiatt a legtöbb organizmus képtelen őket lebontani. A modern vegy- és gyógyszeripar halogéntartalmú szerves vegyületek százait szintetizálja, amelyek a talajban már az emberre is veszélyes mértéket elérő szinten összegyűlnek. Bizonyos *Desulfobacterium*- és *Dehalococcoides*-törzsek képesek anaerob körülmények között halogéntartalmú szerves vegyületeket részlegesen vagy teljesen lebontani. A *Desulfobacterium hafniense* Y51 törzset Japánban izolálták annak perkloroetén-bontó aktivitása alapján. Az anaerob halogénmentesítés alig ismert folyamatának a felderítését megkönnyítendő szekvenáltuk törzs teljes genomját. A törzs egy cirkuláris, 5 727 534 bázispárból álló kromoszómán 4400-5000 feltételezett kódoló szekvenciát hordoz. A komparatív genomika eszköztárával megkíséreltük felderíteni a törzs által használt főbb metabolikus útvonalakat. Mivel a törzs genomszekvenálását követően a mindkét anaerob halogénmentesítő modellként használt génusból rendelkezésre állt egy-egy teljes genomszekvencia, megkíséreltük azonosítani a halogénmentesítésben szerepet játszó géneket. Mivel feltételeztük, hogy ezen gének nagy része horizontális géntranszfer útján lett a genom része, a rendszertanilag távol álló két genomból azonosítottuk olyan ortológokat és paralógokat, amelyek a két törzsben nagyobb fokú hasonlóságot mutatnak egymáshoz, mint a közeli rokon fajokban található ortológok és paralógok. Így olyan génlistát kaptunk, amelyek a halogénmentesítésben már ismert szerepet betöltő gének mellett, a folyamatban eddig még ismeretlen szerepet játszó géneket is tartalmazhat.

P-38 Enzimreakciók vizsgálata denaturációs hőmérséklet fölött

Kintses B.¹, Simon Z.¹, Gyimesi M.¹, Tóth J.¹, Jelinek B.¹, Niedetzky Cs.², Kovács M.¹, Málnási-Csizmadia A.¹
¹ ELTE, TTK, Biokémia Tanszék; ² Supertech Kft., Budapest

A fehérjék hőmérséklet-érzékenysége erősen korlátozza oldatban való vizsgálati lehetőségeiket magas vagy akár fiziológiás hőmérsékleten is. Ennek áthidalására megalkottuk a *heat-jump/stopped-flow* készüléket, amely lehetővé teszi, hogy gyors enzimreakciókat vizsgáljunk magas hőmérsékleten. Ez a műszer egy újratervezett *stopped-flow* készülék, amely képes a reaktánsok összekeverésére szubmilliszekundumos időtartományban, miközben a reakcióelegy hőmérséklete akár 60°C-kal is emelkedhet. Bemutatjuk a miozin motoromén ATPáz enzimműködésén keresztül, hogy a gyors hőmérsékletugrásnak köszönhetően az enzim hődenaturációjánál gyorsabb enzimreakciók vizsgálhatóak akár a denaturációs hőmérséklet fölött is, sőt maga a hődenaturáció folyamata is nyomon követhető. Szerkezetspecifikus fluoreszcens jelölésekkel a fehérje egyes részeinek hőstabilitása is vizsgálható, és így azonosíthatóak a letékeredést iniciáló régiók. A *heat-jump/stopped-flow* készülék talán áttörést hoz az enzimreakciók és a fehérjék hődenaturációjának új jellegzetességeinek megismerésében.

P-39 A RhoA fehérje szerepe az NGF indukálta apoptózist kivédő jelátviteli folyamatokban

Kiss K., Sebők Á., Kiss J., Szeberényi J.
PTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs

Az idegi növekedési faktor (NGF) számos idegsejt-típus növekedésében és differenciációjában fontos szerepet játszik. A patkány PC12-phaeochromocytomasejtek a neuronális differenciáció gyakran használt

sejtmodelljei, NGF jelenlétében túlélnek, és idegsejtekre jellemző tulajdonságokat mutatnak, megvonása után pedig apoptózissal elpusztulnak. Az NGF antiapoptotikus jelátviteli folyamatainak elemei közül – többek között – a nukleáris faktor kappa B (NFκB) transzkripció faktor foszfatidilinozitol-3-kináz- (PI3K) függő szerepe bizonyított. Ismert, hogy akár az NFκB, akár a PI3K gátlása PC12-sejtek apoptózisához vezet. Munkánk célja az NGF indukálta antiapoptotikus jelátviteli útvonal(ak), valamint az NFκB-aktiváció szabályozásában résztvevő további elemek azonosítása. Az általunk részletesebben vizsgált RhoA fehérje számos sejtmoddellben részt vesz az NFκB aktivációjában, néhányban ismert PI3K-függően. PC12-sejtekben gátlása neuritnövekedést idéz elő, valamint aktivátora, a lizozozofatidinsav proliferatív, antiapoptotikus hatása. A RhoA szerepét vad típusú és konstitutíván aktív, valamint domináns negatív RhoA-t expresszáló PC12-sejtekben vizsgáltunk. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a RhoA fehérje konstitutív aktivációja csökkenti a sejtek életben maradásához szükséges szérumbigényt, bár a szérum, valamint az NGF hiánya által indukált apoptózistól nem védi meg a sejteket. Látható továbbá az is, hogy NGF antiapoptotikus válasza során – eltérően a vad típusú sejtektől – NFκB DNS-kötő aktivitása nem változik RhoA konstitutív aktivációja mellett, még PI3K gátlása esetén sem. Ugyanakkor NFκB nátrim-szalicilláttal történő gátlása apoptózishoz vezet szérum és NGF jelenlétében konstitutíván aktív RhoA-t expresszáló szubklónokban is. Valószínűsíthető, hogy RhoA elősegíti a sejtek proliferációját, részt vesz szérum és NGF által indukált túlélésben, de nem védi meg a sejteket a teljes éhezés okozta, valamint az NFκB-gátlással előidézett apoptózistól.

P-40 A közeg deutériumkoncentrációjának változása gátolja a sejtosztódást

Kiss A. S.¹, Galbács Z.²
¹ Magyar Magnézium Társaság, Szeged; ² SZTE Szeretlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Szeged

Amennyiben természetes vizek deutériumtartalmánál (150 ppm) akár kisebb (pl. 20 ppm), akár nagyobb (300 ppm) deutériumkoncentrációjú vízben csíráztattunk magvakat, gátolt volt a hajtáshossz, a tömeg növekedése, azaz a sejtosztódás. Az ép, egészséges tenyészetek 10–12 nap múlva alkalmazkodni tudtak a megváltozott deutériumkoncentrációjú közeghez, és utolérték a kontrollnövénykéket. Nem így a tumoros szövetek, mert ezek – pl. a tumoros (*Agrobacterium tumefaciens*) dohányszövet-tenyészetek – a tenyészet korával összefüggően, elmaradtak a kontroll-tenyésztőtől (pl. 35 nap alatt 50%-kal). A deutériumkoncentráció-változás okozta sejtosztódásgátlás részben feltételezett, részben igazolt (energetikai, Na/H, Na/Mg antiport, sejtciklus G₂) mechanizmusa révén értelmezhető.

P-41 A kalcineurin szerepe endothelsejtek citoszkeletonszerkezetének szabályozásában

Kolozsvári B., Bakó É., Mótyán J., Gergely P.
DE, OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Számos sejtfolyamat szabályozásában a reverzibilis fehérjefoszforiláció kulcsszerepet tölt be. A foszforiláció protein kinázok, a defoszforiláció protein foszfatázok révén valósul meg. A kalcineurin (PP2B) kalcium/kalmodulin-dependens foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz, mely két alegységből: katalitikus (CnA) és regulátor (CnB) fehérjéből áll. A katalitikus alegységnek három izoformáját mutatták ki endothelsejtekben (α, β, γ). Az endothelsejtek konfluens *monolayer*t alkotnak az erek belső falán, feladatuk, hogy szelektív *barriert* képezzenek a keringő vér és a szövetek között. A citoszkeleton elemeinek átrendeződése, az aktin mikrofilamentumok és az aktin-miozin-kölcsönhatás változásai meghatározzák pl. az endothelsejtek alakját és a vasculáris *barrier* integritását. Gyulladásos folyamatokban bioaktív ágensek hatására az endothelsejtek kontrakciója, és így a sejtek közötti hézagok képződése figyelhető meg, a *barrier*funkció sérül, többek között a miozin-könnyűlánc (MLC) foszforilálásának következményeként. A folyamat szabályozásában a PP1 mellett a PP2B is fontos szerepet tölt be. Kutatásaink során a kalcineurin katalitikus alegység különböző izoformáinak szerepét vizsgáljuk emlős-endothelsejtekben. Jelen munkánkban tanulmányoztuk a PP2B, a *barrier*funkció és a citoszkeleton szabályozása közötti kapcsolatot endothelsejtekben sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel. Vizsgáltuk a CnA alegység á izoforma plazmidjával transzientan transzfektált endothelsejtek citoszkeletonszerkezetének változását thrombinnal való kezelést követően. Kísérleteink hozzájárulhatnak gyulladási folyamatokban az ödémakialakulás pathomechanizmusának megértéséhez. (OTKA K60620)

P-42 Az apoptotikus sejtek gyulladási citokintermelést szabályozó hatásának vizsgálata vad típusú és szöveti transzglutamináz-hiányos makrofágokban

Köröskényi K., Sarang Zs., Szondy Zs., Fésüs L.

DE, OEC, Biokémia és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Irodalmi adatokból ismert, hogy a sejtek apoptózissal történő elhalását nem követi gyulladáson válsz, szemben a sejtek nekrozissal történő elhalásával. Az irodalomból elfogadott nézet, hogy az apoptotikus sejtek felvétele során a makrofágokban megindul a gyulladáscsökkentő hatású TGF- β faktor termelése, amely a makrofágra visszahatva csökkenti a gyulladási citokinek (pl. TNF- α , IL-6) termelődését. Az inaktív, látens TGF- β faktor aktiválásában részt vesz a szöveti transzglutamináz (TG2) is. Intézetünkben korábban megfigyelték, hogy TG2^{-/-}-egerekben az apoptotikus sejtek fagocitózisa zavart szenvedett, és a májban az apoptózist gyulladás kíséri. Kísérleteinkben ELISA technikával vizsgálni kívántuk, hogy a TG2 hiánya befolyásolja-e az apoptotikus sejtek gyulladási citokintermelést csökkentő hatását hasüregi és csontvelői őssejtekből differenciáltott, lipopoliszacharid- (LPS) stimulált makrofágokban *in vitro*. Eredményeink azt mutatják, hogy a TG2^{-/-}-makrofágok alig termeltek aktív TGF- β faktort. Ennek ellenére a TG2^{-/-}- és TG2^{+/+}-makrofágok azonos mértékben reagáltak – a TNF- α és IL-6 termelés csökkentésével – az apoptotikus sejtek jelenlétére. Az apoptotikus sejtek gyulladási citokintermelést csökkentő hatása sejtfelülúszóval átvihető volt olyan LPS-stimulált makrofágokra, amelyek nem találkoztak apoptotikus sejtekkel, utalva arra, hogy az apoptotikus timociták jelenlétében a makrofágok szolubilis gyulladáscsökkentő faktort termelnek. Az irodalmi adatokkal szemben ez nem TGF- β , mivel a hatás aktív TGF- β hiányában illetve annak blokkolásával is kiváltható volt. (OTKA T049445, T544798)

P-43 Szfingolipidek kalmodulinnal való kölcsönhatásának jellemzése: a jelátvitelben betöltött szerepük kibővíthető

Kovács E., Liliom K.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A szerkezetileg legegyszerűbb szfingolipidek – beleértve a szfingozint, szfingozin-1-foszfátot és a ceramidot – mint a biológiai membránok építőkövei és a szfingolipid-anyagcsere közti termékei már régen ismertek. Újabb eredmények szerint ezek a molekulák számos jelátviteli útvonalat aktiválnak, így olyan alapvető folyamatokat szabályoznak mint a sejtnövekedés, az apoptózis és a motilitás. A szakirodalomban bizonyos adatok arra utalnak, hogy ezek a lipidek kölcsönhatnak a kalmodulinnal. A kalmodulin, a legáltalánosabb intracelluláris kalciumreceptor, főleg hidrofób kölcsönhatások révén kötődik a célmolekuláihoz, inhibitorai aromás, hidrofób vegyületek. A szfingozinról már bizonyított, hogy számos kalmodulindependens enzim inhibitora. Ezen kívül a szfingozin-1-foszfát és a szfingozil-foszfóril-kolin (SPC) képes a belső raktárakból kalciumot felszabadítani, valamint a szfingozin kináz kötődik a kalmodulinhoz, és feltételezhetően szabályozódik általa. Munkánk során a jelátvitelben szerepet játszó szfingolipidek kalmodulinnal való kölcsönhatásának bizonyítását, jellemzését tűztük ki célul. A Ca²⁺-telített kalmodulinhoz, valamint az apokalmodulinhoz való kötődést egyaránt vizsgáltuk fluoreszcens (saját tirozinok és dansyl-jelölt fehérje) és cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével. A kötődés funkcionális következményeit foszfodiészteráz- és kalcineurin-enzimaktivitási mérésekkel vizsgáltuk. Eredményeink alapján a tesztelt lipidek közül a szfingozin, a ceramid és az SPC kötődik a kalmodulinhoz, valamint a funkcionális mérésekben gátolja annak aktivitását. Míg az előző kettő kötődése olyan jelentős konformációváltozást okoz, hogy feltételezhetően denaturálja vagy aggregálja a fehérjét, addig az SPC kötődése telítési görbével leírható. Az SPC valószínűsíthetően egy biológiailag releváns, újonnan felismert kalmodulin inhibitor.

P-44 Rákos sejtek dUTPáz mRNS-ének csendesítése apoptózist vált ki

Kovács J., Merényi G., Zagyva I., Vértessy G. B.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz DNS javításban betöltött szerepe a dUTP/dTTP arány csökkentése révén preventív. Enzimműködés hiányában a DNS uracil-tartalma megnő, aktiválódik a sejt DNS-t vágó-javító mechanizmusa, timinmentes sejtihal lép fel. Rákos sejtekben mRNS-csendesítéssel elérhető a sejtbeli dUTPáz-szint csökkenése vagy megszűnése. Négyfajta siRNS-t terveztem. Ezek a humán dUTPáz nukleáris (DUT-N) és mitokondriális (DUT-M) izoformájának mRNS-ét egyaránt célozzák. Olyan csendesítő plazmidkonstruktokat állítottam elő, amelyekből a megfelelő siRNS-ek képződnek a sejten. A humán ráksejteket először egy *Drosophila melanogaster* dUTPáz génszekvenciát tartalmazó indukál-

ható expressziós plazmiddal transzfektáltam, aminek a termelését rögtön be is indítottam. Ezeket a sejteket transzfektáltam a fiziológiai humán dUTPáz mRNS-ének degradációjáért felelős csendesítő plazmidokkal. A sejtbeli humán dUTPáz kiiktatása még nem okoz apoptózist, mivel a sejteket védi az acetmuslica dUTPáz. Amikor kikapcsoljuk az acetmuslica dUTPáz termelő plazmidot, az apoptózis beindul. HeLa sejtek transzfekciója humán dUTPáz mRNS-csendesítő plazmiddal a DUT-N mRNS erőteljes csökkenéséhez vezetett, de a dUTPáz fehérjeszint változatlan maradt. Az egyik csendesítő plazmid teljes DUT-M mRNS-degradációt váltott ki, ami fenotípusos változást idézett elő. A második csendesítő plazmid csak a DUT-N mRNS degradációjáért volt felelős. A maradék két plazmid apoptózist idézett elő HeLa sejtekben. DU145 sejtek transzfektálása a csendesítő plazmidokkal három esetben apoptózishoz vezetett. Eredményeim alapján új, hatékony rákellenes terápia tervezhető, amely a multirezisztens p53-károsodott tumor-sejteket is elpusztítja.

P-45 A human ABCG2 multidrogrezisztencia-gén csontvelővédő hatásának igazolása egér-génterápiás modellen

Kucsma N., Ujhelly O., Várady Gy., Sarkadi B., Német K.

OGYIK, Haematológiai és Immunológiai Intézet, Kísérletes Génterápiás Laboratórium, Budapest

Az ABCG2 multidrogrezisztenciát okozó membránfehérje, amely képes egyes kemoterápiás szereket kipumpálni sejtekből. Szubsztrátmutáns változata, az ABCG2-482G csak drogon erősen szelektált sejteken jelenik meg. Az ABCG2-482G fehérje kifejezését alkalmaztuk csontvelő-transzplantációt kiegészítő génterápiás kísérletekben, kemoterápiás kezelésben részesülő betegek őssejteinek megvédéséhez. A kidolgozásra kerülő terápiás eljárás lehetővé teszi a magas dózisu drogkezelés összejtkárosító mellékhatásának kivédését. A humán ABCG2 túlexpressziójának hatását vizsgáltuk egércsontvelő-transzplantációs modellen. A terápiás fehérjét kódoló cDNS-t, retrovirusrendszerrel, csontvelőből izolált őssejtekbe juttattuk be (Sca1+ sejtek), majd ezekkel a sejtekkel végeztük el a letális besugárzott egereken az átültetést. Kontrollként ugyanazon vektorrendszerrel, GFP-t kódoló gént vittünk az őssejtekbe. Hat héttel a transzplantáció után, az állatok egy részét Doxorubicinnal, a klinikumban gyakran alkalmazott kemoterápiás szerrel kezeltük, amely az ABCG2-482G szubsztráta. A kezelés után 10 nappal az állatok vér-, csontvelő- és lép-mintáiból meghatároztuk a transzgen kifejeződését, valamint a csontvelői és limfoideredetű sejtek arányát. A drogkezelés hatására, az ABCG2-t kifejező sejtek, főként a mieloideredetű (Gr1+) populációban, szignifikánsan feldőszultak, míg a GFP-kifejeződés nem változott. A dűsulás mértéke 20-40% közé esett. Eredményeink ígértesnek látszanak az ABCG2-482G génterápiás alkalmazásához.

P-46 A flavin monooxigenáz enzimsalád homológiamodellezése

Likó I., Borbás T.

Richter Gedeon Rt., Budapest

A flavin monooxigenázok (FMO) nukleofil heteroatomot tartalmazó xenobiotikumok és gyógyszerek metabolizmusában részt vevő mikro-szomális enzimek. Prosztetikus csoportként FAD-ot tartalmaznak, működésük NADPH- és O₂-függő. A FMO működésének megértése érdekében 3D-szerkezetmodellét készítettünk homológiamodellezés segítségével. Ehhez négy ismert fehérjeszerkezetet használtunk fel templátként: glutation reduktazt (1get), NADPH peroxidázt (1npx), egy ismeretlen funkciójú fehérjét, ami hasonlít a flavin monooxigenázokhoz (1vqw) és fenil-aceton monooxigenázt (1w4x). A négy fehérje szerkezetét manuálisan illesztettük egymásra. A szerkezetek összehasonlítása során két konzervált domént találtunk: a FAD-kötő domént és a NADPH-kötő domént. A négy szekvenca ugyan nem mutatott nagy-fokú homológiát, de a másodlagos szerkezeti elemek a doméneken belül teljesen megegyeztek. Különféle fajokból származó FMO izoformákra (humán, patkány, marha, csirke és egér FMO3, humán, patkány és egér FMO1, valamint nyúl FMO2) különböző módszerekkel másodlagos szerkezetjelölést tettünk, és ennek segítségével szekvencaillesztést végeztünk az enzimsaládra. Ezután a négy ismert szerkezet illesztését kombináltuk az FMO-k szekvencaillesztésével. Az FMO-modellt a homológiai alapján Swissmodell PromodII programmal építettük meg. A kapott szerkezetet energiaminimalizálással és molekuláris dinamikai számításokkal finomítottuk. A jövőben a modellt felhasználhatjuk az FMO-k működésének és szubsztrátspecifitásának tanulmányozására, valamint a természetben előforduló FMO-mutációk hatásának értelmezésére.

P-47 Zöldtea-flavonolok hatása a glukozidáz II enzim aktivitására

Magyar É. J., Konta L., Bánhegyi G., Mandl J., Csala M.
SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

A zöld teában legnagyobb mennyiségben előforduló polifenolok egyike, az epigallocatechin-gallát (EGCG) gátolja a sejtproliferációt és az angiogenezist; emellett proapoptotikus hatása is van. Más tumorgátló ciklusos polihidroxi-vegyületek hatásmechanizmusában az endoplazmás retikulum (ER) glukozidáz II enzimének gátlása elsődleges szerepet játszik. Ez az enzim részt vesz az N-glikoproteinek éréseben és a fehérje minőségellenőrzésben. Feltételezések szerint az EGCG hatásában is szerepet játszhat a glukozidáz II gátlása. Kísérleteinket patkány máj-mikroszómán végeztük specifikus glukozidáz II szubsztrátokkal – 4-metilumbelliferil-glukoziddal (MUG) és 4-nitrofenil-glukoziddal (NPG). A keletkező metilumbelliferon mennyiségét fluoriméterrel, a 4-nitrofenolét pedig HPLC segítségével határoztuk meg. Mindkét szubsztrát esetén Michaelis-Menten típusú enzimkinetikát észleltünk. A MUGáz aktivitás – szemben az NPGáz aktivitással – koncentrációfüggő latenciát mutatott. Az EGCG mindkét szubsztrát esetében jelentős gátlást okozott. A hatás koncentrációfüggő és kinetikáját tekintve nemkompetitív típusú volt. Meghatároztuk több teakatechin koncentráció-hatás-görbéjét, valamint az ebből számítható IC₅₀ és K_i értékét. Az összehasonlításból arra következtítettünk, hogy a glukozidáz II gátlásához elsősorban a gallát-molekularészlet szükséges, de a gallo csoport kötődésének térszerkezete is befolyásolja. A leírt hatással a tea flavonolok farmakológiai alkalmazásánál számolni kell. A glukozidáz II gátlása révén lelassult glikoprotein-érés és a fehérje-minőségellenőrzés zavarát játszhatja a proliferációs és angiogenezis jelátvitel csökkenésében; ER-stresszt és apoptózist is okozhat.

P-48 Delta-retrovírus-proteázok szerkezetjölésére mutagenézis-vizsgálatok segítségével

Matúz K., Bagossi P., Kádas J., Tózsér J.

DE, OEC, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet, Debrecen

A humán T-sejtes leukémia-vírus (HTLV) és a marhaleukémia-vírus (BLV) a delta-retrovírusok családjába sorolhatók, és szerepük van bizonyos leukémia- és mielopátiafajták kialakulásában. A retrovírusok által kódolt proteolitikus enzim (PR) nélkülözhetetlen szerepet játszik a vírus életciklusában, a fertőzőképesség kialakulásában. Proteázok ezért potenciális kemoterápiás célpontok lehetnek. Vizsgálataink kezdetekor a delta-retrovírusok csoportjából még nem volt ismert egyetlen ilyen proteáz szerkezete sem, ugyanakkor a rendelkezésünkre álló homológ modell több kérdést is felvetett ezen enzimek szerkezetére, illetve szubsztrát-specifitására vonatkozóan. A szekvenciaillesztés és a homológ modellek alapján mutációkat terveztünk a HTLV és a BLV proteázokban, amelyek alapján kísérletileg kívántuk eldönteni a felvetődött lehetőségeket. A mutáns proteázokat helyspecifikus mutagenézissel állítottuk elő, baktériumban expresszáltuk, tisztítottuk, és vizsgáltuk a mutáns proteázok aktivitását. Ezeket egymással és a vad típus aktivitásával összehasonlítva a modell helyességét valószínűsítjük, amelyet az időközben megjelent HTLV PR kristályszerkezet is igazolt. (OTKA T43482, F34479)

P-49 A humán tripszinogén 4 transzlációjának iniciációja CUG kodonról N-terminális leucin aminosavval

Medveczky P.¹, Németh A.¹, Tóth J.¹, Siklódi E.¹, Schlett K.², Patthy A.¹, Palkovits M.³, Ovádi J.⁴, Tőkési N.⁴, Németh P.⁵, Szilágyi L.¹, Gráf L.¹
ELTE, TTK,¹ Biokémiai Tanszék,² Élettani és Neurobiológiai Tanszék,³ SE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézet;⁴ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;⁵ PTE, ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs
Az PRSS3 gén alternatív splicing révén kódolja a mezotripszinogént és a humán tripszinogén 4 enzimet. Míg a mezotripszinogén pankreatikus proteázként ismert enzim, a humán tripszinogén 4 kémiai tulajdonságait és biológiai funkcióját nem tanulmányozták, kizárólag predikciók alapján ismert A és B izoformája AUG és CUG iniciátorkodonokról transzlálódik, és egy 72, illetve egy 28 aminosavból álló leader peptidet tartalmaz. Munkánk során elsőként határoztuk meg a humán tripszinogén 4 N-terminális aminosavszekvenciáját, valamint tanulmányoztuk a fehérje expressziójának mechanizmusát humán tripszinogén 4 konstrukcióval transzfektált sejtvonalakban és humán agyban. Monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő egy 28 aminosavból álló szintetikus peptid ellen, mely a B izoforma leader szekvenciájának felelt meg, továbbá a rekombináns humán tripszin 4 ellen is. Ezen ellenanyagok felhasználásával *post mortem* humán agymintákból és transzfektált HeLa sejtekből elvégeztük a humán tripszinogén 4 izolálását és kémiai azonosítását. Eredményeink azt mutatják, hogy *post mortem* humán agyban túlnyomórészt a humán tripszinogén 4 N-terminális leucint tartalmazó B izoformája található, és

ugyanaz az izoforma transzfektált sejtvonalakban is kifejeződik. A humán tripszinogén 4 konstrukcióival, különböző sejtvonalakon végzett expressziós vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy a CUG kodonról N-terminális leucinnal történő transzlációiniciáció szerepet játszhat a fehérje expressziójának szabályozásában.

P-50 Az androgén hormonok befolyásolják az izomnövekedést gátló miosztatin kifejeződését

Mendler L., Baka Zs., Dux L.

A miosztatin a TGF-β-családba tartozó, izomspecifikus növekedési faktor, amelynek génkiütött egérmutása igen kifejezett izomtömegnövekedést mutatott. Ma már ismert, hogy a miosztatin alapvető negatív reguláló szerepet játszik mind a harántcsikolt izom fejlődése során, mind a felnőtt izom különböző adaptációs reakcióiban. Hatását számos faktor befolyásolhatja, amelyekről jelenleg keveset tudunk. A hím állatok nagyobb izomtömeggel rendelkeznek, és egyéb kísérleti eredmények is arra utalnak, hogy az androgének szerepet játszanak az izomtömeg szabályozásában. Célunk az volt, hogy a miosztatin expresszióját androgén-dependens vázizomban vizsgáljunk, és összefüggést találjunk a tesztoszteronszint és a miosztatin kifejeződése között. Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk, amelyeknek egy csoportját kasztráltuk, egy másik csoportot kasztrálást követően naponta tesztoszteron-propionáttal kezeltünk, kontrollként pedig kezeletlen, nem kasztrált állatok szolgáltak. A kasztrálást, illetve hormonkezelést követően különböző időpontokban az állatokból eltávolítottuk az androgénérzékeny levator ani izmukat, súlymérés és morfológiai vizsgálat után az izmkból RNS-t izoláltuk, majd a miosztatin specifikus primerekkel RT-PCR reakcióban amplifikáltuk. Vizsgálataink szerint a kasztrált állatokban a miosztatin-transzkript szintje emelkedő tendenciát mutatott a levator ani izomsúlycsökkenésével párhuzamosan, míg a tesztoszteronkezelés hatására az izomsúly újra normalizálódott, a miosztatin szintje pedig szignifikánsan lecsökkent a kasztrálthoz és a kontrollhoz képest is. Eredményeink arra utalnak, hogy az androgének izomtömeg-növelő hatása a miosztatin mRNS-szintű regulációján keresztül is megvalósulhat. (ETT 421/2003, RET 08/2004 OMF0066/2005)

P-51 Az n-6-ot n-3 zsírsavvá átalakító transzgenikus egerek agyának genomikai vizsgálata

Ménesi D.¹, Kitajka K.¹, J. Belleger², M. Narce², Puskás L.¹

¹ MTA, SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged; ² UPRES Lipides et Nutrition, Univ. Bourgogne, Dijon, France

Ismert, hogy az omega-3 (n-3) többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) szintje, ideértve a dokozahexánsavat (DHA) is, szigorúan szabályozott, bármilyen eltérés a fiziológiai szinttől zavart okoz a kognitív funkciókban. Az n-3 és n-6 zsírsavak szerepe nélkülözhetetlen az agy növekedésében és funkciójának ellátásában, amit feltehetően a génextpresszióra, az elektrofiziológiai válaszokra, az eikozanoidszintézisre és a membránstruktúrára gyakorolt hatásukon keresztül közvetítenek. A DHA és a DHA-tartalmú foszfolipidek pontos hatásmechanizmusa még nem ismert, de számos elképzelés létezik velük kapcsolatban. Az emlősök nem képesek n-3 zsírsavat szintetizálni a táplálékukban bőségesen jelen levő n-6 zsírsavból, ezért azt a táplálékkal kell bevenniük. A *Caenorhabditis elegans fat-1* génjét hordozó transzgenikus egerek viszont kettős kötést tudnak adni a telítetlen zsírsavak szénhidrogénláncához, így képesek lesznek átalakítani az n-6-ot n-3 zsírsavvá. Ennek eredményeként ezen egerek szerveiben, ideértve az agyukat is, több omega-3 és kevesebb omega-6 zsírsav lesz jelen, még hozzáadott n-3 hiányában is. Megvizsgáltuk a génextpressziós változásokat mRNS-szinten a vad típusú és a transzgenikus egerek hipokampuszában, majd a teljes agyában DNS-microarray és kvantitatív RT-PCR technikákat alkalmazva. Specifikus változásokat tapasztaltunk transzkripció szinten, amelyet az n-3/n-6 zsírsavarány eltolódásával magyarázhatunk, ami befolyásolja ezen zsírsavak által közvetített folyamatokat. Ezek az eredmények és a „genetikailag etetett” állatmodell alkalmazása új utakat nyithatnak az n-3 zsírsavak agyban betöltött szerepének megértésében.

P-52 A humán dUTPáz enzim gátlása timinmentes sejthalál és apoptózis előidézése céljából

Merényi G., Kővári J., Zagyva I., Vértessy B. G.

MTA, SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz alapvető fontosságú pirofoszfatáz, amely megakadályozza az uracil téves beépülését a genom DNS-be a replikáció során. A stabil homotrimer enzim a dUTP dUMP-re való bontását katalizálja, így csökkenti a sejten belüli dUMP/dTTP-arányt. dUTPázra nullmutáns sejtekben vagy az enzim expressziójának teljes gátlása során timin-

mentes sejtthálal figyelhető meg. E folyamat mechanizmusa mindeztől függetlenül ismeretlen. Célunk az, hogy megismerjük a timinmentes sejtthálalhoz vezető apoptotikus folyamatot dUTPáz-hiányos ráksejtvonalakban. E munkában mRNA-csökkentéssel a humán dUTPáz expresszióját kívántuk csökkenteni. A siRNS segítségével végzett sejttranszfekció azonnali sejtthálalt váltott ki, nem adva módot a folyamat részletes tanulmányozására, így mentőkonstrukció (*rescue construct*) alkalmazása mellett döntöttünk. A *Drosophila melanogaster* C-terminálisán rövidített dUTPáz enzimét kódoló génszakaszt indukálhatóan túlexpresszálok emlősvektorba klónoztuk, a kapott génkonstrukciót különböző ráksejtekbe, így HeLa és HT-29 sejtekbe vittük be, s a transzgén kifejeződését tetraciklinadagolással szabályoztuk. A siRNS kiemelkedő specifitása miatt azon ráksejtek, melyekben az endogén humán enzim génje csendesített, életben maradhatnak a *Drosophila* dUTPáz konstitutív kifejeződése nyomán. A rövidített rovarenzim nukleáris lokalizációs jelet tartalmaz. Az immunfluoreszcenciás mikroszkópos vizsgálatok szerint e jel megfelelően működik a humán sejtekben is a *Drosophila* dUTPáz sejtmagba történő transzportjában. Így az exogén rovarenzim a lecsendesített humán dUTPáz katalitikus szerepének funkcionális helyettesítője lehet. A rovarenzim expressziójának szabályozott kikapcsolásával megismerhetjük a timinmentes programozott sejtthálal mechanizmusának alapvető fontosságú lépéseit.

P-53 A β_2 -mikroglobulin-amiloidszálak törésének vizsgálata
 Micsónai A.¹, Petrik É.¹, Y. Goto², Kardos J.¹

¹ ELTE, TTK, Biokémiai Tanszék; ² Institute for Protein Research, Osaka Univ., Osaka, Japan

Előregedő társadalmunkban egyre súlyosabb problémát okoznak a fehérjék kóros aggregációjával kapcsolatba hozható degeneratív betegségek, mint az Alzheimer- és Parkinson-kór. Az aggregátumok kialakulásának nukleációs fázisáról ma még keveset tudunk. Munkánk során az MHC-I molekula egyik alegysége, a dialízishez kötődő amiloidózis kialakulásáért felelős β_2 -mikroglobulin (β_2m) aggregációját vizsgáltuk. Korábbi eredményeink alapján megalkottunk egy nukleációs és degradációs modellt, mely szerint megfelelő hosszúságot elérve az amiloidszálak eltörhetnek, így növelve a polimerizációs helyek (szabad szálvégek) számát és a folyamat sebességét. Feltételezéseinket fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel, valamint atomerő-mikroszkópia alkalmazásával támasztottuk alá. Sikeresen kimutatnunk, hogy a szálak törése mind hő, mind pedig mechanikai hatásra bekövetkezik, és kulcs szerepet játszik a kezdeti nukleációs fázisban. Modellünket és kísérletes eredményeinket felhasználva sikerült egy számítógépes szimulációt megalkotni. Célunk, hogy egzaktt fizikai paraméterekkel jellemezzük az amiloidképződés lépéseit. Vizsgáltuk továbbá detergens, alkoholok, lipidek stb. stabilitást befolyásoló hatását is. A nukleáció vizsgálata segítséget adhat a betegség kialakulásának és lefolyásának jobb megértéséhez, valamint egy eredményes terápia kifejlesztésében is hasznosnak bizonyulhat.

P-54 Transz domináns negatív hiv proteáz gátló hatása

Miklóssy G., Matúz K., Kádás J., Tózsér J., Bagossi P.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A retrovirális proteázok felelősek a retrovírusok érése folyamán a virális Gag és Gag-(Pro)-Pol poliproteinek hasításáért, így a replikáció nélkülözhetetlen lépését katalizálják. A HIV-1 proteáz fontos célpontnak bizonyult az AIDS-terápiában, és különböző proteáz inhibitorok már klinikai használatban vannak. A virális proteáz dimertermészete vezetett a domináns negatív inhibitorok fejlesztési stratégiájához. Ezen inhibitorok nagy része deficiens proteáz monomer, amelyek a funkcióképes monomerekkel kapcsolatba lépve inaktív heterodimer proteáz eredményeznek. Előnyük a kis molekulájú inhibitorokkal szemben, hogy nagy kölcsönható felületük miatt kevésbé érzékenyek a rezisztenciát okozó mutációkkal szemben. Molekuláris modellezés segítségével olyan mutáns HIV-1 proteáz monomereket terveztünk, amelyekben a szubsztrátkötő zsebet aminosav-oldalláncokkal töltöttük fel a természetes szubsztrátok kötődésének megakadályozására. A mutáns fehérjéket helyspecifikus mutagenézissel állítottuk elő, baktériumban expresszáltuk, és HPLC-oszlopon tisztítottuk. Az *in vitro* gátlásvizsgálatokat a laboratóriumunkban kidolgozott mikrotiterlemezben történő fluoreszcencia mérési módszer segítségével végeztük a fehérjék újratekérése után. A gátlás specifikus voltát és a vad típusú proteázzal való közvetlen asszociációt egy hexahisztidinvéget tartalmazó konstrukció segítségével bizonyítottuk. Az *in vivo* gátlás hatásfokát egy génterápiás HIV-vektorrendszer elemeinek felhasználásával teszteltük. (OTKA F34479, T43482)

**P-55 A megfelelő normalizáló gének kiválasztása monocita-
 taéretlen dendritikus sejtrendszerben, kvantitatív RT
 PCR technikával**

Miko E.¹, Lányi Á.², Szatmári I.¹, Széles L.¹, Scholtz B.¹

DE, OEC, ¹ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Genomika Központ; ² Immunológiai Intézet, Debrecen

Mint minden kvantitatív analízis esetén, az mRNA-szintek összehasonlító analízisének is alapvetően szükséges az adatok normalizálása. Az mRNA-szinteket mérő génexpressziós analízisnél ez a megfelelő normalizáló gének (háztartási gének) kiválasztását jelenti, melyek expressziója a kérdéses kísérleti rendszerben nem, vagy csak kis mértékben változik. Mivel minden kísérleti rendszerben más gének alkalmasak normalizálásra, kiindulásképpen célszerű több potenciális normalizáló gén expresszióját nyomonkövetni, és ezek közül a legstabilabb expressziót mutató gént/géneket kiválasztani normalizálásra. Kísérleteinket monocitaéretlen dendritikus sejtrendszerben végeztük, SYBR Green I és TaqMan™ alapú RT kvantitatív PCR technikákat alkalmazva. A kutatásokban leggyakrabban használt normalizáló gének expresszióját ellenőriztük: béta-aktin (ACTB), béta-2-mikroglobulin (B2M), hipoxantin-fosforibozil transzferáz I (HPRT1), riboszómális L13A protein (RPL13A), szukcinát dehidrogenáz komplex A-alegység (SDHA), glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), foszfoglicerát kináz 1 (PGK1), glükuronidáz béta (GUSB), ciklofillin (CYCLO), *large ribosomal protein* (36B4=RPLPO). Eredményeink azt mutatják, hogy monocitáknál az ACTB a legjobb normalizáló gén, éretlen dendritikus sejtekben pedig a HPRT1. A monocita-IDC-differenciálódás során mindegyik normalizáló gén expressziója változott bizonyos mértékben, ezért Mo-IDC-pároknál RPL13A és GAPDH génpárosítás bizonyult a legmegfelelőbbnek, ahol az RPL13A magasabb, míg a GAPDH alacsonyabb szinten expresszáldók IDC-kben. Ilyen esetekben a két normalizáló gén kópiaszámának mértani középértéke használható normalizáló faktorként a számításokban.

**P-56 Sztérárvázis hormonok kimutatása humán mintákból
 MALDI ToF tömegspektrometria alkalmazásával**

Montskó G., Németh V., Pandur E., Nagy J., Márk L.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

A sztérárvázis hormonoknak három alapvető típusa található meg az emberi szervezetben: glukokortikoidok, mineralokortikoidok és nemi hormonok. Szintézisük a mellékvesekéregben, illetve a gonádokban történik koleszterinből kiindulva. Biológiai hatásai a szénhidrát- és ásványi anyagcsere, valamint a nemi működés befolyásolásában nyilvánulnak meg. Abszolút, illetve relatív mennyiségük számos megbetegedésben (Cushing-szindróma, mellékvesetumorok, nemi differenciációs zavarok) megváltozik, ennek megfelelően a humán mintákból történő meghatározásuk diagnosztikai értékű lehet. A minták nemihormon-összetételének hasonló megközelítés alapján történő meghatározása pedig lehetővé teszi a nem meghatározását igazságügyi, illetve régészeti csontanyagban. Munkánk során egy olyan gyors, nagy áteresztőképességi igényeket kielégítő tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas biológiai minták (vér, vizelet, csontszövet) sztéróidhormon-tartalmának és -összetételének meghatározására. Vizsgálatainkat MALDI ToF/ToF tömegspektrométeren végeztük fullerén- és HCCA-mátrix alkalmazásával. A technika előnye, gyorsaságában rejlik, így rutinszerűen, kis költséggel alkalmazható orvosi diagnosztika, igazságügy orvostan vagy akár a paleoantropológia területén is.

**P-57 Uracilspecifikus nukleáz szerepe és szabályozása
 ecetmuslica metamorfózis során**

Muha V., Vértessy G. B.

MTA SZBK, Enzimológia Intézet, Budapest

Az ecetmuslica lárvális szövetekben nincs jelen két nagyon fontos, az uracil eltávolításában szerepet játszó kulcsenzim; a dUTPáz, mely a dUTP-t bontja le és az uracil-DNS-glikoziláz, mely a DNS-be már beépült uracilt vágja ki. Ezek alapján a DNS-ben uracil halmozódhat fel. Kutatócsoportunk egy uracilspecifikus nukleáz (UDE) azonosított, mely valószínűleg a lárvális szövetekben felhalmozódott uraciltartalmú DNS lebontásáért és ezzel összefüggésben a sejt haláláért felelős a teljes átalakulással fejlődő rovarok metamorfózisa során. Az UDE fehérje közvetlenül a bebábozódás előtt jelenik meg, expresszióját feltehetőleg a védési hormon, ecdizon által szabályozott folyamat indukálja. Az UDE géntől *upstream* irányban található egy FIRE-hez nagyon hasonló szekvencia (*fushi tarazu factor one response element 1*), feltehetőleg a bFTZ-F1 (*fushi tarazu factor one*) transzkripció faktor szabályozó hatását teszi lehetővé, mely önmagában is a metamorfózis regulációjában vesz részt. Jelen munkában az ecdizon hormon, a bFTZ-F1 transzkripció faktor és az UDE végrehajtó enzim kapcsolatát és jelentőségüket vizsgálom az ecetmuslica fejlődésében.

P-58 A matrilin-1 szabályozóelemek működésének vizsgálata transzgenikus egerekben

Nagy A., Sinkó I., Molnár A., Kénesi E., Kiss I.
MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A porcspecifikus gének között a matrilin-1 gén sajátos tulajdonsága, hogy kifejeződése *in vivo* a növekedési porckorong meghatározott zónáira, szövettényészetben pedig egyes fejlődési állapotokra korlátozódik. A matrilin-1 szabályozó régióinak vizsgálata transzgenikus egerekben azt mutatta, hogy a magas szintű transzgenaktivitáshoz valamennyi porcszövetben az *upstream* promóter és introni elemek is szükségesek. Kimutattuk továbbá, hogy a hosszú promóter önmagában, illetve a rövid promóter az introni elemekkel korlátozza a transzgen kifejeződését a növekedési porckorong proliferatív és prehipertróf porcsejtjeire. Mivel a transzgenek egymással csak a rövid promóterben egyeztek, arra voltunk kíváncsiak, vajon a zonális génekifejeződési mintázatát e rövid promóter felelős-e. Tapasztalataink szerint a rövid promóter aktivitása önmagában viszonylag alacsony volt ugyan, de mutatott némi zónapreferenciát a transzgenikus egerekben. Hogy a zonális expresszió szabályozását mélyebben is megismerjük, a rövid promótert és a különböző hosszúságú távoli promóterfragmentumokat magában foglaló *LacZ*-fúziós konstrukciókat vittünk be mikroinjektlással egér genomba. A transzgenexpressziót a G0 embriók növekedési korongjának X-gal festésével és szövettani vizsgálatával követtük nyomon. Az introni és a heterológ porcspecifikus szabályozó elemek rövid promóterre gyakorolt aktivitás- és zónaspecifikus befolyásoló hatását szintén vizsgáltuk. (OTKA T049608, ETT256/2003, GVOP-3.1.1-2004-05-0290/3.0 (I.K.), OTKA PD05006 (E.K.))

P-59 Egy közös molekula szerepe a riboszómális RNS érésében élesztő- és emlőssejtekben

Nagy L., Pandur E., Debrenci B., Montskó G., Sipos K.
PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Munkánk során egy citoszolikus, vas-kén-komplexet tartalmazó fehérje, az RNáz L inhibitor (Rli) eddig kevésbé ismert funkcióját vizsgáltuk. Az Rli szerepét először emberben írták le: gátolja az RNáz L enzimet. Az RNáz L virális fertőzésekben aktiválódik. A kettős szállú RNS aktiválja a 2-5-A szintetáz, ami egyben az interferon hatását közvetítő enzimes csoport egy fontos tagja az emlőssejtekben. 2-5-A szintáz hatására létrejövő 2'-5' oligoadenilat az RNáz L aktivátora. Az RNáz L az oligoadenilat hatására képes kifejteni antivirális és antiproliferatív hatását. Élesztősejtekben nincs RNáz L, viszont az RNáz L inhibitor (Rli1p) jelenléte esszenciális. Korábbi munkánk során bizonyítottuk, hogy az Rli1p élesztősejtekben a transláció iniciációjában és a riboszómák érésében vesz részt. Ennek alapján feltételeztük hasonló szerepét emlőssejtekben is. Munkánk során antiszensz DNS-transzfektálásával csökkentettük az Rli expresszióját. A translációra gyakorolt általános hatása és a riboszómális RNS-ek mennyiségének a változása Rli hiányában az élesztősejtekben betöltött szerephez hasonló mutatót. Olyan élesztősejtvonalat használtunk a kísérleteinkhez, amelyben az Rli promóterét antibiotikum regulálása alá helyeztük. Ezekbe a sejtekbe transzfektáltunk Rli-hibrideket (élesztő-humán) tartalmazó plazmidot. Vizsgáltuk a transzfektált sejtekben a fúziós fehérjéknek a hatását a transláció különböző szakaszaiban.

P-60 Miozin II motorfehérjék regulációjának kinetikai vizsgálata

Németh A., Süveges D., Kovács M., Nyitrai L.
ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

A regulált konvencionális miozinok (mioII) egyik csoportját közvetlenül a motorfehérje esszenciális könnyű lánc (ELC) alegységéhez kötődő Ca²⁺ (puhatestű izom mioII), a másik csoportot (gerinces simaizom és nem izom mioII) a regulációs könnyű lánc (RLC) foszforilációja kapcsolják be. Közös sajátosága a kétféle regulációnak, hogy a coiled-coil szerkezetű (dimerizációt biztosító) proximális fark régió jelenléte elengedhetetlen a kikapcsolt állapot létrejöttéhez. A kikapcsolt állapotban mindkét típusú regulációnál a két fej valószerűleg aszimmetrikusan összekapcsolódik. Kísérleteinkben a regulációt a két különböző csoportból származó kiméramolekulák segítségével vizsgáltuk. A simaizom mioII és a nem izom mioII motordoménhez kiméraként a Ca²⁺-szabályozott kagyló mioII regulációs domént, illetve a motordomén részét képező ún. konverter szubdomént, valamint a proximális, coiled coil szerkezetű farkrégiót kapcsoljuk. A kimérákkal kapott adatokat összevetve a nem kiméramolekulák kinetikai paramétereivel közelebb kerülhetünk a miozinreguláció mechanizmusainak megértéséhez, és eldönthetővé válik, hogy a foszforiláció, illetve Ca²⁺-kötésen alapuló reguláció „közös útvonalon” valósul-e meg. A kiméra miozin nehéz láncokat és a két könnyű láncot (RLC, ELC) bakulovirus expressziós rendszerben koexpresszióval termeltettük,

és a mérésekhez affinitáskromatográfiával tisztítottuk. A rekombináns kiméramotorok regulációját és kinetikai lépéseit Ca²⁺ hiányában (kikapcsolt állapot) és jelenlétében (aktív konformáció) *in vitro* motilitás tesztekkel, átmenetiállapot- és tranzien্স módszerekkel vizsgáljuk. Az eredményekből kitűnik, hogy a kiméramiozin kétféle módon is szabályozható: a kagyló ELC Ca²⁺-kötése és a simaizom RLC-foszforilációja is bekapcsolja a motor működését.

P-61 Retrovirális dUTPáz: flexibilis régiók hatása a fehérje szerkezetére és funkciójára

Németh V.¹, Barabás O.¹, Fuxreiter M.¹, Simon I.¹, D. Svergun², M. Petoukhov³, Vértessy G. B.¹

¹ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ² EMBL, Hamburg Outstation, Germany; ³ Institute of Crystallography, Moscow, Russia

A nukleokapszid dUTPáz fúziós fehérje, amely jelen van a Mason-Pfizer majomvírusban és a vírusfertőzött sejtekben, közreműködik az RNS/DNS összecsomagolásában és a reverz transzkripcióban. Megvizsgáltuk az N- és C-terminális régióknak a fehérjefeltételezésére és funkciójára gyakorolt hatását. A vad típusú és a mutáns dUTPáz nagyfelbontású szerkezete megmutatja, hogy a flexibilis C-terminális kar konformációja jelentősen eltér más dUTPázokhoz képest, esetleg közhíthatóan a dUTPáz nukleokapszidfehérjével való kovalens kapcsolódásnak, amely megváltoztatja az egyik béta-szál irányát. Dinamikus modellezés alapján ez a régió képes a saját alegységének az aktív centrumához visszahajolni. A teljes hosszúságú natív fehérje alakját kesszőgű röntgenszórással meghatároztuk. Oligonukleotid-kötésnek jelentős hatása van a trimer dUTPáz-mag körül lévő nukleokapszid-domének rendeződésére. *In vitro* meghatároztuk az enzim kölcsönható partnereit. Egyes virális fehérjék (integráz, kapszid) képesek fizikai kölcsönhatás kialakítására a NC-dUTPázal. A kísérleti eredmények a nukleokapszid és a dUTPáz fehérje közvetlen szerkezeti és lehetséges fiziológiai összekapcsolódása mellett szólnak, létrehozva egy egyedi szerveződést a béta-retrovírusokban.

P-62 A proteinkináz-kaskádrendszer szerepe a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz-gátlás kardioprotektív hatásmechanizmusában

Pálfi A.^{1,2}, Tóth A.², Halmosi R.¹, Szabados E.¹, Hídeg K.³, Sümegi B.², Tóth K.¹
PTE, ÁOK, ¹ I. sz. Belgyógyászati Klinika, Kardiológia, ² Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, ³ Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

A glikogén szintáz kináz-3β fehérje Akt vagy protein kináz C útvonalakon keresztül történő gátlása, valamint a mitogén aktiválta proteinkináz-kaskádrendszer aktivációja kitüntetett szerepet játszik a szívizomsejt túlélésében iszkémia-reperfúzió körülményei közt, az infarktust követő miokardiális *remodelling* folyamatában és szívelégtelenségben. Munkánkban vizsgáltuk, hogy a kardioprotektív hatású poli-(ADP-ribóz) polimeráz- (PARP) gátlás milyen hatást fejt ki ezen jelátviteli útvonalakra a miokardium oxidatív károsodása során. Kísérleteink során egy új PARP-gátló vegyület, az L-2286 intracelluláris jelátvitelre kifejtett módosító hatásait vizsgáltuk iszkémia-reperfúzió körülményei között Langendorff-perfúziós rendszerben, izoproterenol által kiváltott miokardiális infarktusban, valamint miokardiális infarktust követően kialakuló krónikus szívelégtelenségi modellben. Kísérleti eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP enzim gátlása kedvezően befolyásolta az intracelluláris proteinkináz kaskád aktivációs állapotát mind alult, mind krónikus miokardiális oxidatív kórképekben, ezzel kedvezően elősegítve a PARP-gátlók kardioprotektív hatását.

P-63 A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon vizsgálata

Pandur E.¹, Nagy J.¹, Montskó G.¹, Peti M. A.², Sipos K.¹

PTE, ÁOK, ¹ Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, ² Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs

A májban termelődő hepcidin egy 25 aminosavból álló peptidhormon, melynek antimikrobiális hatása mellett döntő jelentősége van a vasanyagcseré szabályozásában. A hepcidin prekürzora egy 84 aminosavból álló prepeptid, melyből keletkező érett peptid kimutatható a vérből és a vizeletből. A hepcidin szabályozza a vas vékonybélből történő felszívódását, valamint a vas felszabadítását enterocitákból és makrofágokból. A megnövekedett hepcidinszint gyulladás vagy hypoxia következtében kialakult anémia esetén gátolja a vas felszabadulását a makrofágokból, ezáltal csökkenti a szérumszintjét. Ugyanakkor a vasszint emelkedésének számos oka lehet. Ennek egyik csoportja a hepcidin szintjének csökkenése, illetve mutáció jelenléte a hepcidinben. A hepcidin receptora a ferroportin nevű vas-transzporter, mely megtalálható az enterociták, a makrofágok, a hepatociták és a placentasejtek felszínén. Szerepe

a vas plazmába történő exportjában van. Ferroportin hiányában vasakkumuláció következik be az enterocitákban, a makrofágokban és a Kupffer-sejtekben. Ismert, hogy a ferroportin internalizációját és degradációját a hepcidin regulálja. Egyes hemakromatózisos esetekben a ferroportin mutációja következtében nem tudja a hepcidin hatását kifejezni. Munkánk egyik célja a hepcidin expresszióját befolyásoló sejten belüli faktorok azonosítása, vagyis annak felderítése, melyek azok a komponensek, amelyek változása jelzés a hepcidin transzkripciójának vagy translációjának szabályozásához. Másik kérdés, hogy hepatoma-sejtkultúrában vizsgálva a hepcidin szintjének változtatására (csökkentés illetve túlexpresszió) hogyan változnak a vasanyagcsere egyes meghatározó elemeinek szintjei. Kísérleteink alapján arra következtetünk, hogy a hepcidin szintézisének szabályozása kapcsolatban áll a hembioszintézissel, annak valamely komponense játszik benne szerepet.

P-64 Magreceptorok karakterizálása egérből származó dendritikus sejtekben

Pap A., Szántó A., Nagy L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A mieloideredetű dendritikus sejtek (DC) fontos szerepet töltenek be az immunrendszerben, mint antigénbepumató sejtek (APC) képesek stimulálni a naív T-sejteket és ezáltal beindítani a specifikus immunválaszt. Laborunkban sokrétűen tanulmányozzuk, hogy különféle magreceptorok aktiválása milyen transzkripciós változásokat idéz elő a humán monocita-dendritikus sejt irányú differenciálódás során. Azonban fontos kérdés, hogy az élő szervezetben is hasonlóképpen működnek-e az általunk vizsgált aktivációs útvonalak, ezért az utóbbi időben egérmockoknál is vizsgálni kezdtük a DC-k differenciálódását. Az egérsérteletek egyszerű lehetőségeket nyújtanak különféle *in vivo* vizsgálatokhoz, de először azt kell tisztáznunk, hogy az egérsérteletű dendritikus sejtek *in vitro* a humán sejtekhez hasonlóan válaszolnak-e a ligandumkezelésekre. A kísérletekhez C57BL/6 egereket használtunk. Az egerekből csontvelői sejteket izoláltunk, majd GM-CSF és IL-4 citokinekkel DC irányba differenciáltattuk. Az izolált sejteket PPAR- (peroxisome proliferator-activated receptor), LXR- (liver X receptor) agonistákkal és retinoidokkal kezeltük. A dendritikus sejt populáció azonosítása érdekében, illetve a differenciálódás során bekövetkező változások követésére sejtfelszíni markereket (CD11c, F4/80, Ly6G, CD1d) mértünk áramlási citometriával. A sejtek nagy része CD11c⁺, ami az egereknél DC-re jellemző marker, ugyanakkor F4/80- volt, amit inkább makrofágok expresszálnak. RT kvantitatív PCR módszerrel meghatároztuk a csontvelői sejtek differenciálódása során bekövetkező transzkripciós változásokat. Azt találtuk, hogy a PPAR γ magreceptor, valamint CD-génjének (FABP4) mRNS-szintje is megemelkedik a differenciálódó DC-kben ligandumkezelés hatására. Eddigi vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy a magreceptorok aktiválása az egérsérteletű primer sejtekre is hatással vannak, azonban ezek a hatások csak részben azonosak a humán eredményekkel.

P-65 A β 2-mikroglobulin amiloidszálak reverzibilis disszociációja és a szálak szerkezeti stabilitásának vizsgálata

Petrik É.¹, Micsonai A.¹, Y. Goto², Kardos J.¹

¹ELTE, TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; ²Institute for Protein Research, Osaka Univ., Osaka, Japan

Számos degeneratív betegség hátterében a fehérjék kóros, ún. amiloidtípusú lerakódása áll. A kialakult nézet szerint az amiloidképződés irreverzibilis folyamat, a létrejött aggregátumok hővel és proteolízissel szemben rezisztensek. Munkánkban a hemodialízisben részesülő betegekben súlyos szövődményeket okozó β 2-mikroglobulin (β 2m) amiloidszálak stabilitását vizsgáltuk. A szálnövekedést az amiloidkonformációhoz specifikusan kötődő Thioflavin-T fluoreszcenciája segítségével követtük. A szálak morfológiáját (alak, méret) atomeró mikroszkópia (AFM) segítségével tanulmányoztuk. Méréseink alapján a β 2m polimerizációja reverzibilis, a szálak dinamikus egyensúlyt alakítanak ki az őket felépítő monomerekkel. Vizsgáltuk a polimerizáció hőmérsékletfüggését és a keletkezett amiloidszálak hőstabilitását. A β 2m-szálak magas hőmérsékleten monomerekre bomlanak, a hőmérséklet csökkentésével az amiloidszálak ismét megnöveszthetők. Eredményeink azt mutatják, hogy a depolimerizáció során a monomerek szálvégről történő disszociációjával egyidejűleg a szálak törése is bekövetkezik. Nem ismert, hogy milyen faktorok játszanak szerepet a β 2m amiloidképződésének folyamatában *in vivo*. Módszerünk alkalmas az amiloidképződést befolyásoló anyagok hatásának gyors és egyszerű vizsgálatára, amely közelebb vihet a terápiás célú hatóanyagok kifejlesztéséhez.

P-66 Búza apoplasztállományának proteomikai analízise

Pós V.¹, Halász K.¹, Rab E.¹, Manninger S.², Hunyadi-Gulyás É.³, Szajli E.³, Kovács G.⁴, Csósz L.⁵, Medzihradsky K.³, Lukács N.¹

¹BCE, KeTK, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék, Budapest; ²MTA NKI, Budapest; ³MTA SZBK, Tömegspektrometriai Laboratórium, Szeged; ⁴MTA MGKI, Martonvásár; ⁵Gabonatermesztési Kutató Kht, Szeged

A növények patogén elleni védekezésében fontos szerepet játszanak a sejt közötti állományba, azaz az apoplaszba szekretált fehérjék. Célunk, hogy a proteomika módszereivel az egészséges növény apoplasztájában előforduló, illetve a stresszhatásokra indukálódó és feltehetőleg a stressz elleni védekezésben szerepet játszó fehérjéket azonosítsuk. A referencia-apoplaszt elemzéséhez búza, *Triticum aestivum* cv. 'Chinese Spring' fajtát használtunk, mert a búzagenomikai vizsgálatoknál is ez a legtöbbet vizsgált fajta. Az intercelluláris folyadékot (ICF) vákuuminfiltrálást követő centrifugálással izoláltuk, a 2D-PAGE módszerrel szeparált fehérjék azonosítása MALDI-ToF elemzéssel történt. Egyes fehérjék ellen monoklonális ellenanyagokat is előállítottunk. Poszterünkön a referenciagélt és az eddig azonosított fehérjéket mutatjuk be. A levélrozsa-rezisztencia kialakításában potenciálisan szerepet játszó proteineket az Lr1-rezisztens és a vele közeli izogén szenzitív búzavonal összehasonlításával identifikáltuk. Búzalevélrozsa (*Puccinia recondita* f.sp. *triticii*, 43722 patotípus) fertőzésével asszociáltan három olyan apoplaszfehérjét azonosítottunk, amelyek korábban, illetve nagyobb mennyiségben jelennek meg a rezisztens vonal intercellulárisaiban, és így feltételezhetően a csiránövény-rezisztenciájával összefüggésbe hozhatóak. Ezek egy glukán-endo-1,3- β -D-glükózidáz (MW: 35,413 kDa, pI: 8.8), egy kitináz-1 enzim (MW: 27,077 kDa, pI: 8.7) és egy PR 1.1 protein (MW: 17,651 kDa, pI: 8.7).

P-67 Uracil-DNS-specifikus nukleáz karakterizálása *Drosophila melanogaster*-ben

Pukáncsik M.¹, Békési A.¹, Felföldi F.², Zagya I.¹, Leveles I.¹, Hunyadi-Gulyás É.³, Medzihradsky F. K.³, Erdei A.⁴, Vértessy G. B.¹

¹MTA SZBK, Enzimológia Intézet, Budapest; ²MolCat Kft., Budapest; ³MTA SZBK, Tömegspektrometria Labor, Szeged; ⁴ELTE, TTK, Immunológia Tanszék, Budapest

A *Drosophila melanogaster* genomjából hiányzik az állati és bakteriális szervezetekben gyakori uracil-DNS glikozidáz enzim. A fehérje a DNS-ben található uracilt kimetszi, és bázismentes helyet hagy hátra. Az acet-muslicában így létrejöhét uraciltartalmú DNS, megfelelő nukleotidarányok esetén. *Drosophilal*árvákban hiányzik a dUTPáz enzim, ami a sejtbeli dUTP-szintet alacsonyban tartja, és így megakadályozza az uracil timin helyére való beépülését. Mind UDG- és dUTPáz-deficiens sejtekben a DNS uraciltartalma szignifikánsan megnő. *Drosophil*ában tehát az UNG gén hiányzik a genomból, és lárvaalapban a dUTPáz enzim az imaginális diszkuszokban koncentrálnak. Mindezek az adatok azt sugallják, hogy összefüggés van a dUTPáz imaginális diszkuszokban való jelenléte és a sejtek életben maradása között. Azaz minden dUTPáz-t tartalmazó sejt túléli a lárvaalapokat, és a felnőtt légy szerveivé differenciálódik, míg a dUTPáz-t nem tartalmazó sejtek a metamorfózis során lebomlanak. Azonosítottunk egy uraciltartalmú DNS-re specifikus endonukleáz *D. melanogaster* sejt kivonatokban. A fehérjét uracil-DNS-affinitásos zlopon nyertük ki lárvaeztraktumból. Homológ fehérjéket csak néhány, teljes átalakulással fejlődő rovarban sikerült azonosítani, más szervezetekben nem. A homológ szekvenciák összerendezésével öt szigorúan konzervált régió tűnik ki. Az első két régió egymással nagyfokú hasonlóságot mutat, akár önálló domének is lehetnek. A fehérje másodlagos szerkezetére vonatkozó szerkezeti predikciót, mely szerint az első két konzervált motívum α -helikális szerkezetű, CD spektroszkópiai mérésekkel is alátámasztottuk. A fehérje DNS-kötő képességét fluoreszcens mérésekkel igazoltuk. Az UDE enzimaktivitása egyéb DNS-bontó enzimekkel szemben nem igényli kétértékű féminok jelenlétét, enzimaktivitása EDTA mellett is megfigyelhető. A konzervált régiókban több konzervált triptofán, tirozin, fenil-alanin, lizin, arginin található melyeknek fontos szerepük lehet a DNS-kötésben, illetve az uracil felismerésben. Így limitált proteolízissel az enzim aktivitásában fontos szerepet betöltő doméneket és motívumokat próbáltunk azonosítani.

P-68 A transzkripciós szabályozás vizsgálata bioinformatikai módszerekkel – a DoOP adatbázis és a doopsearch keresőoldal

Sebestyén E., Nagy T., Pályi T., Szemes Á., Molnár J., Tóth G., Barta E.

MBK, Bioinformatikai Csoport, Gödöllő

Az egészségügyileg, mezőgazdaságilag vagy éppen biológiailag (modell-szervezetek) fontos fajok teljes genomsekvenciájának meghatározásában érdekes, új kihívás a gének szabályozó régióinak, promótereinek vizsgálata.

ta. Az egyes gének vagy közösen szabályozott géncsoportok promóter régióinak hagyományos (pl. statisztikai) bioinformatikai módszerekkel történő elemzése a magasabbrendű eukarióta szervezetekben nem hozott értékelhető eredményt, ezért egyre több figyelem fordul az ortológ gének promóter régióinak az összehasonlítására. Csoportunkban kifejlesztettünk egy módszert, melynek segítségével az egyes gének annotált első exonjainak a szekvenciáját felhasználva BLAST programmal keressük meg az ortológ első exonokat egy-egy speciális genomialis DNS-adatbankban. Ezután az ortológ első exonok előtti 500, 1000 és 3000 bp hosszú DNS-szakaszokat tekintjük promóter régióknak, és helyezük el géneinként a DoOP adatbázisba. Ezt a folyamatot elvégezzük a humán és az *Arabidopsis* teljesgenom-annotáció alapján is. Az ortológ promóter szekvenciák alapján meghatároztuk, hogy egyes gének promóter régióiban mely DNS-szakaszok konzerválódtak a különböző fajok között. E motívumokat kigyűjtve meghatároztuk a konszenzusszekvenciájukat. Kifejlesztettünk egy programot (MOFEXT), amellyel keresni lehet az előzőek szerint kapott motívum konszenzusszekvencia gyűjteményekben. Létrehoztunk egy weboldalt is (<http://doopsearch.abc.hu/>), ahol a MOFEXT programmal lehet keresni a DoOP adatbázisból származó különböző motívumgyűjteményekben. A MOFEXT program lehetőséget ad, hogy megkeressük egy adott, akár kísérleti módszerekkel igazolt, transzkripció faktor kötőhelyhez hasonló konszenzuszmotívumokat az adatbázisból, és ezzel potenciálisan együtt kifejeződő géneket találunk. Ezt a módszert alkalmaztuk, hogy közös konzerválódott motívumokat keressünk egyrészt a különböző porc- és kötőszövet-specifikus géneknél, valamint egyes magreceptorcsaládoknál.

P-69 MG-132 jelátviteli és morfológiai hatásai patkányfeokromocitoma-tenyészetekben

Stark B., Berta G., Tarjányi O., Harci A., Varga J., ifj. Sétáló Gy., Szeberényi J. PTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs

Az idegsejt-differenciáció tanulmányozásának elterjedt modellrendszer a PC12-sejtvonal. Néhánynapos NGF-kezelés során e sejtek szimpatikus neuronokhoz hasonló alakokká differenciálódnak. Irodalmi adatokból ismert, hogy ezt a differenciálódási folyamatot más anyagok is képesek létrehozni. Ilyen az MG-132 nevű tripeptid, aldehidtermészetű anyag, amely kollagénezett felületen növekvő PC12-kultúrákra proteaszómagátló hatást fejt ki. Ez a vegyület, hasonlóan az NGF-hez, előidéz a neuritnövekedés előfeltételének tartott, időben elhúzódó kinetikájú ERK1- és ERK2-aktivációt is. Ahhoz, hogy a stimulált sejteink idegsejteké differenciálódjanak, az ERK izoformáknak be kell jutniuk a sejtmagba, hogy a génextpressziót befolyásolni tudják. Kísérleteinkben az MG-132 által előidézett ERK-aktivációt vizsgáltuk, különös tekintettel az aktivált enzim elhelyezkedésére, műanyagon tenyésztett sejtekben. Indirekt immunocitokémia segítségével megfigyeltük, hogy az ERK1 és ERK2 nukleáris transzlokációja MG-132-kezelés hatására megtörténik, az aktivált sejtek azonban nem differenciálódnak számottevően. Hosszabb proteaszómagátló kezelésre pedig már a sejthalál jeleit is megfigyeltük a tenyészetekben. Feltételeztük továbbá az integrin-jelátviteli szerepét, ezért az ERK-aktivációt, -transzlokációt, illetve a sejtdifferenciációt vizsgálva összehasonlítottuk kollagénezett, illetve műanyagfelszínen tenyésztett MG-132-vel kezelt PC12-sejteinket. Az immunfluoreszcens sejtpreparátumok képeit konfokális mikroszkóppal rögzítettük. Az irodalmi adatok és megfigyeléseink tükrében tehát az aktivált ERK1 és ERK2 sejtmagban történő felhalmozódása szükséges, de nem elégséges feltétele a PC12-sejtek idegsejteké történő differenciálódásának. A tartósan elhúzódó proteaszómagátlás során pedig az MG-132 hatása toxikus irányba látszik eltolódnia.

P-70 Egyszálú, stabil α -helikális elemek keresése és szerkezeti jellemzésük

Süveges D.¹, Tóth G.², Hetényi Cs.¹, Gáspári Z.³, Perczel A.², Nyitray L.¹ ELTE¹ Biokémiai Tanszék, ² Szerveskémiai Tanszék, ³ MBK, Gödöllő

A VI-os osztályba tartozó, nem konvencionális miozin [Swiss-prot id.: Q9UM54] különleges motorfehérje, mely az aktin filamentum mínusz vége felé mozog. A motor- és a kargó-kötésért felelős farokdomén között található rudrészt szerkezetpredikciók alapján *coiled-coil*t képezve dimerizálja a molekulát. CD és NMR spektroszkópiái, valamint kémiai keresztvetési vizsgálataink azonban bebizonyították, hogy a Glu916-tól Arg981-ig tartó különleges, töltött aminosav-mintázatot tartalmazó szakasz a predikciókkal ellentétben egyszálú α -hélixet alkot. Ezt, a kísérletes megközelítés mellett, molekuladinamikai szimulációk is alátámasztják. A szerkezet kialakításáért a négyesével alternáló, pozitívan és negatívan töltött aminosavak között kialakuló sóhidak stabilizáló hatása a felelős. Annak eldöntésére, hogy hasonló mintázat előfordul-e más fehérjékben,

egy programot írtunk, mely a teljes Swiss-Prot adatbázisban ilyen mintázatot tartalmazó szekvenciákat keresett. Magas pontértéket kapott egy másik nem konvencionális miozin (miozin X), a kaldezon, a kalretikulín, a troponin-T egyik izoformája, a GPC60 (egy Golgi-specifikus fehérje), az IF2 translációs iniciációs faktor – összesen kb. 30 fehérje. Közös a fenti fehérjékben, hogy térszerkezeti információ egyikről sem áll rendelkezésünkre. Néhány kiválasztott szekvenciát heterológ rendszerben expresszáltunk, és spektroszkópiai módszerekkel vizsgáljuk őket. Az egyszálú stabil α -hélix (SAH) feltételezésünk szerint egy eddig kevésbé tanulmányozott fehérjeszerkezeti motívumot képvisel.

P-71 A molekuláris csuklók működésének vizsgálata irányított mutagenézissel humán 3-foszfogllicerát kinázon (PGK)

Szabó J., Flachner B., Varga A., Závodszy P., Vas M. MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A PGK két doménből felépülő, monomer enzim. A glikolízisben az 1,3-biszfoszfogllicerát savanhidridkötésben lévő foszfocsoportjának MgADP-re történő átvitelét katalizálja, melynek során 3-foszfogllicerát és MgATP keletkezik. A foszfortranszfer végbemeneteléhez a szubsztrátumoknak térközébe kell kerülniük, ezt a doménzáródás biztosítja. Különböző röntgenkristallográfiás szerkezetek molekuláris grafikai összehasonlítása alapján kiderült, hogy a domének közötti régióban elhelyezkedő β L képezi a PGK fő csuklórégióját, mely a 7-es hélix végeinél lévő csuklórégiókat is irányíthatja. A doménzáródás molekuláris szintű mechanizmusának felderítése céljából irányított mutagenézissel előállítottuk az S398A, az E192A, az N336D és az N336A mutánsokat. Az S398, bár konzervatív aminosav a β L redőben, nem ennek van döntő szerepe a csukló működésében, ugyanis mutációja nem befolyásolta lényegesen az enzim működését. A 7-es hélixben lévő E192 mutációja információt adott a β L és a 7-es hélix végeinél lévő csuklók kapcsolatáról. Ezen oldalláncnak szerepe van az egész molekula konformációs stabilitásában, és közvetve pedig az enzimnek a 3-PG szubsztráttal való kölcsönhatásában is. Az N336 a nukleotid-kötőhelyen helyezkedik el. Mutációja bebizonyította, hogy ezen oldalláncnak alapvető szerepe van a nukleotid szubsztrát-hatásának a β L fő csuklórégióhoz való közvetítésében. Az aktivitás nagyságrendekkel való csökkenése valószínűsíti, hogy a doménzáródás ezen oldallánc mutánsai esetében nem következik be.

P-72 A sumoilált PCNA szerepe a DNS-replikációban és -reparációban

Szúcsó V., Pintér L., Burkovics P., Unk I., Haracska L. MTA SZBK, Genetika Intézet, Szeged

A DNS-szintézis során a replikációt végző DNS polimeráz megakad a DNS-hibáknál, ez a replikációs villa blokkját okozza, ami ha hosszan elhúzódik, a sejt apoptózist indukálja, ezért a sejt túlélése szempontjából esszenciális a replikáció továbbhaladása a károsodott DNS-en keresztül. A sérült nukleotidokkal szembeni DNS-szintézisre a közelmúltban felfedezett transzleziós (TLS) DNS polimerázok képesek. Az egyik legalapvetőbb kérdés, hogy pontosan milyen mechanizmus vezet a replikatív polimeráz és a TLS polimeráz cseréjéhez, ez idáig megválaszolatlan. A közös pont a kétféle polimeráz működésében, hogy mindkettő a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) fehérjével kapcsolódva fejti ki hatását. A PCNA homotrimer, gyűrű alakú molekula, melyet a DNS polimeráz- α processzívítási faktoraként írtak le. Mivel mind a TLS polimerázok, mind a replikatív polimerázok a PCNA-hez kapcsolódva működnek, korán kialakult az irodalomban az a modell, amely szerint a replikatív és a TLS polimeráz működésének szabályozása a PCNA-n keresztül valósul meg. A modell vizsgálata során kimutatták, hogy a PCNA fehérjének *in vivo* két jelentős másodlagos módosítása fordul elő: az ubiquitilált és a sumoilált forma. Genetikai vizsgálatok eredményei arra engedtek következtetni, hogy a TLS polimerázok működésének aktiválásában elsősorban az ubiquitilált PCNA-nek van szerepe, ezért az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok elsősorban az PCNA ubiquitilációjának vizsgálatára koncentráltak. Bár mind az ubiquitin mind a SUMO a PCNA ugyanazon aminosavához (K164) kapcsolódik, a sumoilált PCNA szerepét eddig nem vizsgálták. Munkánkban célul tűztük ki a PCNA *in vitro* sumoilációját. A sumoilált PCNA *in vitro* vizsgálata DNS polimeráz kísérletekben, valamint a SUMO módosítás fizikai kölcsönhatásokat befolyásoló szerepének vizsgálata reményeink szerint közelebb visz ennek az esszenciális DNS-reparációs folyamatnak, a polimerázcsere jelenségének a jobb megértéséhez.

P-73 A trimer dUTPáz kialakulásának rejtélye

Takács E., Békési A., Vértessy G. B. MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz enzim fontos szerepet játszik a nukleotid-metabolizmusban, ugyanis biztosítja a sejten belül a helyes dUTP/dTTP-arányt. Hiánya esetén nagy mennyiségű uracil épül be a szintetizálódó DNS-be, ami a javítómechanizmus működésének következtében a kromoszóma töredéséhez és a sejt halálához vezethet. A legtöbb dUTPáz homotrimer enzim, amelynek három szerkezetiileg megkülönböztethető aktív centruma az alegységek közti részen helyezkedik el. A C-terminális karok a szomszédos alegység aktív centruma felé hajlanak. A karok csuklópontjában egy-egy konzervált prolin helyezkedik el, amely a merev térbeli geometriája miatt kifeszítheti a kart, elősegítve ezzel az alegységek megfelelő egymáshoz rendeződését. Kimutatjuk, hogy a prolin nem nélkülözhetetlen a megfelelő oligomerizációhoz, de hiányában lecsökken az enzim stabilitása és aktivitása. Mostanáig a dUTPáz kölcsönható partnereiről szinte semmit sem tudunk. Csoportunkban azonban sikerült néhány potenciális fehérjét kihalászni, melyek között szerepel a HSC70 hő sokkfehérje is, amely stresszmentes körülmények közt is számos sejtbenli folyamatban játszik szerepet. A két fehérje közt létrejövő kötés igazolására több egymástól független módszert alkalmaztunk. Felületi-plazmon-rezonanciás kísérletek alátámasztják a két fehérje ligandumfüggő kölcsönhatását.

P-74 A poli-(ADP-ribóz) polimeráz funkcionális gátlása siRNS technikával

Tapodi A.¹, Hantó K.^{1,2}, Solti I.¹, Szabó A.¹, Várbíró G.¹, ifj. Gallyas F.¹, Hidég K.³, Sümegi B.¹

PTE, ÁOK, ¹ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, ² I. sz. Belgyógyászati Klinika, ³ Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Pécs

A klasszikus nézet szerint oxidatív stresszben a poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) gátlószereinek citoprotektív hatását az okozza, hogy meggátolják a sejt NAD⁺- vagy ATP-deplációját, s így a nekrozist. Kérdéses volt azonban, vajon a PARP-1-gátló gyógyszerek is a sejtmagi PARP-1 aktivitásának visszaszorításával, vagy más mechanizmus szerint fejtik-e ki citoprotektív hatásukat. E kérdés tisztázására részint a PARP enzimet gátlószerekkel, részint a PARP-1 génj kifejeződését – siRNS vagy a fehérje N-terminális DNS-kötő doménjének (PARP-DBD) transzdomináns túlexpresszállása segítségével – sejt kultúrában gátoltuk. Mínt hogy korábbi, inflammációs modellben mért adataink arra utaltak, hogy a PARP katalizálta ADP-ribózilálás hatást gyakorol jelátadási folyamatokra, ami jelentős szerephez juthat a citoprotekcióban, a sejtek túlélésében, a PI-3-kináz-Akt rendszer aktiválásán és a mitokondriális membránpotenciál fenntartásán vizsgáltuk H₂O₂-kezelt WRL68 sejtekben. Adataink azt mutatták, hogy az egyes szálú DNS törése által indukált PARP-aktiválódás gyógyszeres kezeléssel, siRNS segítségével vagy a PARP-DBD túlexpressziójával történő visszaszorítása egyaránt védő hatást gyakorolt a sejtre oxidatív stresszben, és indukálta az Akt aktiválódását és foszforilációját. Az Akt-aktiválás PI-3-kinázalal történő gátlása hatástalanította a PARP-gátlás citoprotektív jellegét. A mikroszkópos vizsgálatok szerint a PARP-gátlás kiváltotta Akt-aktiválódás a felelős az oxidatív stresszben mutatkozó mitokondriumvédő hatásért, mivel PI-3-kináz-gátlók megakadályozták a PARP-gátlás védő szerepét. Src-kináz-gátlók – melyek csökkentik az Akt-foszforilációt – szintén a membránpotenciált védelme ellen hatottak, ezzel is az Akt citoprotekcióban játszott döntő szerepére utalva.

P-75 Proteasómagátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PP1, PP2) neuronális differenciációt befolyásoló hatásainak vizsgálata PC12-sejtekben

Tarjányi O., Stark B., Berta G., Harci A., Varga J., ifj. Sétáló Gy., Szeberényi J. PTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Pécs

Kísérleteinkben az idegsejt differenciáció kutatásban széles körben elterjedt PC12, patkányfeokromocitoma-sejteket használtuk. Ezek a sejtek *in vitro* idegi növekedési faktoros (NGF) kezelés hatására nyúlványokat növesztenek, és szimpatikus neuronokhoz válnak hasonlóvá. Ez a folyamat előidézhető egy peptidilaldehid típusú proteasómagátló vegyület, az MG-132 alkalmazásával is. A PC12-sejtek differenciációjának szükséges előfeltétele az extracelluláris szignálregulált kináz (ERK) időben elhúzódó aktivációja és nukleáris transzlokációja, ami proteasómagátló kezelést követően is megfigyelhető, az ERK-en kívül azonban a Src-kináz foszforilációjának is fontos szerep juthat az ilyen típusú differenciáció előidézésében. Az aktivált Src – ellentétben az ERK-vel – nem jut be a sejt-magba, hanem a citoplazmában marad MG-132-kezelés esetén. A neuronális differenciáció alakulását Src-inhibitorok (PP1, PP2) NGF-fel, illetve MG-132-vel történő együttes alkalmazásakor is vizsgáltuk. Ilyen körülmények mellett a Src kináz foszforilációja kisebb mértékűnek bizonyult, mint Src-inhibitor nélkül. A Src-aktiváció kulcsfontosságú

szerepét mutatja az is, hogy előkezelést követően a PC12-sejtek differenciációja elmaradt. MG-132-kezelés hatására az aktív Src lebontása az ubikvitin-proteasóma úton keresztül gátolt, így a sejtekben a foszforilált Src mennyisége növekszik, ami valószínűleg a PC12-sejtek neuronális differenciációjának egyik szükséges komponense.

P-76 A szöveti transzglutamináz fagocitózisban betöltött szerepének vizsgálata

Tóth B.¹, D. Aeschlimann², Fésüs L.¹, Szondy Zs.¹

¹ DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; ² Matrix Biology and Tissue Repair Research Unit, Dental School, Cardiff Univ., Cradiff, UK

Az apoptotikus sejtek gyors és hatékony eltávolítása kritikus szerepet játszik a másodlagos nekrozis és gyulladásos folyamatok megelőzésében. Ebben az eltakarítási folyamatban központi szerepet játszanak a professzionális fagociták, a makrofágok. Az elhalt sejtek fagocitózisa a makrofágok citoszkeletonjának átrendeződésével jár. A Rho-fehérje-családhoz tartozó GTPázok (Rho, Rac, Cdc42) részt vesznek a citoszkeleton szerkezeti változásának szabályozásában. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a szöveti transzglutamináz-hiányos egerekben (TG2^{-/-}) az apoptotikus sejtek eltávolításának hatékonysága csökkent mértékű. A munkám során beállított *in vitro* fagocitózismodell alapján bebizonyosodott, hogy a TG2-hiányos egerekből származó peritoneális makrofágok *in vitro* körülmények között is kisebb hatékonysággal veszik fel az apoptotikus sejteket, és ehhez a makrofágok abnormális citoskeletális szerkezete és eltérő Rac-aktivációja is társul. Mivel a szöveti transzglutamináz (TG2) multifunkcionális enzim, amely rendelkezik Ca²⁺-függő keresztkötő és GTPáz aktivitással, keressük a választ, hogy az enzim mely funkciója játszik szerepet az eltérő fagocitózis hatékonyságért, illetve milyen jelátviteli események felelősek a megváltozott Rac-aktivációért. Keresztkötő és GTP-kötő TG2-mutánsokkal szeretnénk vizsgálni, hogy a TG2 a fagocitózis jelátviteli folyamataiban vagy a lejátszódó citoskeletális történésekben vesz-e részt. Ezeket a mutansokat adenovirális géntranszporttal szeretnénk bejuttatni TG2^{-/-} peritoneális makrofágokba, és vizsgálni a fertőzött makrofágok fagocitózis-hatékonyságát.

P-77 A blebbistatinspecifikus miozin II ATPáz gátló hatásmechanizmusa

Tóth J.^{1,2}, Hetényi Cs.¹, Málnási-Csizmadia A.¹, J. R. Sellers², Kovács M.^{1,2}

¹ ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest; ² National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

A blebbistatin az egyetlen ismert nagy affinitású és miozin II-re szelektív inhibitor, amelyet egy kémiai könyvtárból választottak ki a citokinézist és sejt-„blebbinget” gátló hatása alapján. Oldatkinetikai és *in silico* szerkezeti módszerekkel megvizsgáltuk az inhibitor részletes hatásmechanizmusát. A blebbistatin nem verseng a miozin ATP kötésével, hanem egy olyan közti termékhez kötődik, amely a hidrolízislépés után még tartalmazza az ADP-t és a Pi-t is. Stabilizálja a miozin-ADP.Pi komplexet, amelyből így a Pi felszabadulása lassú. Ez a blebbistatin ATPáz gátló hatásának legfontosabb momentuma. Nem interferál sem a miozin aktinkötésével, sem az ATP-indukált aktomiozindisszociációval. Az általa stabilizált intermedier alacsony aktinaffinitású, ezért a blebbistatinnal gátolt állapot nem okoz rigor aktomiozin-keresztkötést. Ez teszi a blebbistatint a sejtbiológiában felhasználhatóvá a II-es miozinok sejtbeli funkciójának kísérletes felderítésében. Az általunk elvégzett *blind* dokkolásos szimulációk szerint a blebbistatin egy vízzel telt mélyedésben helyezkedik el a miozinon a nukleotidkötő zseb és az aktomiozinhasíték között. Ez a perditált kötőhely jó egyezést mutat egy későbbi kristályszerkezettel. A blebbistatin hatásmechanizmusa kedvező kísérleti feltételeket tesz lehetővé az izomfiziológia, sejtbiológia és szerkezeti biokémia területein.

P-78 A protein belső viszkozitásának hatása a konformációs átmenetek sebességére

Tóth J., Gombos L., Simon Z., Medveczky P., Gráf L., Málnási-Csizmadia A.

¹ ELTE, TTK, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest

Az enzimek tervezésének egyik fontos elméleti alapja, hogy milyen fizikai paraméterek határozzák meg a konformációs átmenetek sebességét. A reakciók sebességi állandójának hőmérsékletfüggését az Arrhenius-egyenlet írja le, amely egy exponenciális és egy preexponenciális tagra bontható fel. Az utóbbi tartalmaz egy viszkozitásjellegű paramétert, amely feltételezhetően tovább tagolható külső (a reakcióközeg tulajdonsága) és belső viszkozításra (a fehérje jellemzője). A humán tripszin 4 enzimen és ennek R193G/A/F/Y mutánsain a pH-ugrással előidézett aktiváció során bekövetkező elsőrendű konformációs átmenetet vizsgál-

tuk. A G193-as pozíció az egyik csuklóregió a konformációváltozás során, ezért feltételeztük, hogy a csukló „rigiditásának” növelésével a reakciósebesség csökken. A reakciósebesség hőmérsékletfüggését az általunk fejlesztett hőgráns *stopped flow* készülékkel széles hőmérsékleti tartományban vizsgáltuk. Eredményeink alapján a pontmutációk nincsenek hatással a reakció aktiválási energiájára (exponenciális tag), viszont erősen befolyásolják a preexponenciális tagot. Két mutánson megmértük a reakció sebességi állandójának viszkozitásfüggését is, melynek extrapolációjával meghatároztuk ezen proteineknek az erre az átmenetre vonatkozó belső viszkozitását. Kísérleteink bizonyították, hogy pontmutációkkal specifikusan szabályozni lehet a konformációs átmenetek sebességét meghatározó preexponenciális tagot a protein belső súrlódásának (friction) megváltoztatásával.

P-79 Az RAR α ligálása fokozza a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és elősegíti a glükokortikoidreceptor mediálta transzkripció folyamatokat

Tóth K.¹, Buslig J.², Fésüs L.¹, Szondy Zs.¹
 DE, OEC, *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet*, ¹ MTA Apoptózis és Jelátviteli Kutatócsoport, ² Genomika Központ, Debrecen

A T-sejt-receptor indukciója mellett a glükokortikoidok a T-sejtek leghatásosabb sejthalál-induktorai. A sejthalált döntően a magba transzlokálódó glükokortikoid-receptoron keresztül váltják ki, új sejthalálgének indukcióján keresztül. Az egyik ilyen gén a glükokortikoid indukálta leucinzipár transzkripció faktor (GILZ). Korábbi kísérleteinkben bemutattuk, hogy az A-vitamin származékai, a retinsavak, számos ponton befolyásolják a T-sejtek sejthalálprogramját, többek között fokozzák a glükokortikoidok által indukált sejthalálást is. Kísérleteinkben bemutattuk, hogy a glükokortikoidok által indukált sejthalál fokozásában az RAR α -receptor vesz részt. A receptor ligált állapotban a ligált glükokortikoid-receptorhoz kötődik, és fokozza annak transzkripció aktivitását. Ennek eredményeként a sejthalál sebessége a glükokortikoidok telítési koncentrációjánál is fokozódik. A retinoidok glükokortikoid-érzékeny sejtvonalak apoptózist is fokozták, jelezve, hogy felhasználhatók lehetnek T-sejt-eredetű rosszindulatú daganatok kezelésében is. (OTKA 038069, T 022705, T 029528, ETT 100/2003)

P-80 Autoimmun limfoproliferatív szindróma (ALPS) diagnosztikus megerősítése és molekuláris biológiai hátterének feliderítésére kidolgozott teszt

Tóth R.¹, Szondy Zs.¹, Maródi L.²
 DE, OEC, ¹ *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet*, ² *Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék, Debrecen*

Az autoimmun lymphoproliferatív szindróma (ALPS) ritka, gyermekkorban jelentkező betegség, klinikailag lymphoproliferáció, lymphadenopathia és splenomegalia, valamint autoimmun folyamatok jellemzik. Emellett a betegek fogékonyabbak malignus kórképekre, elsősorban lymphomákra. A benignus lymphoproliferáció, a perifériás vérben keringő nagyszámú és arányú (> 1%) éretlen kettős negatív (CD4-CD8-) α/β T-sejt, és az autoimmun jelenségek jelenléte az apoptózis elmaradásának következménye. A betegség lényege, hogy a T-limfociták aktiváció indukálta sejthalála (AICD) apoptózisa elmarad. Az AICD szerepe, hogy az antigénre adott válasz befejező szakaszában elpusztítsa a már feleslegessé vált, potenciálisan veszélyes aktivált T-sejtet. Az AICD-t a TNF receptorcsaládba tartozó sejthalálreceptorok (Fas/CD95, TNFR, DR4, DR5), illetve ezek megfelelő ligandumai (FasL/CD95L, TNF α , TRAIL) közvetítik. Az ALPS pathogenetikai hátterében eddigi ismereteink szerint a Fas-közvetítette apoptózist szabályozó gének valamelyikének hibája áll. Négy csoportot különböztetünk meg az ALPS-on belül: ALPS Ia: Fas gén mutációja, Fas (CD95) vagy nem expresszálódik, vagy olyan mutáció következik be, amely gátolja a receptor funkcióját. ALPS Ib: FasL gén hibája. ALPS II: kaszpáz-10 gén hibája. ALPS III: pontos mutáció még nem ismert, feltehetően egyéb halálreceptorok vagy apoptózis jelátviteli út fehérjéinek génei hibásak. Intézetünkben az ALPS diagnosztikus megerősítő tesztet dolgoztunk ki. A tesztet perifériás limfocitákon végezzük egy 6-napos tenyésztési periódus alatt, amely mimikálja a szervezetben egy antigénre adott immuválasz során a T-sejtekben lejárvó változásokat. MÉRJÜK a Fas és FasL alap- illetve T-sejt-receptoron keresztüli aktiváció hatására indukálódott sejtfelszíni expresszióját, illetve ezek működőképességét funkcionális teszteken. Továbbá vizsgáljuk az apoptózis érzékenységet. A tesztek áramlási citometriás mérések alapulnak. Eddigiekben mintegy 13 ALPS-os betegen, 11 hozzátartozón, 15 egészséges személyen végeztük el a vizsgálatokat, ahol több esetben sikerült alátámasztani a diagnosztikus vizsgált paraméterekre kapott abnormális értékket.

P-81 Kooperativitás a humán dUTPáz homotrimerben
Varga B.¹, Barabás O.¹, Málnási-Csizmadia A.², Tölgyesi F.³, Vértessy G. B.¹
¹ MTA SZBK, *Enzimológia Intézet, Budapest*; ² ELTE, *Biokémia Tanszék, Budapest*; ³ SE, *Biofizika és Radiobiológia Intézet, Budapest*

A dUTPáz a dUTP hidrolízist katalizálja. Az enzim hiányában kialakuló magas dUTP/dTTP-arány uraciltartalmú DNS-t eredményez, ami kromoszómafragmentálódáshoz vezet (timinmentes sejthalál). Létrehoztunk egy hatékony túltermeltetési rendszert a humán enzim nukleáris izoformájának előállítására. A limitált tripszinolízis, és differenciális pászttázó mikrokolimeretriás mérések azt mutatták, hogy a humán dUTPáz kevésbé rendezett és flexibilisebb, mint a prokarióta enzim. Más szerkezeti (nukleotidkötődés, izotermális kalorimetria, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia és egyéb spektroszkópiai módszerek), köztük a fehérje nagy felbontású, 3D kristályszerkezetének megoldása és kinetikai vizsgálatok, nagy eltéréseket mutattak ki a humán enzim aktív helyeinek szerkezetében az *E. coli* dUTPázhoz képest. Úgy tűnik, a humán dUTPáz három aktív helye egymástól nem független módon működik. Jelenleg azt a hipotézist vizsgáljuk, hogy mi a szerepe az allosztériának az enzim fiziológiás működésében.

P-82 A transzglutamináz 2 coeliákiaepitópjainak vizsgálata
Vecsei Zs.¹, Király R.^{1,2}, Bagossi P.¹, Korponay-Szabó I.³, Fésüs L.^{1,2}
 DE, OEC, ¹ *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet*, ² MTA Apoptózis és Jelátviteli Kutatócsoport, ³ *Gyermekklinika, Debrecen*

A szöveti transzglutamináz (TG2) meghatározó szerepet játszik a coeliakia patomechanizmusában, mint a legfontosabb autoantigén. Eddigi adatok alapján feltételezhető, hogy a TG-specifikus, coeliakiás antitestek nagy része konformációs epitópok ellen termelődik, valamint hogy az enzim N- és C-terminális részén találhatóak a fő epitópok. Ezen kívül egy 237 aminosav hosszú, antigénként funkcionáló szakaszt is azonosítottak a mag (core) doménen. Célul tűztük ki, hogy korábbi mérési- és irodalmi adatok alapján számítógépes modellezéssel azonosítsunk bizonyos, a domináns epitóp felépítésében szerepet játszható aminosavakat, majd mutagenézissel megváltoztassuk ezeket. Kísérleteinkben ezen mutációkat tartalmazó TG-k és coeliakiás szérumminták közötti kölcsönhatást vizsgáltuk hagyományos anti-TG ELISA módszerrel, valamint fibronectin-kötött TG felhasználásával (FBN-TG ELISA). Az egyes enzimmutások különböző aminosavcsereket tartalmaznak az I., illetve II. (core) doménen, valamint deléciókat a molekula C-terminálisán. A hagyományos anti-TG ELISA-ban a coeliakiás antitestek csökkent kötődést mutattak az egyszerűs mutánsokhoz, amelyek vagy az I., vagy a II. doménen tartalmazták a mutációt (56-80%, ha a kötődés a vad típushoz 100%). Amikor a tervezett aminosavcserek egyszerre mindkét doménen szerepeltek (dupla mutáns), a kötődés mértéke tovább csökkent (20%). A dupla mutációt tartalmazó TG utolsó 39 aminosavának levágásával további csökkent kötődést tapasztaltunk (9%). Hasonló eredményre jutottunk, amikor az antitestek kötődését a FBN-TG ELISA rendszerben vizsgáltuk, a dupla mutáns C-terminálisának levágásával a kötődés 25%-ra csökkent (a CUB7402, monoklonális anti-TG antitest, kötődésére vonatkoztatva, vad típus 100%). A kísérleteinkben vizsgált coeliakiás antitestek közel azonos kötődési mintázatot mutattak, így valószínűsíthető, hogy egy domináns epitóp létezik. Ezen konformációs epitóp felépítésében szerepet játszanak az enzim I., II., illetve IV. doménjén található, egymáshoz viszonylag közel található aminosavak is.

P-83 4-Hidroxi-kinazolin hatása a cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozásokra

Vető S.¹, Ács P.², Berente Z.¹, Solti I.¹, Tucek Zs.¹, Németh V.¹, Bognár E.¹, ifj. Gallyas F.¹, Komoly S.²

PTE, ÁOK, ¹ Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet; ² Neurológiai Klinika, Pécs
 A degeneratív SM (sclerosis multiplex) modellje a cuprizone indukálta demielinizáció. A cuprizone per os adagolva egér központi idegrendszerében (legkifejezettebben a corpus callosumba és a pedunculus cerebelli superiorban) primer oligodendrocyta-degenerációt, oedemat és hydrocephalust okoz. Korábbi kísérletekben a hydrocephalus mértékét tudták csökkenteni, de az oligodendrocyta pusztulást nem tudták megakadályozni, így jelen kísérleteinkben a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz- (PARP) gátlók hatását vizsgáltuk meg ezen a modellen. Kísérletünkben csoportonként 4 (a kísérlet kezdetekor 8-9 hetes) C57BL/6 hím egérrel dolgoztunk. Az egerekről altatásban a harmadik kísérleti héttől minden héten MRI készült a 6. hétig; T1 és T2 súlyozott 1 mm frontális szeletek a bulbus olfactoriustól a gerincvelő kezdeti szakaszáig, 6 hét kezelés után transzcardialis 4% paraformaldehidet perfundálás és fixálás történt, mely után szövettani vizsgálatot végeztünk HE, Luxol fast blue festéssel és gliaesztüözéssel. A cuprizone-kezelés hatására már a 3. héten hydrocephalust

tapasztaltunk, amely a 6. hétig egyre fokozódott, továbbá, a 6. hétre kifejezett demielinizáció is megfigyelhető volt. A demielinizációt szövettani festésekkel is igazoltuk. A PARP-gátló 4-hidroxi-kinazolin gyakorlatilag eltörölte ezeket a változásokat. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PARP-gátlók a sclerosis multiplex kezelésében is jelentős, sőt áttörő szerephez juthatnak.

P-84 Toxinok hatása az aktinfilamentumok dinamikai és konformációs tulajdonságaira

Visegrády B., Hild, G., Somogyi B., Lőrinczy D., Nyitrai M.
PTE, ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs

A daganatos betegségek terápiás eljárásainak kidolgozásában fontos szerepet játszanak olyan hatóanyagok, amelyek a citoskeletonra fejtik ki hatásukat. A kutatások során számos esetben alkalmas modellrendszernek bizonyultak az aktinkötő toxinok. Vizsgálatainkban azt tanulmányoztuk, hogy milyen hatást gyakorol a falloidin és a jaspalakinolid – két toxikus hexapeptid – az aktinfilamentumok konformációs tulajdonságaira. Mind fluoreszcencia spektroszkópiai, mind kalorimetriás eredményeink azt mutatták, hogy a két toxin hatására az aktinfilamentumok hőstabilitása megnőtt, a szerkezetük merevebbé vált. A két toxin hatásában ugyanakkor eltéréseket is megfigyeltünk, amennyiben a jaspalakinolid stabilizáló hatása erősebb volt, mint a falloidiné. Mind a két toxin allosztérikus kölcsönhatásokon keresztül módosította az aktinfilamentumokat. A szomszédos aktinmonomerek közötti kölcsönhatások minőségének a jellemzésére kidolgoztunk egy matematika modellét, s alkalmazásával megmutattuk, hogy míg a falloidin esetében egyetlen toxinmolekula 7 aktinprotomer konformációs állapotát befolyásolta, a jaspalakinolid esetében az allosztérikus kölcsönhatások 13 monomerre terjedtek ki.

P-85 Matematikai modell a cirkadián óra és a sejtciklus kapcsolatának vizsgálatára

Zámborszky J.¹, C. I. Hong², Csikász-Nagy A.¹

¹ BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék és BME-MTA Molekuláris Hálózatok Dinamikája Kutatócsoport, Budapest; ² Dept. of Genetics, Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA

Szinte minden élőlényre hat a nappalok és az éjjelek váltakozása. Számos molekula aktivitása/szintje fluktuál e napi ritmus szerint. Azonban állandó körülmények között is megfigyelhetőek – a belső cirkadián óra által indukált – oszcillációk. Periodikus külső fény, hőmérséklet-ingadozások állítják be ezt a belső oszcillátort a Föld forgásának megfelelő 24-órás periódusra. Másik meghatározó, sejten belüli molekuláris oszcillátor a sejtciklus-szabályzó hálózat motorja. A két rendszer kapcsolatát már a 70-es évek óta próbálják felderíteni, azonban molekuláris részleteit emlőssejtekben csak pár éve fedezték fel. Eredményeiket figyelembe véve elkészítettünk egy matematikai modellt, mely tartalmazza az emlős-sejtciklusszabályzó hálózat részletes, továbbfejlesztett modelljét, és egy egyszerűsített cirkadiánóra-szabályzó modult. A kapott differenciálegyenlet-rendszer új paramétereit optimalizáltuk, és a modellt számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk. Különböző erősségű kapcsoltság a két oszcillátor között más eredményeket adott. Erős kapcsoltságnál ún. módusszinkronizáció lép fel, azaz a sejtciklus hossza és a cirkadián óra a legkisebb közös többszörösüknél összehangolódik. Sztochasztikus szimulációkkal vizsgáltuk a sejtciklushossz- és sejt méreteloszlásokat a különböző erősségű kapcsoltságoknál, és megfigyeltük, hogy erős kapcsoltság a legtöbb esetben nagyobb szóráshoz vezet a sejt méret és sejtciklushossz eloszlásában, kivéve, ha a sejtek tömegduplázódási ideje közel áll a cirkadián óra által diktált 24 órához. A végzett statisztikai analízis kvantált sejtciklushossz-eloszlást mutatott erős kapcsoltság esetében. Ilyen kvantált sejtciklusokat megfigyeltek élesztő- és emlőssejtekben is, de ezidáig nem tudták azonosítani molekuláris hátterüket. Matematikai analízisünk alapján feltételezzük, hogy a cirkadián óra hatása a sejtciklusra okozza ezt a viselkedést.

P-86 Immunanalitikai módszer kidolgozása vitellogenintípusú fehérjék kimutatására endokrin zavaró hatások jelzéséhez

Bukovszkaja, O.¹, Blohin, Sz.¹, Juracek J.², Fekete G.³, Adányi N.³, Székács A.²

¹ DoubleDelta Kft., Berettyóújfalu; ² MTA NKI, Budapest; ³ KÉKI, Budapest
Endokrin zavaró hatások kimutatására szolgáló immunanalitikai rendszerek kidolgozásában vitellogenintípusú fehérjét különítettünk el, hogy azokra ELISA és immunszenzor fejlesztünk. Az immunizálásokhoz a lipovitellin fehérjét (a vitellogenin előalakját) választottuk, mivel kimutattuk, hogy az immunanalízis során a lipovitellin antitestjei nagy mérték-

ben specializáltak ugyanazon faj egyedei által hordozott vitellogeninre, és a vitellogenin fehérjével 95%-os keresztreakció adnak. Immunogénként a fehérje két izoalakját ponty- (*Cyprinus carpio*) petefészekből izoláltuk. A lipovitellin extrakciós kivonásához az aktív oogenezis stádiumában pontyovarium-mintákat gyűjtöttünk, s pufferes mosás majd homogenizáció után a lipovitellint tartalmazó frakciót tömény szervenlen sók (kétféle Na-só és egy Mg-só) oldataival vontuk ki. A terméket SDS-PAGE és ioncserélő kromatográfia segítségével DEAE-cellulóz oszlopon analizáltuk, s kétkomponensűnek találtuk (174 kDa, 24,8%; 140 kDa, 75,2%). A tisztított fehérjével 25 µg/kg dózissal vadas nyulakat immunizáltunk. A immunoglobulinra tisztított vérsérumot mind versengő, immobilizált antigén-, mind pedig „szendvics”, immobilizált antitestalapú ELISA rendszerben alkalmaztuk. Amennyiben a kapott eljárással a vitellogenin mind analitikai, mind biológiai mintákban jó érzékenységgel meghatározható, az ELISA tesztet a továbbiakban békavitellogeninre (pl. *Bombinus orientalis*) is ki kívánjuk dolgozni. (NKFP 3A058-04, GVOP-3.1.1.-2004-05-0429/3.0, MikroVákuum Kft.)

P-87 Linker nélküli kismolekulából létrehozott kémiai chipek kidolgozása és alkalmazása fehérje–ligandum kölcsönhatások azonosítására

Molnár E.^{1,2}, Puskás L.^{1,2}

¹ MTA SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium, ² Avicor Kft., Szeged

A kémiai chipek létrehozásának célja, hogy a felületükön immobilizált vegyületekkel a gyógyszerkölcsönhatásra és -fejlesztésre alkalmas célfehérjéket és egyben a kölcsönható kismolekulákat azonosítsuk. A kísérleteinkben használt kémiai chip 17600 az Avicor Kft saját kémiai könyvtárából származó, nagy sűrűségben felkötött linker (távartó kar) nélküli molekulát tartalmaz egy általunk kidolgozott, elágazó láncú szerkezetet hordozó aktiváltüveg-felületen. A chipet – melynek előállítását és minőség-ellenőrzését is bemutatjuk – fluoreszcensen jelölt szerin proteázzal inkubáltuk, majd a kapott mintázat alapján szelektáltuk a fehérjével kölcsönható molekulákat, beleértve annak potenciális inhibitorait. A fals pozitív eredmények kiszűrésére a jelölt proteázát a jelöletlen formával, illetve egy a fehérje aktív centrumába kötő molekulával együtt is chipre vittük. Mindkét esetben kevesebb jelölt fehérje kötődött ki a specifikus ligandumokhoz, ezáltal a fluoreszcencia intenzitása az adott pontokban kisebb lett, mint a csak jelölt fehérjével végzett kísérletben. Az azonosított molekulák gátló tulajdonságának megerősítése folyamatban van.

P-88 Komplex biológiai minták GSH-tartalmának meghatározása ionscspadás tömegspektrometria segítségével

Németh V., Montskó G., Solti I., Vető S., Tucsek Zs., Hocsák E., Márk L.

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Közismert, hogy az eukarióta sejtekben nagy mennyiségben megtalálható glutation (GSH) az egyik legfontosabb antioxidáns redox rendszer. A GSH tripeptid (γ-glutamil-ciszteinil-glicin), mely alapvető szerepet tölt be az oxidatív gyökök elleni védekezésben. A redukált forma (GSH) képes oxidatív ágenseket semlegesíteni, miközben önmaga oxidálódik (GSSG). A oxidált formát különböző SH-enzimek regenerálják, így újra működőképes lesz. Ezek alapján a GSH pontos koncentrációjának ismerete hozzájárulhat a molekulák közti interakciók, antioxidáns folyamatok tanulmányozásához. Munkánk során egy olyan hatékony, gyors, érzékeny tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki, mely alkalmas komplett biológiai minták GSH-koncentrációjának meghatározására. Vizsgálatainkat elektro spray és atmoszferikus nyomású kémiai ionizációs technikát alkalmazó kvadrupol és ionscspadás analízissel ellátott tömegspektrométereken végeztük. Mérési eredményeink szerint a módszer által reprodukálhatóan biztosított kimutatási határ a pg tartományban van, amely jobb, mint UV detektálás esetén. A technika további előnye, hogy egyszerű mintaelőkészítést igényel, így rutinszerűen, kis költséggel elvégezhető.

P-89 Taxol hatása a mitokondriumra és a szabadgyök-képződésre

Solti I.¹, Bognár Z.¹, Németh V.¹, Bognár E.¹, Vető S.¹, Hocsák E.¹,

Nagyé Kiss Gy.¹, Szántó Á.², Várbíró G.¹, Sümei B.¹

PTE, ÁOK, ¹ Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, ² Urológiai Klinika, Pécs

Vizsgálatainkkal a mitokondrium Taxol indukálta citotoxicitásában betöltött lehetséges szerepét próbáltuk bizonyítani, ennek közvetlen mitokondriális hatásait vizsgáltuk. Percoll-gradiens izolált májmitokondriumokban a Taxol nagymértékű duzzadást indukált, koncentrációfüggő módon a mikromólos tartományban. A permeabilitástranzíciós pórus megnyílását, ezáltal a permeabilitástranzíció bekövetkeztét úgy

határoztuk meg, hogy vizsgáltuk a sértetlen membrán számára impermeábilis mátrixenzim-szubsztrátumok bejutását a mitokondriumba. A Taxol indukálta a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi$) összeomlását, amit a rodamin 123 festékfelszabadulással és a membránközi térből történő citokróm c enzimefelszabadulással határoztunk meg. Megfigyeltük, hogy mindezen hatásokat 2,5 μM cyclosporineA gátolta. A Taxol szignifikánsan növelte a reaktív oxigénradikálok (ROS) képződését mind a vizes, mind a lipidfázisban, amit dihidrorodamin 123 és rezorufinszármazék segítségével határoztunk meg. A citokróm oxidáz enzimet gátló CN₂, azid és NO megszünteti a Taxol indukálta mitokondriális ROS-képződést, míg más respirációs komplexek gátlószerei és a cyclosporineA nem hat rá. Igazoltuk, hogy a Taxol indukálta $\Delta\Psi$ összeomlása és a ROS-képződés indukciója bekövetkezik a BRL-3A sejtekben is. Végeredményben, a Taxol indukálja az AN-transzlokáz-ciklofilin komplex mediálta permeabilitás-tranzíciót és a citokróm oxidáz mediálta ROS-képződést. Mind a citokróm c felszabadulása, mind a mitokondriális ROS-képződés öngyilkos útvonulatot indukál, így a Taxol közvetlen mitokondriális hatásai hozzájárulnak a citotoxicitáshoz.

P-90 A forminok szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában

Bugyi B., Papp G., Ujfalusi Z., Barkó Sz., Somogyi B., Nyitrai M.
PTE, ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs

A forminfehérjék aktinnukleációs faktorok, amelyek az eukarióta sejtek aktin-citoskeletonjának szabályozásában vesznek részt. A forminokat az evolúció során nagymértékben konzervált régióik, az ún. forminhomológia-domének (FH1, FH2 és FH3 domén) alapján azonosíthatjuk. Az FH2 domén meghatározó szerepet tölt be az aktinnal való kölcsönhatás kialakításában. A prolinban gazdag FH1 domén kötőhelyeket biztosít a profilinnak és nélkülözhetetlen a forminok processzivitásához. A forminok egy alsócsaládját alkotják az ún. *Diaphanous*-rokon forminok (Dia). Munkánk során egér-mDia fehérjék központi FH2 doménjének és az azt az FH1 doménnel összekötő ún. *linker* régiót is tartalmazó fragmentumának az aktin polimerizációs folyamatára és az aktinfilamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. Fluoreszcenciaspektroszkópiai vizsgálataink eredményei szerint a monomer központi FH2 domén a polimerizáció folyamatát gátolja, míg a hosszabb, összekötő régiót is tartalmazó fragmentum ezen

regió révén képes dimereket alkotni, amelyek hatékonyan nukleálják az aktinfilamentumokat. Hőmérsékletfüggő fluoreszcenciarezonancia-energiatranszfer módszer segítségével megmutattuk, hogy az mDia1 FH2 doménjének jelenlétében az aktinfilamentumok konformációs állapota megváltozik. Az alkalmazott mDia1-FH2-koncentrációtól függően két különböző hatás volt megfigyelhető. Az eredményeink alapján megalkotott modell szerint a filamentumok szöges végéhez kötődő mDia1-FH2 dimer hosszú hatótávolságú alloszterikus kölcsönhatások révén képes a filamentumok szerkezetét fellazítani, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó mDia1-FH2 dimerek a filamentumok szerkezetét stabilizálják. A forminok hatására módosult konformációs állapotba került aktinfilamentumok funkcionális tulajdonságai és más fehérjékkel való kölcsönhatások is megváltozott. A forminok által fellazított aktinfilamentumokat a kofilin hatékonyabban depolimerizálja, míg a tropomiozin képes stabilizálni azok szerkezetét.

P-91 A szívizom aktinjának termodinamikai tulajdonságai: a nukleotidok hatása

Orbán J., Lórinczy D., Pozsonyi K., Somogyi B., Hild G.
PTE, ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs

Az emlősökben előforduló aktinizoformák közül a szívben és a vázizomban fellelhető α -aktinok összehasonlítását végeztük el. Az izoelektromos pontjuk és aminosavszekvenciájuk alapján hasonló fehérjéken differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) méréseket végeztünk: ADP-kötő aktinmonomerekből polimerizált filamentumok termodinamikai tulajdonságait vizsgáltuk. Kalorimetriás mérésekkel különbségeket mutattunk ki az α -aktin szívizom- és vázizombeli izoformái között. Az izoformák esetében megfigyelt magasabb átmeneti hőmérséklet (T_m) azt mutatta, hogy ADP jelenlétében ez az aktinizoforma termodinamikailag stabilabb az szívizombeli izoformánál. A meghatározott Van't Hoff entalpiaértékek és a kapott hődenaturációs görbék félértékessége alapján azt is megállapítottuk, hogy az izoformák szerkezete mutatott nagyobb fokú kooperativitást. Az aktinizoformák aránya eltér a szívizomban és a vázizomban. Az izoformák termodinamikai természetének eltérései hatással lehetnek az egyes izomszövet típusok funkcionálisára. A szívizomban található természetes izoformaarány mechanikai- vagy patológiás hatások következtében történő megváltozása a szívizomzat új feltételekhez való akkomodációját vagy éppen működési elégtelenségét okozhatja.

A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke

BCE: Budapesti Corvinus Egyetem
BME: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
DE: Debreceni Egyetem
ELTE: Eötvös Loránd Tudományegyetem
EMBL: European Molecular Biology Laboratory
KÉKI: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
MBK: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
MTA: Magyar Tudományos Akadémia
MTA KOKI: MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
MTA MGKI: MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet
MTA NKI: MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

MTA SZBK: MTA Szegedi Biológiai Központ
OEC: Orvos- és Egészségtudományi Centrum
OGYIK: Országos Gyógyintézeti Központ
ORFI: Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet
PTE: Pécsi Tudományegyetem
SE: Semmelweis Egyetem
SZTE: Szegedi Tudományegyetem

ÁOK: Általános Orvostudományi Kar
KeTK: Kertészettudományi Kar
TTK: Természettudományi Kar

Szerző szerinti mutató

A		Baksa A.	P-30	Békési A.	E3-02, P-67, P-73
Ács P.	P-83	Balázs A.	P-02, P-10	Belleger, J.	P-51
Adányi N.	P-86	Bálint É.	P-03, P-07	Bellyei Sz.	E2-02, E4-01, E4-05
Aeschlimann, D.	P-76	Balla A.	E7-01	Benedetti, A.	P-23, P-26
Ambrus Géza	E2-007	Balla T.	E7-01	Bereczki O.	P-07
Auwerx, J.	E3-04	Balogh G.	E2-03, E6-05	Berente Z.	E5-02, E8-01, E8-04, P-83
B		Balogi Zs.	E2-03, E6-05	Berta G.	P-69, P-75
Bacsó R.	P-01	Bander P.	P-04	Bikádi Zs.	E9-02
Bagossi P.	E2-05, P-04, P-36, P-48, P-54, P-82	Bánhegyi G.	E5-01, E5-03, P-26, P-47	Birkás B.	P-08
Bai P.	E3-04, P-33	Bányai J.	P-25	Birkó Zs.	P-09
Baka Zs.	P-28, P-50	Barabás O.	P-61, P-81	Biró S.	P-09
Bakó A.	P-24	Bárkai T.	P-05	Biró T.	E7-03, E7-07
Bakó É.	P-41	Barna L.	E2-07	Blastyák A.	E3-03
Barkó Sz.	P-90	Barta E.	E9-01, P-68	Blohin, Sz.	P-86
Bakondi E.	P-33	Bata-Csörgő Zs.	E3-01	Bodor A.	P-34
		Bátor J.	P-06	Bognár E.	E4-05, E8-04, P-83, P-89
		Bedő Z.	P-25		

Bognár Z.	E1-01, E2-02, E4-05, E8-02, P-11, P-88	Fulceri, R.	P-26	Kakuk A.	E7-01
Borbás T.	P-46	Fuxreiter M.	P-61	Kálai T.	E8-02
Boronkai Á.	E2-02, E4-01, E4-05	G		Karácsonyi Z.	E7-07
Boros G.	P-12, P-14, P-15	Gál P	E2-07	Karcagi I.	E6-06
Boros I.	E6-04, P-03, P-07	Galbács Z.	P-40	Kardos J.	P-34, P-53, P-65
Boross P.	E2-05, P-04	Gallyas F.	E1-01, E2-02, E5-02	Kása A.	E7-01
Bógel G.	P-02, P-10	Gallyas F., ifj	E4-05, E8-01, E8-02, E8-04, P-11, P-74, P-83	Katona G.	E2-06
Bökönyi Gy.	E8-03			Katona K.	P-35
Brunyánszki A.	P-13	Gamberucci, A.	P-23, P-26	Kazinczyné Vas M.	P-21
Buday L.	P-02, P-10	Gárdonyi M.	P-24, P-25	Kecskés Sz.	P-36
Bugyi B.	P-90	Gáspári Z.	P-70	Kellermayer S. Z. M.	P-31
Bukau, B.	E2-03	Gasz B.	E4-05	Kemény L.	E3-01
Bukovszkaja, O.	P-86	Gergely P.	E7-03, E7-04, E7-05, E7-06, E7-07, E8-06, P-13, P-17, P-41	Kénesi E.	E6-01, P-58
Burkovich P.	E3-02, P-72			Keresztes G.	P-37
Buslig J.	P-12, P-14, P-79			Keresztessy Zs.	E4-02
Buzás K.	P-09	Gergely Sz.	P-33	Kéri Gy.	E8-03
C		Giricz Z.	P-28	Kintses B.	P-31, P-38
Çinar, R.	E7-10	Giunti, R.	P-23, P-26	Király R.	E4-02, P-82
Ciurciu A.	E6-04	Glatz A.	E2-03	Kiss A.	E7-04
Colucci, A.	P-23	Goloubinoff, P.	E2-03	Kiss A. S.	P-40
Czifra G.	E7-07	Gombos I.	E6-05, P-27, P-78	Kiss B.	E3-04
Czifrák K.	P-13	Goto, Y.	P-53, P-65	Kiss Cs.	P-14
Czimmerer Zs.	P-12, P-15	Görbe A.	P-28	Kiss I.	E6-01, P-05, P-58
Czirók A.	E4-03, E7-08	Gráczér É.	P-29	Kiss J.	P-39
Csala M.	E8-05, P-47	Gráf L.	E2-06, P-27, P-49, P-78	Kiss K.	P-39
Cseh B.	E6-06	Grász D.	E8-04	Kitajka K.	P-51
Csermely Péter	E2-01	Gregus A.	P-33	Klement É.	E3-02
Csernoch L.	E7-05, E7-06	Grósz G.	P-30	Kocsis A.	E2-07
Csikász-Nagy A.	E9-03, P-85	Gyimesi M.	P-31, P-38	Kolozsvári B.	P-41
Csász É.	E4-02	Gyöngyösi A.	P-32	Komlósi K.	E4-05
Csász L.	P-66	H		Komoly S.	P-83
D		Hajjas Gy.	E7-07	Komonyi O.	E6-04
de Murcia, G.	E3-04	Hajdú I.	E3-03, P-21, P-29	Konarev, P.	P-21
Deák F.	E2-04, P-05	Halász K.	P-66	Koncz Cs.	P-01
Deák P.	E2-08	Halmosi R.	P-62	Konta L.	P-47
Debreceni B.	E1-01, P-59	Hantó K.	E1-01, P-11, P-74	Korcsmáros T.	E2-01
Debreczeny M.	E2-03	Haracska L.	E3-02, E3-03, P-72	Korponay-Szabó I.	P-82
Deli T.	E7-06	Harci A.	P-06, P-69, P-75	Kovács E.	P-43
Dezső B.	E6-02, P-15	Harmat V.	E2-07	Kovács G.	P-66
Dobozy A.	E3-01	Hegedűs Cs.	P-33	Kovács I.	E2-01
Dobrosi N.	E7-07	Hegyési H.	E7-11	Kovács K.	E8-01, P-11
Docsa T.	P-13	Hempel, W. M.	P-16	Kovács M.	P-38, P-60, P-77
Donáth J.	E8-06	Hetényi Cs.	E9-02, P-34, P-70, P-77	Köröskényi K.	P-42
Đuriš R.	P-16	Hideg K.	E8-02, P-62, P-74	Kővári J.	P-44, P-52
Dux L.	P-28, P-50	Hild, G.	P-84	Kravjár I.	E2-04, P-05
E		Hild G.	P-91	Kucsma N.	P-45
Eizert H.	E2-05	Hocsák E.	E2-02, E4-01, E4-05, E8-04, P-88, P-89	Kurtán T.	E4-02
Erdei A.	E3-02, P-67	Hódi Zs.	P-34	L	
Erdélyi K.	P-33, P-17	Hong, C. I.	E9-03, P-85	Lányi Á.	P-55
Erdődi F.	E7-04	Horváth I.	E2-03, E6-05	Leveles I.	E3-02, P-67
F		Houten, S. M.	E3-04	Liberek, K.	E2-03
Fábián Zs.	E6-03	Hrabák A.	E8-03	Likó I.	P-46
Falus A.	E7-11	Huber, A.	E3-04	Liliom K.	P-30, P-43
Faragó A.	E7-02	Hunyadi-Gulyás É.	E3-02, P-09, P-66, P-67	Little, C. D.	E4-03
Farkas V.	E5-05	I		Lontay B.	E7-04
Fehér A.	P-18	Illés A.	P-02, P-10	Lőrinczy D.	P-84, P-91
Fehér T.	E6-06	Inui, M.	P-37	Lukács M.	P-02
Fehér Zs.	P-16, P-30	Ivanics M.	P-22	Lukács N.	P-66
Fekete G.	P-86	J		M	
Felföldi F.	E3-02, P-19, P-67	Jakus P.	E5-05	Mackie, K.	E7-10
Felföldi N.	P-13	Janáky T.	E4-05	Mádi A.	E4-04
Ferenczi Sz.	P-20	Jelinek B.	E2-06, P-38	Magyar É. J.	P-47
Fésüs L.	E4-02, E4-06, E7-09, P-35, P-76, P-79, P-82, P-42	Jenes B.	P-22	Májai Gy.	E4-06, P-35
Flachner B.	P-21, P-71	Jósvay K.	E2-03	Málnási-Csizmadia A	E9-02, P-27, P-31, P-38, P-77, P-78, P-81
Fodor G.	P-22, P-24	Juhász K.	E2-03	Mandl J.	E5-02, P-47
Fodor J.	E7-05, E7-06	Juhász T.	E7-05, E7-06, E7-07	Manninger S.	P-66
Fodor K.	E2-06	Juracsek J.	P-86	Márk L.	P-56, P-88
Freund T. F.	E7-10	K		Márkás L.	E7-04
Friedländer E.	E7-01	Kádas J.	E2-05, P-48, P-54	Maródi L.	P-80
				Maslyanko, A.	E6-05
				Mastroberardino, P. G.	E7-09
				Matta Cs.	E7-05, E7-06, E7-07

Matuszewska, M.	E2-03	Papp I.	P-01	Szajli E.	P-66
Matúz K.	P-48, P-54	Papp P.	P-20	Szalay M.	E2-01
Medveczky P.	P-27, P-49, P-78	Pardi N.	P-07	Szántó Á.	P-11, P-89
Medvedeva, E.	P-22	Patthy A.	P-49	Szántó A.	E6-02, P-32, P-64
Medzihradzky F. K.	E3-02, P-67	Percz A.	P-34, P-70	Szarka A.	E5-03
Medzihradzky K	P-09, P-66	Pertik É.	P-53	Szarmári I.	P-55
Méhes E.	E7-08	Peti M. A.	P-63	Szeberényi J.	E6-03, P-06, P-39, P-69, P-75
Melegh B.	E4-05	Petoukhov, M.	P-61	Szegedi K.	E3-01
Mendler L.	P-50	Petrik É.	P-53, P-65	Székács A.	E5-04, P-86
Ménesi D.	P-51	Petrovski, G.	E4-06	Széles L.	P-55
Menissier-de Murcia, J.	E3-04	Pintar, J.	P-08	Szell M.	E3-01
Merényi G. .	P-44, P-52	Pintér L.	E3-03, P-72	Szenes Á.	P-68
Mészár Z.	E7-07	Poór Gy.	E8-06	Szigeti A.	E2-02, E4-01, E4-05
Micsónai A.	P-53, P-65	Pós V.	P-66	Szűgyártó Zs.	E7-03, E7-05, E7-07
Miklóssy G.	E2-05, P-36, P-54	Pósfai Gy.	E6-06	Szilágyi L.	P-27, P-49
Miko E.	P-12, P-14, P-55	Pozsgai É.	E2-02	Szirák K.	P-30
Módis L.	E7-05, E7-06	Pozsonyi K.	P-91	Szondy Zs.	E4-04, E7-09, P-76, P-79, P-80, P-42
Módis L.	E7-07	Pukáncsik M.	E3-02, P-67	Szukacsov V.	P-72
Mogk, A.	E2-03	Puskás L.	P-51, P-87	Szűcs K.	E7-03
Molnár A.	E6-01, P-58, P-87			Szűcs M.	P-08, E7-10
Molnár J.	P-68	R		Szűcs P.	P-25
Molnár P.	E7-09	Rab E.	P-66		
Molnár V.	E7-11	Radnai B.	E5-02, E8-04	T	
Montskó G.	P-56, P-59, P-63, P-88	Radnai L.	P-34	Takács E.	P-73
Mótyán J.	P-41	Rottenberger Zs.	E2-04	Takács K.	P-22
Muha V.	E3-02, P-57	Ruehl, R.	P-35	Takács L.	P-16, P-30
Muller, S.	E2-04			Tamás L.	P-19, P-22, P-25
		S		Tapodi A.	E1-01, P-74
N		Sahin-Tóth M.	E1-02	Tarjányi O.	P-06, P-69, P-75
Nagy A.	E6-01, P-58	Sándor A.	E5-05	Tósaki Á.	E7-09
Nagy E.	E6-05, E2-03	Sarang Zs.	E4-04, E7-09, P-42	Tóth A.	P-62
Nagy G.	E5-02, E5-03, E7-07	Sarkadi B.	P-18, P-45	Tóth B.	P-76
Nagy J.	P-56, P-59, P-63	Schlett K.	P-34, P-49	Tóth G.	E9-01, P-08, P-68, P-70
Nagy L.	E6-02, P-64, P-32	Scholtz B.	P-12, P-14, P-15, P-55	Tóth J.	P-27, P-49, P-77, P-78, P-38
Nagy N.	E3-01, E7-09, E3-01	Schreiber, V.	E3-04	Tóth K.	P-62, P-79
Nagyné Kiss Gy.	P-89	Sebestyén E.	E9-01, P-68	Tóth R.	P-80
Nagy O.	E2-08	Sebők Á.	P-39	Tóth S.	E7-11
Nagy T.	E9-01, P-68	Sellers, J. R.	P-77	Tőkési N.	P-49
Nagy Zs.	E8-06	Semisotnov, G.	P-29	Tölgyesi F.	P-81
Náray-Szabó G.	E2-07	Senesi, S.	P-23	Török Zs.	E6-05
Narce, M.	P-51	Sétáló Gy., if.	P-69, P-75	Tózsér J.	E2-05, P-04, P-36, P-48, P-54
Német K.	P-18, P-45	Sheng, H.	E2-04	Tucsek Zs.	E8-04, P-83, P-88
Németh A.	P-34, P-49, P-60	Sicora, O.	E2-04	Türk D.	P-18
Németh P.	P-49	Siklódi E.	P-49	U	
Németh T.	E7-09	Sim, R. B.	E2-07	Újfaludi Zs.	E6-04, P-03
Németh V.	E4-01, E8-04, P-56, P-61, P-83, P-88, P-89	Simon I.	P-61	Ujfalusi Z.	P-90
Niedetzky Cs.	P-38	Simon Z.	E9-02, P-27, P-38, P-78	Ujhelly O.	P-45
Nonaka, H.	P-37	Sinkó I.	E6-01, P-58	Umenhoffer K.	E6-06
		Sipeki Sz.	E7-02	Unk I.	E3-03, P-72
Ny		Sipka S.	E7-03		
Nyitrai M.	P-84, P-90	Sipos K.	P-59, P-63	V	
Nyitrai L.	P-34, P-60, P-70	Sistonen, L.	E6-05	Váradi J.	E7-09
		Slotte, P.	E6-05	Várady Gy.	P-45
O		Solti I.	E2-02, P-74, P-83, P-88, P-89	Várbíró G.	E4-05, E8-02, P-74, P-89
Oláh É.	E7-04, P-14	Solti Z.	P-02, P-10	Varga A.	P-21, P-29, P-71
Oommen, S. T.	E6-01	Somogyi B.	P-84, P-90, P-91	Varga B.	P-81
Orbán J	P-91	Somsák L.	P-13	Varga J.	P-06, P-75, P-69
Ortutay Cs. P.	E9-04	Sonkoly E.	E3-01	Vas M.	P-29, P-71
Ovádi J.	P-49	Sóti Cs.	E2-01	Vecsei Zs.	P-82
		Sperka T.	E2-05	Vecsernyés M.	E6-03
Ö		Stark B.	P-06, P-69, P-75	Venekei I.	E2-06
Órfi L.	E8-03	Sümegei B.	E1-01, E2-02, E4-01, E4-05, E5-02, E8-01, E8-02, E8-04, P-11, P-62, P-74, P-89	Vereb Gy.	E7-01
				Vereb Gy., ifj.	E7-01
P		Süveges D.	P-60, P-70	Veres B.	E5-02, P-11
Pacentini, M.	E7-09	Svergun, D.	P-21, P-61	Vértessy G. B.	E3-02, P-44, P-52, P-57, P-61, P-67, P-73, P-81
Pál M.	E2-08	Sz		Vető S.	E8-04, P-83, P-88, P-89
Pálfi A.	E8-01, E8-02, P-62	Szabados E.	P-62	Vígh L.	E2-03, E6-05
Pálfy T.	E9-01, P-68	Szabó A.	P-11, P-74	Vihinen, M.	E9-04
Palkovits M.	P-49	Szabó É.	P-33		
Pandur E.	P-56, P-59, P-63	Szabó J.	P-21, P-71		
Pankotai T.	E6-04	Szabó Z.	E4-05		
Pap A.	P-64				
Pap M.	E6-03				
Papp G.	P-90				



SIGMA-ALDRICH

Cégünk piacvezető szerepet tölt be a kutatási vegyszerek gyártása és forgalmazása területén.
A magyarországi leányvállalat

keres munkatársat

Technikai szaktanácsadó

munkakörbe

Feladat:

- Technikai tanácsadás szakmai kérdésekben
- telemarketing
- szakmai ismertetőanyagok készítése

Elvárások:

- felsőfokú biológus, biokémikus végzettség
- angol nyelvtudás
- kiváló számítógépes ismeretek
- jó kommunikációs képesség

Amit kínálunk:

- versenyképes jövedelem
- csapatmunka kiváló feltételekkel
- folyamatos szakmai fejlődés

Jelentkezéseket szakmai önéletrajzzal, angolul és magyarul várunk.

Határidő: 2006 szeptember 30.

Jelentkezési cím: Sigma-Aldrich Kft., 1399 Bp. Pf. 701/400 info@sigma.sial.hu



SZKARABEUSZ

Szkarabeusz Környezetvédelmi és Kereskedelmi Kft.; Pécs, Nagy Imre u.148.
Vegyszertolt, raktár: Pécs, Verseny u.17. Tel.: 72/532-828, Fax.: 72/532-829
skarab@axelero.hu • www.szkarabeusz.hu

SERVA

Electrophoresis

Fine Biochemicals

- Gyógyszerkönyvi minőségű anyagok: antibiotikumok, aminosavak,
- Antibiotikumok: Cerulenin, Geldanancin, Nigericin, Rapamycin, Trichostatin A, Vancomycin
- Elektronmikroszkópia: SPURR Embedding Kit
- Fehérjekémia: 50 különböző Proteáz inhibitor, inhibitor mixek
- Jelátvitel: 6 új Protein kináz

Electrophoresis

- SERVLYTE Blank PRECOTES
- NetFix technológia; PreNets gél
- SDS PreNets blotting kit
- dialízishez: DiaEx Midi Kit
- Protein Concentration Kit
- Festékek
- Fehérje: Standardok, Proteome Markers
- Nukleinsav elektroforézis, Native PreNets
- Submarine Electrophoresis
- Software: Digital Image Analysis System, Cell explorer

Life Sciences

- DNase, RNase mentes reagensek, vegyszerek
- Nukleotidok és keverékek
- Protoplaszt fúzió: Fungelase

Collagenase

- Collagenase NB szövettani felhasználásra

Ion exchange media

- Serdolit, DOWEX, Servacel

Enzimek/koenzimek/inhibitorok

Panreac

Panreac Química S.A.

Finomvegyszerek, reagensek

- *Műszeres analízishez szükséges termékek*
- HPLC oldószerek: GG, isokratikus, prep.
- Ion-pár reagensek, oldószerek peszticid szermaradvány analízishez
- Spektroszkópiás oldószerek (UV, IR)
- GC standardok
- *Vízmentes, szárított oldószerek*
- *Deuterizált anyagok NMR analízishez*
- *Nyomelem-analízishez reagensek*
- Analpur* (szennyezőanyag csak ppb tart.)
- Hiperpur* (szenny.a. **kevesebb**, mint 1 ppb)
- Hiperpurplus* (szenny.a. **kevesebb**, mint 100 ppt)
- Alacsony Hg-tartalmú reagensek
- AAS standardok, ICP standardok
- Nagytisztaságú oldószerek: n-Hexán, Acetonitril, Aceton, Diklórométán, Metilalkohol stb.
- Nagytisztaságú savak, reagensek: HCl, HNO₃

CULTIMED Mikrobiológiai termékek

CODEX: Gyógyszerkönyvi minőségű alapanyagok

ADITIO: Élelmiszer-ipari minőségű alapanyagok (antioxidánsok, stabilizátorok, pH-szabályozók, ásványi sók stb.)

PhusionTM

High-Fidelity DNA Polymerase

Csak ínyenc
Pfu-felhasználóknak!

Ez nem Pfu,
ez jobb!

Extreme
fidelity
and speed

kvalitex

Tudományos, Technológiai, Kereskedelmi Kft. • Scientific, Technological, Trading Ltd.

H-1136 Budapest, Pannónia u. 7. Tel.: (36-1) 340-4700 Tel./fax: (36-1) 339-8274 E-mail: info@kvalitex.hu

 **FINNZYMES**
PRODUCTS FOR PCR AND MOLECULAR BIOLOGY