

BIOKÉMIA

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

Szerkesztőbizottság:
BENYHE SÁNDOR, ERDŐDI FERENC, GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC,
NYESTE LÁSZLÓ, NYITRAY LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS,
SÜMEGI BALÁZS, VÁRADI ANDRÁS

Felelős szerkesztő:
SZÉKÁCS ANDRÁS

XXXI. ÉVF. 3. SZÁM

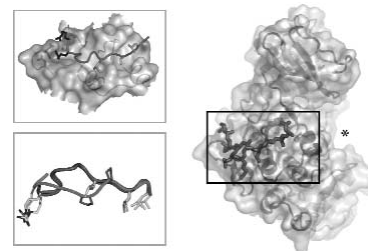
2007. SZEPTEMBER

A tartalomról:

- ◇ MAP kináz pályák szelektivitása – Reményi Attila
- ◇ A Magyar Biokémia Egyesület 2007. évi vándorgyűlése – Előadás- és poszter-összefoglalók

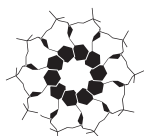
Címlapkép:

A *Fus3* MAPK dokkoló kölcsönhatásainak szerkezeti analízise. A *Fus3* enzim interakciós partnerei egy rövid, ~10–15 aminosavat tartalmazó peptidmotívumon keresztül kötődnek a dokkoló hasadékba. Az itt kialakuló, az aktív helytől független, fehérje–fehérje kölcsönhatások fontos szerepet játszanak jelátviteli hálózatok felépítésében. A jobb oldalon a *Fus3/pepSte7* komplex kristályszerkezete, míg a bal oldalon felül a dokkoló hasadék nagyítva látható. (A felület az elektrosztatikus potenciáljának megfelelően színezett). Ezeken az ábrákon jól megfigyelhető a dokkoló peptid konszenzusa, (R/K)₁₋₂X₄₋₆LXL és a dokkoló hasadék szerkezete közötti komplementaritás. Az alsó panel a *Fus3* MAPK dokkoló hasadékába kötődő három különböző interakciós partnerből származó dokkoló peptidek konformációját szemlélteti (*Ste7*, kék; *Msg5*, bíbor; *Far1*, zöld). A *Far1* peptidben jelen lévő, a *Fus3* és *Kss1* MAPK közötti specifitásért felelős prolin aminosavak pirosra vannak színezve. A *Fus3* aktív helyét * jelzi (ld. a vonatkozó közleményt az 42-46. oldalakon).



Contents:

- ◇ Selectivity of MAP kinase networks – Attila Reményi
- ◇ The 2007 meeting of the Hungarian Biochemical Society – Lecture and poster abstracts



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6

Felelős kiadó: Dr. Fésüs László

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455

Szerkesztőség: biokemia@nki.hu

<http://www.webio.hu/biokemia>

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: 750 Ft + postaköltség

WEBio
BioScience Portal

MAP kináz pályák szelektivitása

Selectivity of MAP kinase networks

Reményi Attila

University of California, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158, USA

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: attila.remenyi@ucsf.edu

Összefoglalás

A sejtbiológiai folyamatok egyik rejtélye, hogy kis szubsztrátspecifitású enzimeket használó jelátviteli hálózatok hogyan építenek fel az organizmus szintjén specifikusan működő jelpályákat. Az utóbbi évek kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy fehérjekinázok ún. dokkoló kölcsönhatásai, valamint vázfehérjék közreműködése kiemelkedően fontos szerepet játszanak e jelpályák szelektív működésében. Élesztőből származó mitogénaktivált protein kináz (MAP kináz, MAPK) enzimek dokkoló és vázfehérjepeptidekkel alkotott komplexein keresztül bemutatjuk, hogy ezek az újszerű, aktív helytől független fehérje–fehérje kölcsönhatási mechanizmusok miként hoznak létre nagy specifitású jelátviteli hálózatokat. Érdekes módon humán és élesztő eredetű MAPK-modulok szerveződése nagymértékű hasonlóságot mutat: az itt bemutatott mechanizmusok kiterjeszthetők a gyógyászati szempontból fontos humán enzimeken alapuló jelpályákra is.

Reményi, A.

University of California, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158, USA

Eötvös Loránd University, Department of Biochemistry, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, Hungary, E-mail: attila.remenyi@ucsf.edu

Summary

It is an intriguing problem in cell biology how one can make up highly specific signaling networks by using promiscuous components. Recently, it has been discovered that protein kinases use docking interactions and scaffold proteins to build up selective routes for intracellular signal flow. We have determined the structure of several protein-peptide complexes in which a yeast mitogen-activated protein kinase (MAPK) is bound to docking peptides or to a fragment of a classical scaffold protein. These structures demonstrate how these interactions are used to achieve selectivity without the involvement of promiscuous kinase active sites. The organization of MAPK modules is conserved from yeast to human: the described novel protein-protein interactions can also be extended to human MAPKs. One day these studies might serve as the foundation for a more selective approach to modulate MAPK activity in signaling related diseases.

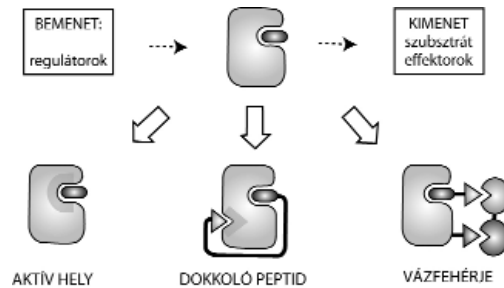
Jelátviteli folyamatokban általános jelenség, hogy a milliónyi környezeti inger sejten belüli feldolgozásában a jelátviteli fehérjéknek csupán egy meglepően kisszámú csoportja vesz részt. A fehérjék aktivitását reverzibilis foszforiláció révén szabályozó fehérjekinázok és -foszfátázok például egyszerre több jelpálya köztes enzimek is lehetnek. Ennek a problémának a szemléltetésére remek példa a MAP kinázok (MAPK) csoportja [1]. Számuk eukarióta organizmusokban meglepően kicsi, bár a sejten belüli folyamatok szabályozásában szerepük sokrétű (pl. a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő-

fajban 5, míg az emberben <15 MAPK fordul elő). A MAP kinázok a szerin-treonin kinázok csoportjába tartoznak, foszforiláció révén aktiválódnak, míg ők maguk szubsztrátfehérjéknek változatos palettáját foszforilálják. Utóbbiak mind tartalmazzák MAPK foszforilációs motívumot (az ún. S/TP helyet), mely a szubsztrátnak a kináz aktív helyéhez való kötődéséhez szükséges, és egyben a foszforiláló szerin vagy treonin aminosavat is tartalmazza. Érdekes módon ezek a szubsztrátspecifitásukban meglehetősen „liberális” enzimek a sejten belül és halál urai: olyan alapvetően eltérő folyamatok

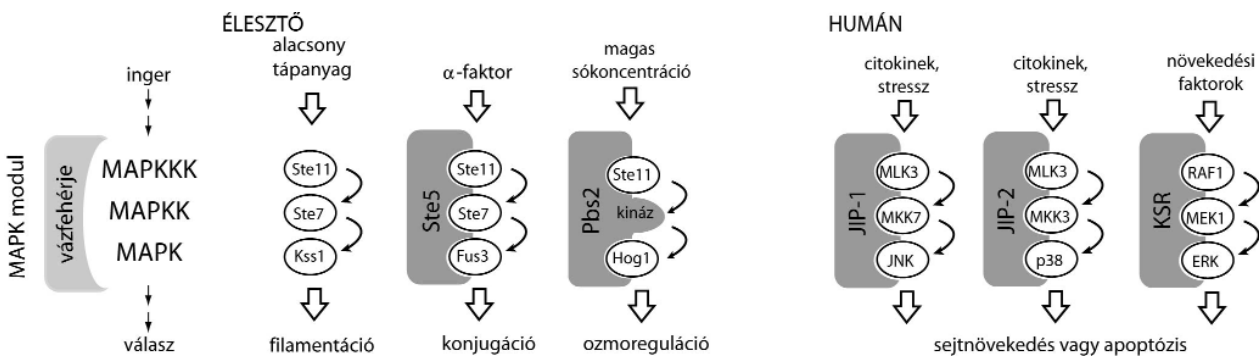
regulátorai, mint például a sejtproliferáció vagy a sejthalál [2]. A jelterjedés hűségének fontosságát szem előtt tartva az alábbi kérdés vetődik fel: hogyan lehetnek az ilyen széles szubsztrátspektrumú fehérjekinázok jelátviteli pályák kulcsenzimeit?

Napjainkban elterjedt nézet, hogy a protein kinázok szubsztrátspecifitását általában az aktív helyet határoló aminosavak befolyásolják. Ez azonban a MAP kinázok estében nyilvánvalóan másképp van, hiszen egy, a foszforilálható aminosavot követő prolin aminosav mint konszenzusszekvencia nem elégséges követelmény a csoport egyes tagjai – például az emlős eredetű ERK, JNK vagy p38 MAP kinázok – szubsztrátspecifitásának jellemzésére. Az utóbbi évek kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy sok fehérjekináz az aktív helytől független mechanizmusokon keresztül választja ki célfehérjéit; nevezetesen ún. dokkoló vagy vázfehérjékkel történő asszociációk révén (1. ábra) [3–5]. A dokkoló kölcsönhatások olyan bináris fehérje–fehérje kölcsönhatások, melyek a tranzienst természetű enzim/szubsztrát-kötődésen felül, attól eltérő módon segítik elő a kináz és a partnere közötti interakciót. Eredetileg ilyen kölcsönhatásokat

a kináz–szubsztrát párokra írtak le, ahol az enzimreakció K_M értékének erősítése révén a szubsztrát foszforilációját teszik hatékonyabbá [6]. Ma már dokkoló kölcsönhatások egyéb MAPK-partnerekre is



1. ábra Fehérjekinázok kölcsönhatási mechanizmusai. A leg-egyszerűbb esetben a foszforilálható aminosav körüli régió kötődik a kináz aktív helyéhez, és ennek a régióknak a térbeli szerkezete határozza meg a szubsztrátspecifitást. Dokkoló kölcsönhatások esetében a kináznak egy, az aktív helytől különálló felszíne (az ún. dokkoló hasadék) és a szubsztrátfehérjéből származó peptidrégió (ún. dokkoló peptid) biztosítja a kináz/szubsztrátfehérje közötti kötődés szelektivitását. Több esetben azonban a szubsztrátfehérje és az azt foszforiláló kináz csak egy harmadik fehérje (ún. vázfehérje) közreműködése révén lépnek interakcióba. Ebben az esetben a kináz–szubsztrátfehérje pár specifitása a vázfehérjével alkotott kölcsönhatásokban rejlik.



2. ábra Élesztő és humán eredetű MAPK modulok. A MAP kinázok aktivitása egy háromszintű kinázkaszkádon keresztül szabályozott. Ezek az ún. MAPK modulok sokféle jelpálya változatos bemenet–kimenet összefüggéseinek kapcsolóállomásai. Felépítésük nagymértékű hasonlóságot mutat élesztőtől az emberig. Sok esetben MAPK-modulok kinázkomponenseit (MAPK kináz kináz: MAPKKK; MAPK kináz: MAPKK; valamint MAPK) vázfehérjék szervezik komplexekbe (pl. Ste5). Vannak olyan modulok is, melyek vázfehérjék nélkül működnek (pl. a filamentképző pálya esetében), vagy melyekben az egyik kináz maga tölti be a vázfehérje szerepét (pl. Pbs2). Ste5-szerű, analóg funkciót betöltő humán vázfehérjék szintén elterjedtek.



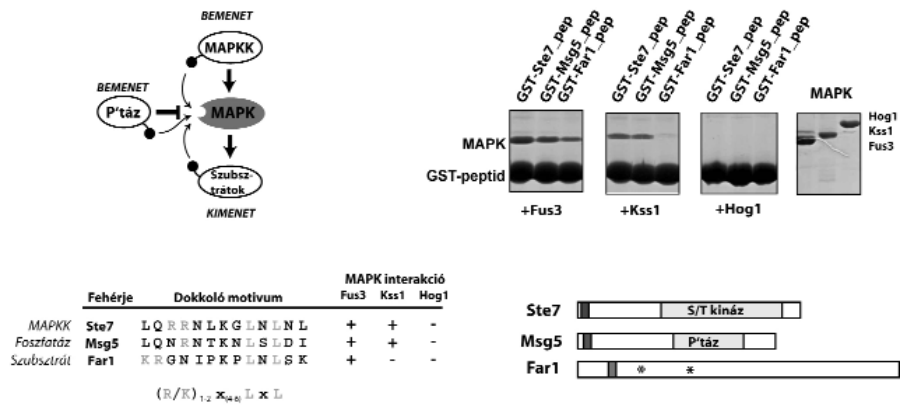
Reményi Attila 1997-ben diplomázott az Eötvös Loránd Tudományegyetemen (ELTE) biológusként, majd 2001-ben orvosbiológus mérnöki diplomát szerzett a Budapesti Műszaki Egyetemen (BME). Alapítástól kezdve évekig az ELTE Bolyai János Szakkollégium diákja. Egyetemi diplomamunkáját a Bristol Egyetemen Angliában, míg PhD-munkáját az Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumban végezte Heidelbergben és Hamburgban. PhD-diplomáját 2001-ben az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolájában szerezte. 2002 óta a Kaliforniai Egyetemen San Franciscóban posztdoktori ösztöndíjasként jelátviteli pályák molekuláris logikájának felderítésén dolgozik. 2007 szeptemberétől az ELTE Biokémiai Tanszék munkatársa.

ismertek (például egy másik kinázaktivátorhoz, egy deaktíváló foszfatázhoz vagy akár vázfehérjékhez való kötődés esetében). A vázfehérjék viszont változatos interakciós doménjeik révén képesek több kinázkomponenst egyidejűleg kötni. Munkánkban a dokkoló kölcsönhatások és a vázfehérjék pontos szerepét szeretnénk felderíteni biokémiai és szerkezeti biológiai módszerekkel. Az alábbiakban három jelpályán keresztül néhány érdekes példát kiemelve mutatjuk be ezeket a kölcsönhatásokat. A konjugációt, filamentképződést és az ozmoregulációt

S. cerevisiae (továbbiakban csak élesztő) esetében különböző MAP kinázok (Fus3, Kss1 és Hog1) szabályozzák (2. ábra). Bár ezek a pályák alapvetően különböző sejtes folyamatokat szabályoznak, a bemenet és kimenet közötti jelfeldolgozás több esetben ugyanazon a fehérjekinázon keresztül valósul meg [7,8]. Például a Ste11 MAPKKK mindhárom pálya esetében közös, míg a konjugációs és filamentképző pálya megfelelő MAP kinázának aktiválása mindkét esetben a Ste7 MAPKK által történik. Ennek a tanulmánynak a keretében a Fus3 és Kss1 MAPK pályák eltérő aktivációja mögötti molekuláris folyamatokat fogjuk ismertetni.

Dokkoló kölcsönhatások és szelektív fehérjehálózatok

Mivel a MAP kinázok központi jelátviteli enzimek, kölcsönhatásaik más fehérjepartnerekkel szükségszerűen sokrétűek. Aktivitásuk a velük kölcsönhatásba lépő egyéb kinázok és foszfatázok közreműködésével változik, míg információfeldolgozás szempontjából egyfajta kimenetként szubsztrátfehérjék (pl. transzkripciós faktoroknak, a citoszkeleton, transzport vagy éppen a sejtciklus fontos fehérjeinek) foszforilációját idézik elő (3. ábra). Legelőször azt vizsgáltuk, hogy a Fus3 MAPK hogyan kötődik a konjugációs pálya aktivitásában kulcsfontosságú szerepet játszó egyéb fehérjékkel. A Ste7 MAPKK a-típusú élesztősejtekben a Fus3 enzimet



3. ábra Dokkoló kölcsönhatások szelektivitása az élesztő MAPK jelpályáira. A MAPK interakciós partnerei általában tartalmaznak egy rövid (kb. 10-15 aminosavnyi) hosszúságú peptidszakaszt, mely a kináz dokkoló hasadékába kötődik. A fenti fehérje-fehérje interakció detektálására alkalmas kísérlet bizonyítja, hogy a Fus3 MAPK három interakciós partneréből (Ste7, Msg5 és Far1) származó rövid peptidmotívumok szelektív módon képesek bináris aszociációkat létrehozni. (A peptideket GST-fúziós fehérjékként állítottuk elő, gyantához kötöttük, és a három MAPK – Fus3, Kss1 és Hog1 – kölcsönhatásait SDS-PAGE segítségével követtük nyomon.)

aktiválja egy α-típusú konjugációs partner (vagy α-faktor) jelenlétében, az Msg5 foszfatáz a jelpálya alapállapotba való visszatérésében fontos az inger megszűnte után, a Far1 nevű citoplazmás fehérje foszforilációja pedig a sejtciklus átmeneti felfüggesztését eredményezi. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy mind a három eltérő funkciójú MAPK-partner egy rövid peptidszekvencián keresztül lép kölcsönhatásba Fus3 enzimmal. Ezek közös vonása, hogy egy (R/K)_{1,2}X_{4,6}LXL konszenzusmotívumot tartalmaznak, ahol egy vagy két, pozitív töltésű aminosavat és egy hidrofób szakaszt változatos szekvenciájú köztes régió választ el. Érdekes módon ezek a rövid peptidmotívumok az élesztő MAPK-

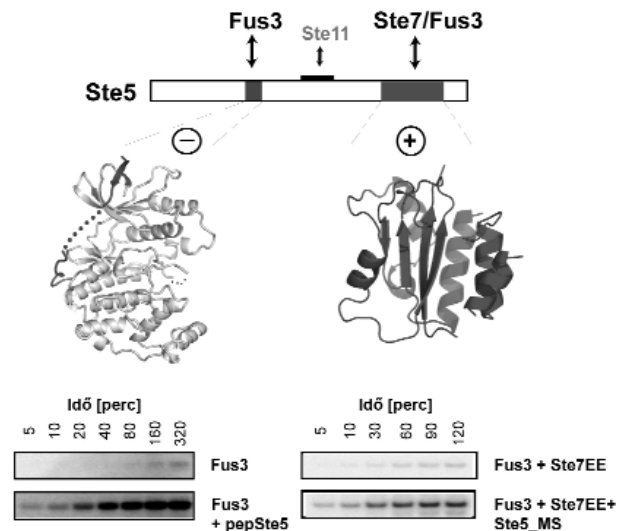
4. ábra (lásd a címlapon) A Fus3 MAPK dokkoló kölcsönhatásainak szerkezeti analízise. A Fus3 enzim interakciós partnerei egy rövid, ~10-15 aminosavat tartalmazó peptidmotívumon keresztül kötődnek a dokkoló hasadékba. Az itt kialakuló, az aktív helytől független, fehérje-fehérje kölcsönhatások fontos szerepet játszanak jelátviteli hálózatok felépítésében. A jobb oldalon a Fus3/pepSte7 komplex kristályszerkezete, míg a bal oldalon felül a dokkoló hasadék nagytíva látható. (A felület az elektrosztatikus potenciáljának megfelelően színezett). Ezekon az ábrákon jól megfigyelhető a dokkoló peptid konszenzusa, (R/K)_{1,2}X_{4,6}LXL és a dokkoló hasadék szerkezete közötti komplementaritás. Az alsó panel a Fus3 MAPK dokkoló hasadékába kötődő három különböző interakciós partnerből származó dokkoló peptidek konformációját szemlélteti (Ste7, kék; Msg5, bíbor; Far1, zöld). A Far1 peptidben jelen lévő, a Fus3 és Kss1 MAPK közötti specifitásért felelős prolin aminosavak pirosra vannak színezve. A Fus3 aktív helyét * jelzi.

hálózat logikájának megfelelően lépnek interakcióba a három, már korábban ismertett enzimmel (Fus3, Kss1 és Hog1). Ste7 és Msg5 fehérjék Fus3- és Kss1-aktivitását szabályozzák, és ennek megfelelően a belőlük származó peptidok (Ste7_pep és Msg5_pep) egyaránt kötik mindkét MAPK enzimet, míg a konjugációs pályára specifikus Far1 fehérjéből származó peptid (Far1_pep) szelektív módon kötődik csak Fus3 enzimhez. A továbbiakban meghatároztuk a Fus3 MAPK kristályszerkezetét a fenti peptidokkal komplexet alkotva (4. ábra) [9].

A szerkezeti biokémiai munka a dokkoló hasadék és a dokkoló peptid komplementaritásán túl szintén fényt derített a Far1 peptid szelektivitásának hátterére. A peptidszekvencia a köztes régióban két prolin aminosavat tartalmaz, és ezek jelenléte egy poliprolin II típusú hélixet generál, ami összeférhetetlen a Kss1 dokkoló hasadékával. Ste7 és Msg5 peptid köztes régiója viszont β -kanyar konformációt alkot, amely lehetővé teszi mindkét MAPK enzimmel való interakciót.

A Ste5 vázfehérje és a jelpálya-aktivitás modulációja

Már több mint egy évtizede, hogy az első vázfehérjét (Ste5) felfedezték [10]. Ennek az érdekes fehérjecsoportnak a pontos funkciója azonban még mindig nem teljesen ismert. Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy vázfehérjék csupán passzív módon segítik a fehérjekinázok közötti információáramlást. Mivel ezek a fehérjék a MAPK modul több komponensének kötésére alkalmas domént tartalmaznak, így az egymást aktiváló fehérjekinázok lokális koncentrációját növelve segítik a jelterjedést. Nemrég azonban sikerült bizonyítani, hogy vázfehérjék ennél sokkal érdekesebb módon is képesek jelpályák aktivitását modulálni. Ennek a munkának a keretében először arra voltunk kíváncsiak, hogy a Ste5 fehérje melyik része kötődik a Fus3 MAPK enzimhez. *In vitro* fehérje-fehérje interakció detektálásán alapuló kísérletekben azt találtuk, hogy egy kb. 30 aminosav hosszúságú Ste5 peptid (pepSte5) nagy affinitással képes Fus3 enzimet kötni [11]. Érdekes módon a peptid alloszterikus módon aktiválja a Fus3 enzimet *in vitro* (5. ábra). A Fus3/pepSte5 komplex kristályszerkezete fényt derített ennek a szokatlan jelenségnek a molekuláris mechanizmusára is. A pepSte5 a kináz mindkét lebenyéhez egyidejűleg kötődik, s valószínűleg a két lebeny között-



5. ábra A Ste5 vázfehérje összetett szerepe a Fus3 enzim aktivitásának szabályozásában. A Ste5 – a Ste11 MAPKKK-kötő régióin kívül – két jól elkülöníthető funkcióval rendelkező kináz-interakciós domént is tartalmaz: ezek a pepSte5 (jobbra) és a Ste5_MS (balra). A pepSte5 alloszterikus módon növeli a Fus3 autoaktivitását, ami azonban a jelpálya aktivitását negatívan befolyásolja *in vivo* (-) (lásd a szövegben). Ugyanakkor az intakt Ste5_MS domén szükséges Ste7 általi hatékony Fus3 foszforilációhoz, ez a domén tehát a jelpálya aktivitását növeli (+). (Az ábra alsó panelje Fus3 foszforiláció nyomon követésére alkalmas P32 autoradiogramokat mutat. Ezekben az *in vitro* kináztesztekben tisztított rekombináns fehérjekomponenseket kevertünk össze, majd a MAPK foszforilációját időben követtük nyomon. Az egyes fehérjék 1 μ M koncentrációban voltak jelen. A Ste7EE a MAPKK egy konstitutívan aktív formája, amely a Ste11 foszforilációjától függetlenül is aktív.)

ti dinamikus mozgásokat módosítja oly módon, hogy az a MAPK autoaktivációját eredményezi. A Fus3/pepSte5 kristályszerkezet birtokában lehetővé vált ennek a vázfehérje által generált alloszterikus jelenségnek az *in vivo* vizsgálata. A Ste5 génjének megváltoztatása révén olyan élesztőtörzseket állítottunk elő, amelyek a pepSte5 régióba bevitt mutációk révén megszüntetik a Fus3/pepSte5 interakciót, így ezekben a törzsekben a Ste5 által közvetített alloszterikus aktiváció hiányzik. Meglepő módon α -faktor stimulációja után mégis lényegesen nagyobb konjugációs pályaaaktivitást mértünk. További kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a Ste5 vázfehérje által közvetített alloszterikus MAPK-aktiváció egy, a konjugációs pályán belüli negatív visszacsatolás (feedback) generálásában fontos. Ez a pályaaaktivitást negatív módon befolyásolja, s megszüntetése a mutáns törzsekben végső soron a teljes pályaaaktivitás növekedését eredményezte.

MAPKK→MAPK információátvitel: dokkoló kölcsönhatások és vázfehérjék együtt

Legutóbbi munkánk a Ste5 fehérje MAPKK→MAPK információátvitelben játszott szerepének felderítésére irányul. Ez az a terület, ahol a dokkoló és vázfehérjék által közvetített fehérje–fehérje kölcsönhatások jelentősége a pályák szelektív jelterjedésében talán a legjobban szemléltethető. Már korábban említettük, hogy a filamentképző és a konjugációs MAPK pálya ugyanazt a MAPKK enzimet (Ste7) tartalmazza. Kísérletekkel bizonyítható, hogy Ste7-aktiváció után a filamentképző MAPK (Kss1) foszforilálása csupán intakt dokkoló kölcsönhatást igényel, és vázfehérje jelenlétére nincs szükség. Ez élesen különbözik a konjugációs MAPK (Fus3) példájától: a Fus3 foszforilálásához intakt dokkoló kölcsönhatás a Ste7 enzimhez nem elégséges, de szükséges feltétel. A Ste7→Fus3 információátvitel Ste5 jelenlétét is igényli. Ez genetikai alapú *in vivo* kísérleteken kívül szintén bemutatható tisztított, rekombináns komponensekkel *in vitro*. Nemrégiben egy *in vitro* MAPK-aktivitás detektálásán alapuló módszer segítségével megállapítottuk, hogy a Ste7→Fus3 foszforiláció közvetítéséhez szükséges Ste5 domén egy csupán ~200 aminosavat tartalmazó strukturális elem (Ste5_MS: Ste5_Miniscaffold) (5. ábra). Ennek a doménnek a szerkezetét szintén meghatároztuk, és további kísérletek során azt találtuk, hogy a Ste5_MS egyaránt képes Ste7 és Fus3 fehérjékhez is kötődni. A Ste7/Fus3/Ste5_MS tehát egy olyan fehérjekomplex, amelyben dokkoló és vázfehérje kölcsönhatások egymással együttműködve hoznak létre egy produktív MAPKK/MAPK enzim/szubsztrát komplexet. Jelenleg ennek az izgalmas, hárommolekulás komplexnek a biokémiai és szerkezeti analizisét végezzük.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetet mond Gráf László professzornak külföldi tanulmányai ideje alatt nyújtott kitartó támogatásáért, dr. Nyitray Lászlónak a kézirat elkészítésében nyújtott segítségével, valamint az ELTE Biokémiai Tanszék minden munkatársának. Az itt bemutatott munka a Kalifornia Egyetemen, San Franciscóban, dr. Wendell A. Lim laboratóriumában készült. Posztdoktori munkám során sok diákkal dolgoztam együtt; közülük külön is szeretnék megemlíteni néhányat: Roby Bhattacharyya, Caleb Bashor, Matthew Good és Grace Tang.

Irodalomjegyzék

- [1] Schaeffer, H. J., Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.*, **19** (4): 2435–2444.
- [2] Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410** (6824): 37–40.
- [3] Biondi, R. M., Nebreda, A. R. (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.*, **372** (Pt 1): 1–13.
- [4] Bhattacharyya, R.P., Remenyi, A., Yeh, B. J., Lim, W. A. (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**: 655–680.
- [5] Remenyi, A., Good, M. C., Lim, W. A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16** (6): 676–685.
- [6] Sharrocks, A. D., Yang, S. H., Galanis, A. (200) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **25** (9): 448–453.
- [7] Whitmarsh, A.J., Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.*, **23** (12): 481–485.
- [8] Breitkreutz, A., Tyers, M. (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends Cell Biol.*, **12** (6): 254–257.
- [9] Remenyi, A., Good, M. C., Bhattacharyya, R. P., Lim, W.A. (2005) The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol. Cell*, **20** (6): 951–962.
- [10] Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D.M., Elion, E. A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, **78** (3): 499–512.
- [11] Bhattacharyya, R. P., Remenyi, A., Good, M. C., Bashor, C. J., Falick, A. M., Lim, W. A. (2006) The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science*, **311** (5762): 822–826.



The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), one of the largest organizations in European life sciences, seeks to promote, encourage and support biochemistry, molecular cell biology and molecular biophysics throughout Europe in a variety of different ways. In this mission, FEBS announces a **Call for Applications** for

FEBS National Lectures

FEBS National Lectures are being established to commemorate the 40th anniversary of FEBS. These FEBS National Lectures are intended as Plenary Lectures that significantly enhance the quality of a scientific meeting, symposium or annual national scientific meeting of a Constituent Society.

Deadline for applications: October 1, 2007

Read more about the lectures in the Guidelines at <http://www.febs.org/index.php>.

If you have any queries, please contact the FEBS Congress Counsellor, Prof. Adam Szewczyk (E-mail: adam@nencki.gov.pl)

A Magyar Biokémia Egyesület 2007. évi vándorgyűlése

(Debrecen, 2007. augusztus 26–29.)

Előadás- és poszter-összefoglalók

E1 – Plenáris előadások

E1-01 Regulation and genetic application of transposable elements in vertebrates

Zs. Izsvák

Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

Transposable elements are “jumping genes” with an ability to change their genomic positions. Transposons make up significant fractions of genomes; for example, about 45% of the human genome is derived from transposon DNA. Transposons are self-regulated and interact with cellular host factors without producing serious levels of genetic damage. They are best viewed as molecular parasites that propagate themselves using resources of the host cell. Despite their parasitic nature, there is increasing evidence that transposable elements are a powerful force in genome evolution. These elements offer a new model to study DNA recombination in higher organism, as well as host-parasite interaction. Transposons are natural gene delivery vehicles that are being developed as genetic tools for several major areas of vertebrate genomics applications, including germ line transgenesis, somatic transgenesis (gene therapy), germ line insertional mutagenesis and somatic cell mutagenesis. My research follows two major lines of research: *i.* molecular biology and cellular regulation of DNA transposition in vertebrate cells using an ancient vertebrate transposon, member of the Tc1/mariner family, encoding a transposase protein necessary and sufficient for transposition, the Sleeping Beauty (SB) element as a research tool; *ii.* development of transposons as gene vectors for genome research in vertebrate models and for human gene therapy.

E1-02 Protein kinázok szelektivitása: kölcsönhatások az aktív helyen túl

Reményi A.,^{1,2} M. C. Good¹, R. Bhattacharya¹, W. A. Lim¹

¹ Dept. of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco, CA, USA; ² ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

Eukarióta jelátviteli folyamatokban a mitogénaktivált protein kinázok (MAP kinázok) egy háromszintű kinaszkaszádron és változatos effektor fehérjéken keresztül szabályozzák a sejt funkcióit. A kinázmodulok nagy mértékű hasonlóságot mutatnak élesztőtől az emberig. Érdekes módon a milliányi környezeti inger hatására bekövetkező válasz csupán kisszámú MAP kinázon mint mediátoron keresztül valósul meg (a *Saccharomyces cerevisiae* fajban 5, míg az emberben <15 MAP kináz fordul elő). A protein kinázok szubsztrátspecifitását az aktív helyet határoló aminosavak befolyásolják, bár a foszforilálható aminosav körüli szekvencia szigorú konszenzust csak ritkán mutat. Sok protein kináz az aktív helytől független mechanizmusokon keresztül választja ki célfehérjéit; például ún. dokkoló vagy vázfehérjékkel történő asszociációk révén. E kölcsönhatások alapvető módon befolyásolják az általuk felépített jelpályák aktivitását és az információáramlást a sejtmembrántól a sejtmagig. Az élesztőből származó MAP kinázok dokkoló és vázfehérjepeptidekkel alkotott komplexeit vizsgálva kimutattuk, hogy ezek az újszerű kölcsönhatási mechanizmusok miként építenek fel változatos, de mégis nagymértékű specifitással működő jelterjedési hálózatokat. Az aktív helytől független kölcsönhatási mechanizmusok újszerű stratégiát kínálnak MAP kinázok funkcióinak modulálására, ahol a hangsúly nem a kináz katalitikus aktivitásának gátlásán van, hanem a sokkal szelektívebb fehérje–fehérje interakciókon.

E2 – Proteomika

E2-01 Fehérjeexpresszió vizsgálata pszichiátriai kórképekben

Janáky T.¹, Szabó Z.¹, Szeliné Szomor J.^{2,3}, Szegő É.³, Kékesi K.⁴, Juhász G.⁴, Lévy Gy.⁵

¹ SZTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged; ² Kromat Kft., Budapest;

³ Dél-alföldi Neurobiológiai Tudásközpont, Szeged; ⁴ ELTE TTK, Anatómiai,

Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest; ⁵ EGIS Gyógyszergyár Rt., Budapest

A pszichiátriai betegségek (szorongás, depresszió) az idegrendszeri megbetegedések jelentős részét teszik ki. Az utóbbi évek eredményei alapján tudjuk, hogy a sejteket érő külső hatások nem szükségszerűen váltanak ki azonos celluláris válaszokat, azaz a sejtek előlétele, más szóval molekuláris hangolása erősen megszabja a válaszok irányát és intenzitását. A pszichiátriai betegségek egyik oka az idegrendszer sejteinek molekuláris szintű kóros áthangolódása, azon belül is a genom és a proteom megváltozása lehet. Ez részben a szignálrendszerek közvetítésével, részben direkt génexpressziós hatásra következhet be. A betegség állapotmodelljéül egy sok generáción keresztül tenyésztett szorongó egértörzset választottunk. Az előadásban a betegség hatására bekövetkező agyi fehérjeexpresszió-változás kimutatására alkalmas kvalitatív és kvantitatív proteomikai módszereket, illetve azok eredményeit ismertetjük. Bemutatjuk a 2D differenciál-gélektroforézissel eltérő szintűnek talált fehérjék LC/MS módszerrel alapuló azonosítását, valamint a „Protein Expression System” nanoUPLC-QTOF-MS rendszer (Waters) alkalmazását.

E2-02 BGP-15 kötőfehérjék azonosítása MALDI/TOF/TOF tömegspektrometriás úton

Sümegei B., Márk L., Ohmacht R.

PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Az O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinamid-oxim (BGP-15) védő hatásának bizonyult számos betegségben, ugyanakkor ez idáig nem tudtuk meghatározni a konkrét intracelluláris célmolekulákat, melyek fele-

lősek a citoprotektív hatásért. A tömegspektrometriás módszerek fejlődése ugyanakkor lehetővé tette, hogy azonosítsuk azokat a fehérjéket, amelyek egy szöveti extraktumból kötődnek az immobilizált BGP-15-molekulához. Megfelelő kontrollok alkalmazásával azonosítani tudtuk azokat a fehérjéket, melyek kötődése specifikus volt. Ezek közül jó néhány a citoskeletális rendszer tagja, mint például az α -aktin, miozin-1, miozin-4, Miozin-8 polipeptidek, RCSD 69% CapZIP-homológ (AAS99235.1), Kif21b (*kinesin like protein*), a kinezin nehéz lánc 5C izoformája és a mikrotubulinkapcsolt Ser/Thr kináz 4. Továbbá számos fehérjét azonosítottunk, melyek szerepet játszhatnak a vezikuláris transzportban, mint például a Rab34, Rab39, Rah, Rho-GTPáz aktiváló fehérje 7, a rhophilin-2 (RhoA-kölcsönható protein) és a Gbas-NIPSNAP2 (SNAP-25-homológ). Ezek az adatok jelezték, hogy a BGP-15 befolyásolni tudja a citoskeletális rendszer működését, valamint a jelátvitelben és a vezikuláris transzportfolyamatokban fontos G-fehérjék aktivitását. Ugyanakkor további funkcionális tesztek szükségesek annak bizonyítására, hogy milyen körülmények között mely fehérjén keresztül fejt ki a BGP-15 védő hatását.

E2-03 A C-faktor-szignálmolekula hatása az A-faktor-regulonra *Streptomyces griseus* fajban

Birkó Zs.¹, Medzihradzky K.², Buzás K.², Szájlí E.², Kele Z.³, Penyige A.¹, Biró S.¹

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

Kutatócsoport, Szeged; ³ SZTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged

A *Streptomyces* Gram-pozitív, fonalas növekedésű, szaprofita talajbaktériumok. Spóráképzéssel végződő összetett életciklusuk számos másodrendű metabolit termelésével jár együtt. *S. griseus* fajban a légmécéliumképzést és az antibiotikumtermelést szabályozó regulációs kaszkádok működésének bekapcsolásában kulcsfontosságú regulátormolekula a mikrobiális hormonnként ható A-faktor. A differenciálódás fehérjetermésztető, extracelluláris regulátora az intézetünkben azonosított C-faktor,

mely szilárd táptalajon a C-faktort nem termelő *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzs légmécéliumot nem képző (kopasz), A-faktort nem termelő mutánsában légmécélium-képzést indukál, illetve befolyásolja a sporuláció és antibiotikumképzés folyamatát. Jelenlegi munkánk során proteomikai analízis keretében a fent említett vad típusú törzs, a kopasz mutáns és annak C-faktort kis kópiaszámban hordozó transzformánsának extracelluláris expressziós mintázatát hasonlítottuk össze, annak kiderítésére, hogy a C-faktor mely gének átírását szabályozza, melyek bekapcsolása légmécélium-képzéshez és az antibiotikumtermelés fokozásához vezet. A kísérlet során 50 fehérje került MALDI-TOF analízisre, de a *S. griseus*-adatbázis hiánya miatt csak kilencet sikerült azonosítani; hat csak a vad típusú törzsben és a transzformánsban volt kimutatható, míg a mutánsból teljesen hiányzott. Az eredmények felvetették azt a kérdést, hogy az A-faktor és a C-faktor a szignáltranszdukciós útvonalban milyen kapcsolatban vannak egymással. A vad típusú törzs és a transzformáns folyékony tenyésztésben azonos mennyiségű A-faktort sikerült detektálni. Ez azt jelenti, hogy a C-faktor hatására a mutánsban helyreállt az A-faktor bioszintézise. A C-faktor tehát képes a *S. griseus* fajban kulcsfontosságú A-faktor termelését befolyásolni annak ellenére, hogy a gén az adott törzsben nem mutatható ki. A morfológiai és az ezzel összefüggő fiziológiai differenciálódás bekapcsolásában, illetve az ezt követő folyamatok szabályozásában valószínűleg több, egymással kapcsolódó és egymásra ható regulációs rendszer működik közre.

E2-04 Glikoproteomika alkalmazása a rákos megbetegedések vizsgálatában

Krenyác L.¹, Ozohanics O.¹, Kremmer T.¹, Drahos L.¹, Ludányi K.², Vékey K.¹

¹MTA Kémiai Kutatóközpont, Budapest; ²SE, Gyógyszerészeti Intézet, Budapest
A bioanalitikai eszközök napjainkban egyre nagyobb szerepet töltenek be a klinikai kémiában. Számos proteomikai marker ismert, amelyek döntő többsége glikozilált fehérje (glikoprotein). A különböző glikoformok biológiai szerepe, szerkezete, változatossága azonban nem vagy csak alig ismert. Kutatásaink célja egy szérumban glikoprotein (AGP) glikozileződési mintázatának meghatározása és annak vizsgálata, hogy a mintázat rákos megbetegedés esetén milyen változásokat mutat. A vizsgálathoz különböző személyektől származó AGP-mintát használtunk fel, melyek egészséges, ováriumtumoros, bőrrákos, illetve limfómás betegektől származnak. A glikoproteint tripszinnel emésztettük, és a képződő glikopeptideket folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria és tandem tömegspektrometria segítségével azonosítottuk. Sokváltozós statisztikai módszerek alkalmazásával megállapítottuk, hogy az oligoszacharidok az egyes mintákban (egyezi minták) jellemző és egymástól eltérő eloszlást mutatnak. Megvizsgáltuk, hogy az oligoszacharideloszlás milyen mértékben jellemzi a szervezet állapotát. Megállapítottuk, hogy daganatos betegségekben az AGP-molekula szénhidrátszerkezetében malignus folyamatokra utaló változások mutathatók ki, a glikozileződés a betegségre jellemző mintázatot mutat. (OTKA T062727, MediChem2 NKFP 1/A/005/04, Jedlik Ányos pályázat, Bolyai János Ösztöndíj)

E2-05 Szérumimmunprofil meghatározása antigén *microarray chipen* történő komplementaktiváció segítségével

Papp K.¹, Végh P.¹, Erdei A.^{1,2}, Prechl J.²

¹ELTE TTK, Immunológiai Tanszék, Budapest; ²ELTE-MTA Immunológiai Kutatócsoport, Budapest

A nagy sűrűségű fehérjearray-rendszerek megjelenése lehetővé teszi antigén-ellenanyag kapcsolatok számainak vagy ezreinek egyidejű vizsgálatát. A humorális immunrendszernek, mely a plazmaproteom legnagyobb változatosságú rendszere, *microarray* alapú vizsgálata lehetővé teszi az adaptív immunitás összetettségének hatékonyabb jellemzését és megértését. Az ellenanyagok – az mellettük más felismerő molekulák – az immunrendszer ősből, veseszületett enzimaszkádját, a komplement-rendszert is aktiválják. Ennek eredményeképpen kovalensen kötött komplementkomponensek jelölik meg az aktiváció környezetében található molekulákat. Az ellenanyagprofil meghatározásának hagyományos módszereit módosítva kialakítottunk egy, a komplementrendszer működésének egyidejű mérésére is alkalmas *microarray* alapú technikát. Megfelelő szérumgyűjtéssel és -alkalmazással a *microarray* felszínéhez kapcsolódó komplement C3 fragmentumai fluoreszcens ellenanyagokkal kimutathatók. A rendszert komplementgátló szerek, komplementhiányos állatok, valamint különböző immunológiai állapotú emberi szérummin-ták felhasználásával is jellemeztük. Az ellenanyagok kötődésének és a komplementfragmentumok lerakódásának együttes mérése és értelmezése részletesebb, funkcionális képet ad a szérumban zajló kölcsönhatásokról. A *microarray chipen* történő komplementaktiváció segíthet a komplementrendszer kölcsönhatásainak proteomikai szintű meghatározásában, valamint az adaptív immunrendszer funkcionális jellemzésében.

E2-06 Biomarkerek kutatása antitest alapú proteomika segítségével

Kádas J., Guttman A., W. S. Hancock, W. Hempel, M. Kuras, N. Tardieu, A. Jullien, C. Malderez, Élesné Tóth K., B. L. Karger, Takács L.

BioSystems International Kft., Budapest

Új, betegség-specifikus fehérje-biomarkerek felfedezése és hasznosítása új lendületet adhat a klinikai diagnosztikának, illetve a betegségek kezelésének, valamint felgyorsíthatja a komplex gyógyszerfejlesztéseket és -validálási eljárásokat. A betegség bizonyos előrehaladottsági stádiumainak megfelelően megjelenő biomarkerek lehetővé teszik a betegségek kimutatását korábban, mint ahogy a tüneteknek megfelelően, valójában azok láthatóvá válnak. Mindemellett hasznos eszközként szolgálnak új gyógyszerjelöltek hatásának rövidebb idő alatti és sokkal olcsóbb vizsgálatában, mint a jelenleg alkalmazott klinikai kipróbálások. Napjainkban a megfelelő validációs eljárással is kapcsolt hatékony biomarker-kutató platform hiányában ezek a törekvések meglehetősen visszafogottak. Habár a rendszeresen használt MS-profilozáson és rendszer-biológiai megközelítésekkel alapuló eljárások képesek lényeges betegség-specifikus jelölteket kimutatni, ezek a markerek általában abundáns fehérjék kimutatásán alapulnak, megfelelő specificitás hiányában vannak, ezért ritkán konvertálhatók megfelelő klinikai teszteké. Előadásunkban egy olyan, új biomarker-kutatási eljárásról lesz szó, amely magában foglal egy nagy átteresztőképességű monoklonális antitest alapú teljes, betegség-specifikus plazmaszűrési technológiát, valamint a kísérletben használt 10 000 monoklonális antitestet. Egy olyan nagy komplexitású, betegség-specifikus monoklonális antitest-könyvtár előállítását mutatjuk be, amely a megfelelő biomarkerek keresése során többször szűrhető, nagy átteresztőképességű ipari vagy szabványos klinikai laboratóriumi körülmények között konvencionális ELISA technika vagy antitest alapú *microarray* segítségével. Ilyen méretben e betegség-specifikus monoklonális antitestek hozzáférhetősége a bizonyított diagnosztikus potenciállal együtt jelentősen lerövidíti a biomarkerek felfedezése és a klinikai diagnosztika közötti átfutási időt.

E3 – A sejtciklus szabályozása

E3-01 A ciklinfüggő kinázok működését szabályozó mechanizmusok

Dudits D.

MTA SZBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged

A sejtosztódási ciklus folyamatának szabályozásában a ciklinfüggő kinázok (CDK-k) kiemelt szerepet játszanak. A lucernával végzett génlátási kísérletek növény-specifikus CDK enzimeket tártak fel. Ezek a kinázok növényekre jellemző ciklinkötő helyvel rendelkeznek. A szinkronizált sejteken végzett génexpressziós vizsgálatok tanúsága szerint a *Medicago Cdc2mSf* (Medsa; CDK2;1) aktivitása a mitotikus sejtekben mutatható ki. A 360 bázispár hosszúságú promotórrégió részletes vizsgálata azt mutatja, hogy ebben a szabályozó elemben egyaránt megtalálható az M-fázist szabályozó aktivátor elem, illetve az etilén és a sebzés hatásait érzékelő cis elemek. A sejtosztódás hormonális szabályozásában új szereplőként jelenik meg a nitrogén-monoxid, amely serkenketheti az auxinfüggő sejt-

osztódást és embriogén sejtek képződését, amelyek kapcsolódnak a CDK-aktivitás emelkedéséhez. A regulációs szerepet betöltő fehérjefoszforilációs állapot kialakításában a foszfatázok is meghatározó szerepet játszanak. A PP2A-foszfatáz-gátlás a mitotikus kinázaktivitást specifikusan növelve, és ezzel megszünt a koordináció a mitotikus fonalak szerveződése és a kromoszómakondenzáció között. A CDK fehérjék működését közvetlenül befolyásolhatják gátló fehérjék. A KIP-szerű fehérje (KRP) génjének izolálása lucernából lehetővé tette annak bizonyítását, hogy az inhibitorfehérje foszforilációja növelheti a gátló funkciót. Ezt a foszforilációt a kalciumfüggő fehérjekináz végezheti, és így egy új kapcsolati rendszer igazolható a kalcium-jelátvitel és a sejtciklus-szabályozás között. A lucerna CDK-komplexei szubsztrátumai között találjuk a retinoblasztoma-szerű fehérjét. Érdekes megfigyelés, hogy egyszerű fűfélékben kétféle retinoblasztoma-fehérje jelenléte igazolható, a kétszikű fajokban pedig csak egyetlen RBR-gén jelenlétét mutatják ki a vizsgálatok. Összegezve

megállapítható, hogy bár a növények esetében is rendszertanilag konzervált folyamatok szabályozzák a sejtek osztódását, egyre növekszik a kísérleti bizonyítékok száma a növény-specifikus folyamatokat illetően.

E3-02 A végből a kezdetbe

Sipiczki M.

DE TEK-TTK, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen

A sejtciklus önkényesen fázisokra osztott, bonyolult folyamatának befező eseménycsoportja a citokinezis és a sejtszeparáció. Állati sejtekben e kettő lépés egynek látszik, de a sejtfallal rendelkező élőlényeknél külön is válhatnak. A citokinezis során a sejt két – esetleg több – biológiai értelemben független utódsejté válik szét, amelyek fizikailag még együtt maradhatnak. Összetartja őket a citokinezis során képződő válaszfal vagy szeptum. Fizikai szétválásukra akkor kerül sor, amikor az elválasztó sejtfall/szeptum kettéhasad. A hasadási folyamat az M-fázis eseményeivel összehangoltan történik, számos transzkripció faktor és az általuk szabályozott gének működésének köszönhetően. A biztonságos hasításhoz szükség van a sejtvíz megfelelő átszervezésére, valamint a szekréciós folyamatok polarizálására is. A sejtszeparáció részben átfed a következő sejtciklus indulásával, teljes befejeződése elhúzódhat az S-fázis kezdetéig is. A soksejtű szervezetekben (növényekben, fonalas gombákban) el is maradhat. Az utódsejtek szétválásának eseményeit a *Schizosaccharomyces pombe* fajban sikerült a legalaposabban megismerni. A részletek feltárását a komplex kísérleti megközelítés tette lehetővé, amelyben kombinálódtak a fluoreszcens, immunfluoreszcens és elektronmikroszkópia, valamint a konvencionális és molekuláris genetika és a genomika módszerei. Az előadás áttekinti a legutóbbi kutatási eredményeket, és kísérletet tesz a szintézisükre.

E3-03 Az APC-komplex szerkezete és működése *Drosophila melanogaster* fajban

Deák P.

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

Az eukarióta sejtek sejtciklus-szabályozása gyakran a szabályozó fehérjék ubiquitin-függő lebomlásán keresztül valósul meg. A sejtosztódásban szerepet játszó, ubiquitin-függő proteindegradációs rendszer központi eleme az anafázisgyorsító komplexnek (APC) nevezett ubiquitin-protein ligáz. Az APC az eddig ismert legbonyolultabb felépítésű ubiquitin ligáz, amely legalább egy tucat alegységből áll. Az alegységek többsége evolúciósan konzerválódott, így strukturális és funkcionális homológjaikat kimutatták az élesztőtől, a magasabbrendű eukariótákon át, egészen az emberig. Noha

ismerjük az APC fő funkcióját és szabályozásának néhány elemét, számos fontos kérdés még megválaszolatlan a felépítésével és működésével kapcsolatosan is. Munkánk célja az volt, hogy azonosítsuk az APC alegységeit kódoló géneket, és előállítsuk ezek mutáns alléljait egy genetikailag jól kezelhető kísérleti rendszerben, a *Drosophila melanogaster* fajban. P-elem-inzerció mutagenézis, transzgenikus-RNS-interferencia és homológrekombinációs módszerekkel sikerült előállítani egy olyan kísérleti rendszert, amelyben először nyílik lehetőség az APC funkciójának részletes genetikai vizsgálatára egy soksejtű eukarióta organizmusban. A mutáns és RNS-interferenciavonalak fenotípusából, valamint az alegységek biokémiai vizsgálatából következtetni lehet az APC-komplex felépítésére, valamint az egyes alegységek szerepére. A mutánsok és a mitotikus szabályozó gének közötti genetikai interakciók természete pedig utal a sejtciklus szabályozásának eddig rejtett részleteire. Az előadás eddigi eredményeinket foglalja össze.

E3-04 A sejtciklus zavarai daganatokban

Kopper L.

SE, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A sejtek keletkezése és osztódás útján történő megszűnése közötti szakasz a sejtciklus (ami egy sejtre vonatkoztatva nem, csak az egész populációt tekintve ciklikus jelenség). A sejtciklus egyirányú utca, melyben rövidebb-hosszabb időre a sejt megállhat, differenciált sejtek esetében ez sokszor végleges leállást jelent. A sejtciklus szabályozásának pozitív elemei a ciklinek és a ciklinfüggő kinázok, negatívak pedig az e kinázokat gátlók. Zömmel ezeken keresztül működik az az ellenőrzés, amely azt biztosítja elsősorban, hogy „hibás” genetikai állomány ne kerüljön a leánysejtekbe, a hiba az osztódás előtt még kijavításra kerüljön, vagy sikertelenség esetén a sejt pusztítsa el önmagát. Az ellenőrzőpontok elégtelensége a génhibák felhalmozódásához, genomikai vagy kromoszóma-instabilitáshoz, a daganatkeletkezés esélyének jelentős növekedéséhez vezet. Gyakorlatilag nincs olyan emberi daganat, amelyben a sejtciklus szabályozási zavarával ne találkozoznánk. Az egyik legkritikusabb eseménysor az osztódás során megy végbe, és nem csoda, hogy ennek elemei terápiás célpontként is szerepelhetnek. A mikrotubulusokra ható szerek – vinca alkaloidok, taxánok – mellett előtérbe kerültek a kinezinek, az Aurora-kinázok és a polo-szerű kinázok. Ezek működéséről és gátlhatóságukról is szólnunk. A sejtek osztódási képessége, ezzel összefüggően sok esetben az összejtek vagy daganatsejtek (vagy daganatos összejtek) halhatatlansága természetesen más tényezőktől is függ, ilyenek például a telomerek hosszát befolyásoló molekulák.

E4 – Genometabolizmus és -dinamika: *in silico* és *in vitro* megközelítések

E4-01 Maszkírozott egyszál-folytonossághiányok az eukarióta genomban

Székvolgyi L.¹, Rákósy Zs.², Bálint B. L.³, Kókai E.⁴, Vereb Gy.¹, Bacsó Zs.¹, Balázs M.¹, Dombrádi V.⁴, Nagy L.³, Szabó G.¹

DE OEC, ¹Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen; ²Megelőző Orvostani Intézet, Debrecen; ³Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen;

⁴Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A 30-150 kb méretű DNS-régiókat formáló hurkok a kromatin szerkezeti hierarchiájának izgalmas, számos funkcionális relevanciával bíró, de feltáratlan szintjét alkotják. Közvetlenül megfigyelhetők az ún. *halo*-kísérletek során, és kromatinfragmentációs jelenségek kapcsán is, mind apoptotikus sejtek, mind – intenzív proteolitikus körülmények között – normál sejtek esetében. Utóbbiakból kiindulva, az ionos detergens és proteáz, valamint kelátor jelenlétében izolált DNS ~50 kb átlagos méretű, szemben az agarózblokkban lizált sejtekből származó DNS megabázisos méretével, és ez feltehetően a hurkok rögzítési pontjainál történő törés/hasadás eredménye. Az agarózmatrix nem pusztán a pipettázás stb. során bekövetkező mechanikai töredeződéstől védi meg a DNS-molekulákat, hanem – elsősorban – megakadályozhatja a deproteinizáció nyomán egyébként bekövetkező letekeredést. Az itt bemutatott, közlés alatt álló adataink alapján feltételezzük, hogy egyszál-folytonossághiányok (*nick*) határolják a hurkokat, és ezen, mindkét szál a hurkok határánál halmozódó nukleinsav-szakadások mentén ds-fragmentáció következik be, amint megszűnik a kromatinba szervezett állapot. A DNS fragmentálódását követni tudjuk mezőinverziós gélelektroforézissel (FIGE), illetve a *comet-assay* kombinációjával. Utóbbi kísérletekben ~50 kb átlagos méretű DNS-szakaszokat magában foglaló granulumok figyelhetők meg. A hasadási pontokat *in situ nick*-transzláció segítségével még a mag lízise előtt (a sejt permeabilizálása után) megjelölve, szintén a hurkok átlagos méretének megfelelő számú fluoreszcens pöttyök által alkotott pontmintázat tehető láthatóvá. Egy ~500 kb hosszúságú szondával FISH kísérleteket végeztünk

megállapítottuk, hogy a szomatikus rekombinációs forrópont, az MLL bcr diszkrét módon fragmentálódik a *haloképződés* során, hurokméretű szakaszokat formálva. A fragmentáció mértéke más a gént átrendezett konfigurációban tartalmazó ML-1 sejtek esetében, illetve centromerikus zóna esetén, a különbségek azonban nem a *nick*-gyakorisággal, hanem ribonukleoprotein-struktúrák általi maszkírozottságuk epigenetikusan meghatározott különbségeivel fügnek össze.

E4-02 A növényi NMD rendszer működése és az eukarióta NMD rendszerek evolúciója

Silhavy D.¹, Kerényi Z.¹, Mérai Zs.¹, Kertész S.¹, Gyula P.², Barta E.¹, Nagy F.²

¹MBK, Gödöllő; ²MTA SZBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged

Az ún. *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) egy eukarióta minőségbiztosítási rendszer, mely a korai stopkodont (PTC) tartalmazó mRNS-eket bontja le, ezáltal megakadályozza a csonka fehérjék képződését. Az NMD a hibaelhárító funkció mellett számos vad gén szabályozásában is szerepet játszik. Az NMD *Drosophila* fajban, egérben és növényekben is létfontosságú. A UPF1, 2 és 3 fehérjék élesztőben és emlősökben is nélkülözhetetlenek az NMD működéséhez, ugyanakkor az emlősök NMD-folyamatához a UPF faktorokon kívül az SMG-1, 5, 6 és 7 fehérjék, illetve az *exon junction complex* (EJC) fehérjéi is szükségesek. Az NMD cisz elemei élesztőkben és emlősökben eltérőek: élesztőkben a hosszú 3'-UTR, míg emlősökben a 3'-UTR-ban található intronok váltanak ki NMD-folyamatot. Bár az élesztő- és humán-NMD rendszer jól jellemzett, a növényi NMD működéséről szinte semmit sem tudunk. Csoportunkban kidolgoztuk a növényi NMD tesztrendszerét, majd kimutattuk, hogy növényekben a hosszú 3'-UTR, illetve az intron alapú NMD is aktív. Kidolgoztuk a vírus indukálta géncsendesítésen alapuló, az NMD transz faktorainak gyors azonosítására is alkalmas géninaktivációs rendszert. Igazoltuk, hogy a UPF1, 2, 3 fehérjék, illetve az SMG-7 növényi ortológjai szükségesek mind a hosszú 3'-UTR alapú, mind az intron alapú NMD folyamatához. Bizonyítottuk, hogy az

Y14 EJC faktor csak az intron alapú NMD kiváltásához szükséges. Kimutattuk, hogy a növényi NMD autoregulált folyamat. Eredményeink alapján valószínű, hogy az eukarióták közös őseben már egy komplex, autoregulált NMD rendszer működött, amely mind a hosszú 3'-UTR, mind az intron alapú NMD-folyamatra képes volt. Adataink alátámasztják azt az elméleti modellt, amely szerint az eukarióta őseben az intronok gyors elszaporodását az NMD-folyamatban játszott cisz faktor szerepük tette lehetővé.

E4-03 A humán dUTPáz enzim mechanizmusa

Tóth J.¹, Varga B.¹, Kovács M.², Málnási-Csizmadia A.², Vértessy G. B.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A humán dUTPáz mechanizmusát nagy időfelbontású oldatfázisú kinetikai módszerekkel vizsgáltuk, hogy a már ismert atomi szerkezetekkel együtt értelmezve részletes képet kapjunk e minden sejtben nélkülözhetetlen enzim működéséről. A dUTPáz a dUTP pirofoszforolízisét katalizálja, és ezzel szabályozza a sejtekben az uracil DNS-be való beépülésének arányát. A DNS-ben lévő uracil olyan káros DNS-javítási útvonalakat indít el, amelyeknek a végeredménye sejthalál is lehet. A dUTPáz biológiai, illetve rákkutatásban felmerült szerepét tekintve fontos tehát megértenünk, hogy az enzim hogyan tölti be sejtbeli funkcióját. Kísérleteinkben számos gyorskinetikai és egyensúlyi módszert alkalmaztunk. Rekombináns dUTPázba triptofán-szenzort építettünk, és ennek segítségével detektáltuk a szubsztrát kötéseivel és a dUMP, PP_i termékek felszabadulásával járó konformációváltozásokkal fluoreszcens megállított áramlásos (*stopped-flow*) rendszerben. A protonfelszabadulást – szintén hidrolízis termék – pH-indikátor abszorbanciaváltozásával követtük egyensúlyi állapotbeli és megállított áramlásos mérésekben. A ciklus kémiai lépését kioltásos áramlásos (*quench-flow*) módszerrel γ -³²P-dUTP szubsztrátot használva detektáltuk. Az eredmények jelenlegi szintézisében egy olyan mechanizmus bontakozik ki, amelynek főbb tulajdonságai: *i.* gyors (diffúziólimitált) szubsztrátkötés; *ii.* lassú, irreverzibilis és sebességmeghatározó hidrolízis lépés ($k_{\text{obs}} = 3-8 \text{ s}^{-1} = k_{\text{cat}}$); *iii.* a termékek gyors (700 s^{-1}) disszociációja az enzimről. A reakcióciklusban az aktív helyre záródó és a kötött nukleotiddal kölcsönhatásban lévő „kar” olyan konformációváltozásokon megy keresztül, amelyek a dUTP hidrolíziséhez és/vagy a termékfelszabaduláshoz nélkülözhetetlenek. Jelenleg folyó kísérleteink a karban helyet foglaló aminosavak szerepének tisztázására irányulnak. (EMBO, HHMI, GVOP, EU-FP6)

E4-04 A specifikus DNS-felismerés kezdeti szakaszának vizsgálata számítógépes módszerekkel

Tóth-Petróczy Á., Simon I., Fuxreiter M.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A DNS-sérülések/-szakaszok specifikus felismerése, a hibák eltávolítása létfontosságú a sejtek számára. Ezen összetett folyamat kulcs lépése a szubsztrát DNS-szekvencia azonosítása. A kiválasztást nehezíti, hogy a megfelelő DNS-helyet/-szakaszt a hozzá hasonló szekvenciák órási felesleg mellett kell megkötni. A specifikus fehérje-DNS-komplekx létrehozásában a fehérjeoldallánccok és a DNS-bázisok között kialakuló hidrogénkötés-mintázat mellett fontos szerepet játszanak a DNS torzulásai, valamint a kötődés során felszabaduló ionok és vízmolekulák is. A felismerés kezdeti szakasza kísérleti módszerekkel nehezen vizsgálható, ezért számítógépes szimulációk segítségével tanulmányoztuk azokat a molekuláris tényezőket, melyek a specifikus DNS-helyek kiválasztásának korai fázisát vezérlik. Elemeztük *i.* a fehérje-DNS-határfelületen elhelyezkedő víz; *ii.* a DNS-szekvenciák flexibilitásának; valamint *iii.* a kétértékű fémionoknak a szerepét. A BamHI restriktív endonukleázon, GU bázispárt javító uracil-DNS glikozilázon, valamint timin dimert hasító endonukleázon végzett számítások alapján arra következtettünk, hogy DNS körül elhelyezkedő vízmolekulák ún. „hidratációs ujjlenyomatként”

szolgálnak a felismerő fehérje számára. Kimutattuk, hogy a bázishibák azonosításában azok kitétetett flexibilitása játszik döntő szerepet. Kvantumkémiai számítások segítségével értelmeztük a Mg²⁺- és Mn²⁺-ionok eltérő viselkedését a DNS-szekvenciák kiválasztásában. Mindezek alapján javaslatot tettünk a specifikus DNS-felismerés korai szakaszának általános modelljére.

E4-05 A restriktív endonukleázok hasítási mechanizmusának vizsgálata szimulációs módszerekkel

M. Letif, P. Kulhanek, Simon I., Fuxreiter M.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A restriktív endonukleázok a baktériumok védekező rendszerének részei, melyek feladata az idegen (vírus) DNS-szekvenciák felismerése és hasítása. A PD...D/ExK családba tartozó enzimek alacsony szekvenciahomológijuk ellenére hasonló harmadlagos szerkezettel rendelkeznek, és működésük kétértékű fémionok jelenlétét igényli. Kristallográfiai és biokémiai eredmények alapján nem egyértelmű azonban, hogy a foszfoészter-kötés hidrolízisének katalíziséhez hány fémion szükséges, és mi ezeknek a kofaktoroknak a pontos szerepe a reakció során. A restriktív endonukleázok egységes katalitikus modelljének kidolgozásához szükséges meghatározni az egyes fémionok hozzájárulását az aktiválási gát csökkentéséhez, valamint azonosítani a nukleofil generálásában szerepet játszó csoportokat. A különböző mechanizmusok katalitikus hatékonysága számítógépes szimulációkkal vizsgálható hibrid kvantumkémi/molekulamechanikai módszerek alkalmazásával. Munkánk során a BamHI enzim DNS-hasítási reakciójának lehetséges útvonalait tanulmányoztuk: *i.* általános bázis közreműködésével; *ii.* a támadó nukleofillal hidrogénkötésben lévő szomszédos vízmolekula bevonásával; valamint *iii.* a tömbfázisból érkező nukleofillal alkalmazva. Vizsgáltuk a BamHI enzim specifikus DNS-szubsztráttal képzett komplexében megfigyelt két fémion stabilitását. Megállapítottuk, hogy a támadó nukleofillal kapcsolatban lévő fémion kevésbé mozgékony, mint a távozó csoporthoz kötődő, ami eltérő katalitikus hozzájárulásukra utal. Hipotetikus, egy fémion tartalmazó enzimekben meghatároztuk a hasítási reakció energiagátját és ennek alapján az egyes fémionok katalízishez történő hozzájárulását is. A fémionok szerepének kísérleti vizsgálatához, fémion-helyettesítések mérésekhez kiszámítottuk a fémionok kötődési szabadentalpiáit is a BamHI aktív centrumában. Mindezek alapján javaslatot tettünk a BamHI enzim katalitikus mechanizmusára.

E4-06 Az LCR16a genetikai elem szerepe a kromoszomális evolúcióban

Symmons O., H. de Bousac, Várádi A., Arányi T.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A genomevolúció és a fenotípusváltozások közötti összefüggések felderítésének egyik eszköze a mendeli betegségek vizsgálata. Kísérleteink során ezért a monogénes betegségekért felelős *ABCC6* és *PKD1* géneket és ezek pszeudogénjeit vizsgáltuk, amelyek a 16-os kromoszóma rövid karján találhatók. Célunk a pszeudogének kialakulásának, valamint a gén-duplikáció következményeinek felderítése volt. Kimutattuk, hogy *ABCC6* pszeudogének más főemlősben is megtalálhatók, de ezek a humán változatoktól függetlenül alakultak ki. Megállapítottuk, hogy mindegyik pszeudogén az LCR16a genetikai elemmel asszociált. Az LCR16a a 16-os kromoszóma leggyakoribb duplikációja, és feltételezhető, hogy felelős a pszeudogének keletkezéséért. Az így létrejött duplikációk humán specifikus transzkriptumok kialakulását eredményezték. Adataink továbbá arra utalnak, hogy az *ABCC6* és *PKD1* pszeudogénjei génonverzió révén mutációkat okoznak a funkcionális génekben, illetve nagyobb léptékű kromoszomális átrendeződéseket közvetítenek. Eredményeink hozzájárulnak a humán genom jelenleg is zajló evolúciójának jobb megértéséhez.

E5 – Szerkezeti biológia

E5-01 Az aminosav-összetételek szerepe a fehérje-térszerkezetek meghatározásában

Simon I., Dosztányi Zs., Fuxreiter M., Tusnády E. G.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A genom projektek alaposan megváltoztatták a fehérjék térszerkezetéről alkotott elképzelésünket. Először azzal leptek meg, hogy azok a fehérjék, amelyek csak membrán jelenlétében, azon egyszer vagy többször áthaladva képesek feltekernedni, a kódolt fehérjék több mint egynegyedét teszik ki. Később kiderült, hogy a „vízoldható” fehérjék igen jelentős része csak egyéb makromolekulák, fehérjék, nukleinsavak felszínén képesek felvenni

ni térszerkezetüket. Sőt, egy sor fehérje anélkül fejt ki aktivitását, hogy időben állandó térszerkezetet venne fel, és igen sok globuláris fehérje tartalmaz gyakran igen hosszú, rendezetlen szegmenseket. Úgy látszik, a régóta megoldatlan kérdés, hogyan határozza meg a szekvencia a térszerkezetet, tovább bonyolódott, de a különböző szerkezeti osztályok – mint a vízoldható rendezett, rendezetlen, részlegesen rendezett, transzmembrán fehérjék – szerkezetszerveződésével kapcsolatos közös elemek figyelembe véve közelebb kerülhetnek a megoldáshoz. Az előadás arra igyekszik bizonyítékokat mutatni, hogy az elsődleges szerkezet nem közvetlenül határozza meg a térszerkezet legfontosabb sajátosságait, ha-

nem a polipeptidlánc, annak szegmensei, illetve nem összefüggő részal-mazai aminosav-összetételén keresztül, míg a részletes szekvenciainfor-mációra csak a végső finom részletek meghatározásánál van szükség.

E5-02 Rend és rendezetlenség: fehérjék atomi szintű vizsgálata NMR-spektroszkópiával

Perczel A.^{1,2}, Bodor A.¹, Gáspári Z.²

ELTE TTK, ¹MTA Fehérjemodellező Kutatócsoport, Budapest;

²Kémiai Intézet, Budapest

A fehérjék atomi szintű térszerkezete szorosan összefügg azok biológiai funkciójával. A XX. század utolsó évtizedétől kezdve az NMR-spektroszkópia előretörésével egyre több kísérleti adat mutatja, hogy a szerkezet mellett a fehérjék dinamikus viselkedése is elengedhetetlen az eredményes és hatékony működéshez. Legújabbban egy olyan egységes kép kezd kibontakozni, melyben az ismert fehérjék a jól feltekeredett téralakított mozgékonyabb doméneként át egészen a napjainkban előtérbe került, ún. rendezetlen fehérjékig egy teljes „mozgékonyosági” skálán helyezhetők el. Az előadás az NMR-spektroszkópiát mint a szerkezet, a dinamika és a feltekeredés atomi szintű vizsgálatára alkalmas módszert mutatja be saját kutatásainkból vett példákban.

E5-03 A „PAF” antifungális fehérje NMR-szerkezete és -dinamikája

Batta Gy.¹, Sándor Sz.¹, U. Binder², Kövér E. K.³, Gáspári Z.⁴, Barna T.¹, Leiter É.⁵, Pócsi I.⁵, F. Marx²

¹DE TEK-TTK, Biokémiai Tanszék, Debrecen; ²Innsbruck Medical University, Biocenter, Div. of Molecular Biology, Innsbruck, Austria, ³DE TEK-TTK, Szeretetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen; ⁴ELTE Kémiai Intézet, Budapest; ⁵DE TEK-TTK, Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék, Debrecen

A *Penicillium chrysogenum* által termelt, kis molekulatömegű (6,2 kDa), ciszteinben gazdag, bázikus, antifungális fehérje (PAF) gombaellenes hatásmechanizmusának megértése új gombaellenes gyógyszerek fejlesztéséhez vezethet. Mivel a PAF kristályosítása eredménytelen volt, az oldat-fázisú térszerkezetet NMR-módszerekkel határoztuk meg. Két- és háromdimenziós nitrogénlecsatolt, illetve editált TOCSY és NOESY spektrumokat mértünk 250 µl térfogatú, 1,6 mM koncentrációjú ¹⁵N-jelölt natív PAF-mintán. Ez 100%-os főlánc- és mintegy 80% oldallánc-NMR-jelhozzárendelést eredményezett. A ¹J_{NH,Hα} spin-spin csatolásokat a 2D ¹⁵N-HSQC, míg a ¹³Cα jelek azonosítását – természetes izotópgyakoriságban – a 2D ¹³C-HSQC spektrumból nyertük a másodlagos struktúra meghatározásához. A térszerkezet meghatározását a 2D NOE csúcsok ATNOS/CANDID programmal végrehajtott automatikus asszignálása után a CYANA 2.0 NOE szerkezetszámító szoftverrel végeztük. Ezt követően a NOE és a ¹⁵N-relaxációs dinamikából nyert S²-értékekből a MUMO módszerrel valószínű ensemble szerkezeteket kaptunk. Az 1AFP antifungális fehérjével a mindössze 47% szekvenciaazonosság ellenére a PAF meglepő hasonlóságot mutat: öt antiparallel β-redőt alakít ki: β-hordót, amit diszulfidhidak stabilizálnak. A jól ismert ¹⁵N-relaxációs kísérletekből 3 ns globális korrelációs idő származtatható, ami kompakt, monomer szerkezetre utal. Az ¹H és ¹⁵N CSA/DD relaxációsinterferencia-jelek és a víztelítési kísérletek jól azonosítják a PAF β-redőit összekötő flexibilisebb linker régiókat. (OTKA TO 42567, EU-NMR Contract #RII3-026145 / CERMI3 projektátogatások: 700 MHz-es mérések)

E5-04 A rendezetlenség szerepe fehérje-fehérje kölcsönhatásokban

Tompa P.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az utóbbi néhány évben bebizonyosodott, hogy a klasszikus szerkezet-funkció paradigma nem általánosan érvényes, mivel számos fehérje jól definiált 3D szerkezet nélkül funkcionál. A rendezetlenség általánosan elterjedt jelenség, a rendezetlen fehérjék számos létfontosságú sejt folyamatban alapvető szerepet töltenek be, legnagyobb mennyiségben jelátviteli és transzkripció szabályozó folyamatokban fordulnak elő. A rendezetlen fehérjék funkciójukat leggyakrabban molekuláris felismerés révén látják el: a partnerhez való kötődéskor részleges vagy teljes rendeződésen mennek keresztül. Munkánkban a rendezetlenség fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszott szerepét tettük részletes vizsgálat tárgyává. Kimutattuk, hogy a fehérjék rövid lineáris felismerő motívumai (SLM) gyakran lokálisan rendezetlen régióba esnek, ami kölcsönhatási hálózatokban hatékony evolúciós kapcsolókat biztosíthat. A kötő motívumok a kötődés során rendezetté válnak, másodlagos szerkezeti elemzések azt mutatja, hogy gyakran a szekvenciájukból kódolt, és nem a partner által meghatározott módon. A rendezetlen szakaszok felismerő motívumként való használatának előnyeit az

is mutatja, hogy a rendezetlenség lényegesen magasabb a nagyszámú partnerrel kölcsönhatásba lépő fehérjék (*hub*-ok), mint a kölcsönhatási hálózatok egyéb fehérjei esetében. A kölcsönható felszín atomi szintű elemzése azt mutatja, hogy a rendezetlen fehérjék sajátos felismerési stratégiát alkalmaznak, amennyiben hidrofób aminosavakat exponálják, nem feltekeredés, hanem a partner kötésére használják. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a rendezetlenség evolúciós előretörésére alapvetően a fehérje-fehérje kölcsönhatásban betöltött szerepe szolgálhat magyarázatul.

E5-05 Intramolekuláris kölcsönhatás-hálózatok feltárása egy proteázinhibitor fehérjében kombinatorikus mutagenézissel és fág bemutatással

Szente B.¹, Patthy A.¹, Gáspári Z.², Kékesi K.³, Gráf L.¹, Pál G.¹

ELTE TTK, ¹Biokémiai Tanszék, Budapest; ²Kémiai Intézet, Budapest;

³Élettani és Neurobiológiai Tanszék, Budapest

A pacifastin család ciszteinben gazdag, ~35 aminosavas proteázinhibitor motívumát izeltlábúakban fedezték fel. A család két rokon alcsoportra osztható, a belső mag szerkezete szerint. Az I. csoportban a motívum a Lys10-Trp26, míg a II. csoportban a Phe10-Ala26 aminosavpárok köré szerveződik. Az I. típusú inhibitorok különös taxonspecifitással bírnak: az idetartozó izeltlábú-tripszininhibitorok szinte inaktívak magasabb rendűek tripszinjein. Az I. típusú SGPI-1 taxonszelektív, míg a II. típusú SGPI-2 nem. Egyedi mutációkkal nem sikerült feltárni ennek pontos okát. Egy teljes körű kombinatorikus mutagenézis sémával és fág bemutatással sikerült megtalálnunk a magyarázatot. Egyetlen kísérletben előállítottuk az összes lehetséges SGPI-1/SGPI-2 kimerát. Ezt a könyvtárat fágon jelenítettük meg, és szilárd fázisra kötött szarvasmarha- és ráktripszinen szelektáltuk. A szelektált klónok szekvenciaanalízise kimutatta, hogy az SGPI-1 taxonszelektivitását a Lys10-Trp26 magnak egy felszíni hurokkal létrejövő intramolekuláris kölcsönhatása okozza. A hurok 3 aminosavjának SGPI-2 típusra cserélésével olyan inhibitorot hoztunk létre, mely megőrzi a jellegzetes „taxonszelektív” magot, de egyformán aktív izeltlábú és gerinces fajok tripszinjein. Eredményeink megkérdőjelezték azt a széles körben elterjedt nézetet, miszerint a proteázinhibitorok szelektivitását egyedül a proteázzal kölcsönható felszíni hurok biztosítaná. Emellett fontos, új és általános törvényszerűségeket tártunk fel egy olyan molekulatípus szerkezeti-funkcionális összefüggéseivel kapcsolatban, mely típus méretét és dinamikai tulajdonságait tekintve a peptidok és a fehérjék határmezsgyéjén léteznek.

E5-06 A dUTPáz enzimcsalád szerkezeti, funkcionális és élettani jellemzése

Barabás O., Németh-Pongrácz V., Békési A., Muha V., Zagyva I., Varga B., Takács E., Kovári J., Vértessy G. B.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az élővilág egyik érdekes paradoxona, hogy a genetikai információ stabil tárolásáért és hűséges továbbadásáért felelős nukleinsav makromolekula kémiaiailag reaktív, és normál élettani körülmények között is számos mutagen módosulást szenved el. Egyes DNS-hibák megelőzésében kulcsszerepet játszik a dUTPáz enzimcsalád, mely megakadályozza az uracil DNS molekulába való beépülését. Az enzim hiánya timinmentes sejtihalál okoz, és gátlása antimikrobiális és rákellenes terápiák újszerű stratégiáját kínálja. Csoportunkban a szerkezeti és a sejtbiológiai kiterjedt módszertanára támaszkodva prokarióta, retrovírális és eukarióta (fonalféreg, cernuszlé és humán) modelleken vizsgáljuk az enzim élettani szerepét és katalitikus működésének részletes molekuláris mechanizmusát. Azonosítottuk az enzim szabályozásáért felelős hálózat több szintjének elemeit. Szerkezet-funkció összefüggés-vizsgálataink tisztázták a reakció indításáért felelős nukleofil ágens kilétét, a reakció mechanizmusát, az enzimfehérje térszerkezetét és feltekeredésének folyamatát. A fehérje izoformáinak fejlődési állapottól függő szabályozása és sejtbeli lokalizációja poszt-transzkripcionális modulációra és egyedi nukleáris transzportra utal. Rendszerbiológiai eszközökkel térképezzük a dUTPáz kölcsönhatási fehérjehálózatát. Antagonisták szűrővizsgálatával újszerű vezérmolekulák azonosítására törekszünk. (HHMI, GVOP, EU FP6)

E5-07 Terhelésfüggő mechanizmus tesztelhető a nem izom miozin 2 hatékony működését

Sarlós K.¹, K. Thirumurugan², P. J. Knight³, J. R. Sellers³, Kovács M.^{1,3}

¹ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; ²Institute of Molecular and Cellular Biology and Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK; ³Laboratory of Molecular Physiology, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, MD, USA

A mechanikai erőhatások fontos szerepet játszanak a molekuláris motorok működésének szabályozásában és koordinációjában. A nem izom

miozin 2 izoformák a gerincesek szöveteiben a sejtosztódás és -differenciáció nélkülözhetetlen motorjai. A nukleotidkötés és -disszociáció terhelésfüggésének méréséhez azt az intramolekuláris feszültséget használtuk fel, amely mindkét fejükkel aktinhoz kötött miozin 2 molekulákban keletkezik. Azt találtuk, hogy a nem izom miozin 2A és 2B izoformákban az ADP-felszabadulás kinetikája erősen terhelésfüggő, míg az ATP és ADP kötése nem mutat terhelésfüggést. A terhelésfüggő változásokat az okozza, hogy a mechanikai erőhatások befolyásolják a különböző erőkar-orientációjú aktomiozin-ADP-állapotok közötti egyensúlyokat. A külső erő

ezáltal markáns változásokat okoz ezen miozinok terhelési arányában (azaz az aktinkötött állapotok részarányában), valamint ATPáz ciklusidejében is. E sajátosság az alapja annak, hogy a nem izom miozin 2 energiahatékony módon tudjon hosszú távon erőt kifejteni anélkül, hogy a gyorsabb miozinok (például simaizom-miozin) által hajtott kontrakciókat akadályozná. Míg a kontrakció irányába ható erők gyorsítják a miozin ciklust, addig a visszafelé irányuló erők növelik a terhelési arányt és a mindkét fejjel aktinkötött, hatékony erőfenntartó miozinállapotok részarányát.

E6 – Fehérjeexpresszió és -funkciók szabályozása

E6-01 Növényi RNS-csendesítés-szuppresszorok működési mechanizmusának jellemzése

Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Burgyán J.
MBK, Gödöllő

Kidolgoztunk egy olyan *in vitro* és *in vivo* tesztrendszerrel, amelynek segítségével az RNS-csendesítés szuppresszorainak működési mechanizmusát vizsgálhatjuk. *In vitro* vizsgálatainkat *Drosophila*-embrió RNS-csendesítési rendszerben végeztük, míg *in vivo* rendszerünk mikro-RNS (miRNS) és virális szekvenciákat tartalmazó szenzorkonstrukciók infiltrálásán alapul. *In vitro* és *in vivo* tesztrendszerünk alkalmas annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy egy adott RNS-csendesítés-szuppresszor az RNS-indukált csendesítési komplex (RISC) kialakulását vagy az aktív RISC-folyamatot gátolja-e. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az ismert kettőszálú siRNS-kötő szuppresszorok, mint a tombuszvírusok p19 és a répasárgáság-vírus (BYV) p21 fehérjeje a RISC kialakulását gátolja, azonban az aktív RISC-folyamatra nincsenek hatással. Ebben a jól kidolgozott rendszerben megvizsgáltuk a dohánycsikósság-vírus (TEV) HC-Pro RNS-csendesítés-szuppresszorát is, amiről korábban azt gondolták, hogy gátolja az aktív RISC-folyamatot. Összehasonlító vizsgálataink eredményét mutatjuk be.

E6-02 Az ABCG2 multidrogtranszporter-fehérje közvetlen plazmamembránból történő drogranzsportjának kimutatása

Homolya L., Seres L., Orbán T., Sarkadi B.

MTA Membránbiológiai Kutatócsoport, Budapest

A 48 humán ABC transzporteren belül különleges helyet foglalnak el az ún. multidrogtranszporterek: az MDR1 (P-glikoprotein), az MRP1 és az ABCG2 (MXR/BCRP) fehérjék. Ezek a transzporterek nagyon széles szubsztrátfelismerő képességgel rendelkeznek, és a legkülönbözőbb szerkezetű, sokszor erősen hidrofób karakterű anyagok transzportját végzik. Mai elképzelésünk szerint élettani szerepük a detoxifikálásban, a különböző endo- és xenobiotikumok szervezetből való eltávolításában van. Daganatos sejtekben expresszálódva viszont megakadályozhatják a hatékony kemoterápiás kezelést azáltal, hogy keresztrezisztenciát okoznak a legkülönbözőbb citosztatikumokkal szemben a drogoknak a tumorsejtekből való kipumpálása révén. Hosszú évtizedekre visszanyúl az a vita, hogyan magyarázható ezen fehérjék széles szubsztrátfelismerő képessége. Az egyik elképzelés szerint (amelyet „hidrofób porszívó” modellnek neveznek) a transzporter közvetlenül a membránból veszi a szubsztrátját, míg a másik („klasszikus transzporter” modell) értelmében a citoplazmából történik a transzport. Számos kísérlet született ezen hipotézisek igazolására, azonban közvetlen bizonyító erejű eredmény a mai napig nem látott napvilágot. A jelen bemutatott munkában az ABCG2 GFP-címkével ellátott változatát felhasználva, konfokális mikroszkóp segítségével követtünk egy fluoreszcens citosztatikum, a mitoxantron felvételét a GFP-ABCG2 gént expresszáló sejtekben. Ez a kísérleti elrendezés lehetővé tette a drogfelvétel kinetikájának meghatározását a plazmamembránban és a sejtben belül. Elkészítettük a különböző transzportmechanizmusokra vonatkozó, a drogfelvétel folyamatát leíró kinetikai modelleket, majd összevetettük a kapott kísérleti eredményeinket a modellek által mutatott viselkedésformákkal. Kísérleteink számos vonatkozásban a „hidrofób porszívó” modellt igazolják, és cáfolják a „klasszikus transzporter” modellt.

E6-03 A kationos aminosav-transzporter kötési specifikitásának vizsgálata makrofágokban

Hrabák A.¹, Erős D.², Órfi L.², Kéri Gy.^{1,2}

¹ SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; ² Vichem Kft., Budapest

A kationos aminosav-transzporter (CAT) fontos szerepet játszik a makrofágok arginin-anyagcseréjében, így az NO-szintáz és az argináz szubsztrátellátásában is. A három izoenzim közül a makrofágokban a CAT-2 van jelen. A fehérje szubsztrátspecifikitását korábban is vizsgálták, azonban szisztematikus, nagyszámú vegyületre kiterjedő vizsgálatot nem végeztek. Kísérleteinkben egérből származó peritoneális makrofágok arginin-felvételét vizsgáltuk, közel 80 különböző aminosav, illetve aminosavszármazék mint lehetséges gátlószert felhasználásával. A transzportot ³H-arginin 5 perces felvétele alapján adtuk meg. Előzetesen több vegyület vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a gátlások kevert jellegűek. A vegyületek gátló hatását IC₅₀ értékük alapján jellemeztük. A kapott értékek számos leíróval (szerkezeti tulajdonságok) jellemeztük, és kvantitatív szerkezet-hatás összefüggés-vizsgálat (QSAR) felhasználásával kíséreltük meg megállapítani, melyek azok a tulajdonságok, amelyek lényeges szerepet játszanak a kötésben. A vegyületeket előzetesen gátló hatásuk erőssége alapján három csoportba soroltuk. A modellépítéshez az ANN (mesterséges neuronhálózat) módszer bizonyult a legjobbnak. A modell szerint az alábbi 11 tulajdonság a legfontosabb a kötésben: az oldallánc szénatomszáma, pK_s-értéke, az L-, illetve D-konfiguráció, a van der Waals-térfogó, az általános „hasonlóság”, a hidrofobicitás, az α-aminosavjelleg, α-karboxilcsoport jelenléte, a vegyület bázikus vagy neutrális jellege. A modell helyességét egy, a modell felállításában nem szerepelt, 19 vegyületből álló validáló csoporton teszteltük: 17 esetben pontosan bizonyult a predikció, 2 esetben eltért. Hasonló elv alapján megpróbáltuk az arginin beépítése alapján az argininaktiváló enzim specifikitását is jellemezni, azonban ezt egyetlen vizsgált vegyület sem gátolta. Ez azzal magyarázható, hogy ennek az enzimmel az arginin iránti affinitása több nagyságrenddel meghaladja bármely másikat, mert ez biztosítja a genetikai kód fehérjébe történő hibátlan átírását. Eredményeink alapján a különböző argininfelhasználó rendszerek szubsztrátspecifikitása összehasonlítható.

E6-04 A Jon-proteázok tisztítása és biokémiai jellemzése ecetmuslicában

Lipinszki Z., Pál M., Kiss P., Klement É., Udvardy A.

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

Ma egyetlen olyan jól jellemzett mechanizmust ismerünk eukariótákban (ERAD), amely az endoplazmatikus retikulumban keletkező sérült és irreverzibilisen denaturálódott fehérjéket képes felismerni, majd prezentálni az ubiquitin-proteaszóma rendszernek. Felmerül tehát a kérdés, milyen, az ERAD-hoz hasonló biokémiai rendszerek léteznek a sejt más kompartmentumaiban keletkező szabálytalan térszerkezetű fehérjék eltávolítására. Ha létezik ilyen, akkor az csak és kizárólag a sérült, denaturálódott fehérjéket kötheti meg, esetleg bonthatja le, míg azok natív formáját teljesen intaktan kell hagynia. Kutatásaink során találtunk egy proteázcsaládot ecetmuslicában, amelynek tagjai egyénileg vagy komplexet alkotva részt vehetnek a denaturált fehérjék proteolízisében. A szerintípusú endopeptidázokhoz tartozó, extrém fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező „Jon” család két tagját, kromatográfiás eszközökkel homogenitásig tisztítottuk, majd azonosítottuk, végül pedig cDNS-ét expressziós vektorokba klónoztuk. Meghatároztuk mindkét gén fejlődésstádium-specifikus kifejeződésének mintázatát, amely összeegyeztethető volt az ugyanazon fejlődési stádiumokban kimutatott degradációs aktivitással. A prediktált szignálpeptid ellenére hőcsöng-testisejtekben kimutattuk a fehérjék intracelluláris lokalizáltságát, bizonyítva, hogy ha be is kerül a szekretorikus transzportláncba, nem jut ki a sejtből. A továbbiakban szeretnénk meghatározni az interakciós partnereiket, lokalizációjukat a sejtben, valamint a túltermeltetésük hatására bekövetkező celluláris változásokat. Végső célunk megérteni a működésük filozófiáját egy szélsőségesen denaturáló/reduktív környezetet is toleráló, szigorúan szabályozott intracelluláris denaturáltfehérje-függő proteolízisben, amelynek fontos gyógyászati és/vagy biotechnológiai jelentősége lehet.

E7 – Oxidatív stressz

E7-01 A Duox NADPH oxidáz enzimek működése

Geiszt M., Donkó Á., Orient A.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A fagocita sejtek reaktív oxigénmetabolit-termelésének kiemelkedő szerepe van a szervezet védekező mechanizmusai között. Régóta ismert tény, hogy reaktív oxigénmetabolitok más sejtekben is képződnek, és fontos szerepük van olyan alapvető biológiai folyamatokban, mint az oxigén-érzékelés, a hormonszintézis, az értónus-szabályozás, a programozott sejthalál vagy a megtermékenyítés. A reaktív oxigénmetabolitok szintézise neutrofil granulocitákban a szuperoxid anionból (O_2^-) indul ki. A szuperoxid termelését a sejtek plazmamembránjában található NADPH oxidáz enzim végzi. A NADPH oxidáz egy több alegységből álló enzim-komplex, amely elektront továbbít a NADPH molekuláról a molekuláris oxigénre. Az elmúlt években a fagocita oxidáz számos homológját fedték fel különböző emlőssejtekben, tehát nemcsak a granulocitákban, hanem más sejtekben is működnek a NADPH oxidáz enzimek. Nem világos azonban, hogy a különböző NADPH oxidáz homológoknak mi a pontos élettani funkciójuk, és az enzimek szabályozásáról is igen keveset tudunk. Jelen előadás témája a Duox (*dual oxidase*) NADPH oxidáz enzimek működése és lehetséges funkcióik.

E7-02 Oxidatív stressz az endoplazmás retikulumban

Bánhegyi G.

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

Az endoplazmás retikulum (ER) stresszének és az azt követő apoptózisnak a leggyakoribb oka az ER-lumen redox homeosztázisának felborulása. A redox hatások károsítják az oxidatív fehérjefeltekeredés mechanizmusát, helytelen konformációjú fehérjék intraluminális felhalmozódásához vezetnek, s végül kiváltják a selejtféherje-választ (*unfolded protein response*). A folyamatban számos luminális redox rendszer részvétele ismert (glutathion, aszkorbát, FAD, tokoferol, K-vitamin, piridinnukleotidok). A sejtet érő oxidatív stressz által okozott glutationoxidáció, illetve -depleció érinti az ER-lumen glutationját is. Redukált glutathion hiányában a helytelenül kialakult diszulfidhidak izomerizációja nem történik meg, így ER-stressz alakul ki, és a selejtféherje-válasz elindul. Kísérleteinkben az ER redox egyensúlyának megbomlását acetaminofennel (AAP) váltottuk ki, *in vivo*. Az AAP-mérgezés felelős az akut májkárosodások túlnyomó részéért, s mechanizmusában az oxidatív stressz központi szerepet játszik. Az AAP hatásmechanizmusát vizsgálva azt találtuk, hogy már egy órával az AAP-adás után az ER glutationkészlete oxidálódott. Később az ER-stressz jelei is megjelentek. Az ER-beli oxidoreduktázok (ERp72, protein diszulfid izomeráz) redox állapota oxidált irányba tolódott. Az ER-stressz-reszponzív transzkripció faktor ATF6 és az ER-stressz-függő GADD153/CHOP proapoptotikus transzkripció faktor aktiválódott. Az ER-rezidens prokaspáz-12 átmeneti aktiválódása és az eIF-2 foszforilációja is megfigyelhető volt. Az AAP-kezelt állatok májában a parenchymasejtek fokozott apoptózist észleltünk. Eredményeink szerint az AAP által okozott oxidatív hatások tehát ER-stresszhez és apoptózishoz vezetnek. További kérdés, hogy milyen összefüggés van az ER-stressz és a később kialakuló hepatocelluláris nekrosis között.

E7-03 Az Akt- és ERK-aktiváció univerzális szerepe a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz-inhibitorok, Ca^{2+} -csatorna- és β -blokkolók kardioprotektív hatásában

Szabó A., Kovács K., Bognár E., N. Kiss Gy., Sümegei B., ifj. Gallyas F.

PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Céltüztésünk két eltérő szerkezetű PARP-gátló, illetve egy-egy Ca^{2+} -csatorna- és β -blokkoló kardioprotektív, valamint Akt- és ERK1/2-aktiváló hatásának összevetése volt ischaemiareperfúzió során. Langendorff-perfundált izolált patkány szívben az energiametabolizmus, valamint szív-funkciós paraméterek helyreállítását monitoroztuk 25 perccel a globális ischaemiát követő, 45 percig tartó reperfúzió során. Az Akt, GSK-3 β és ERK1/2 aktivációját foszforilációs-specifikus antitesttel immunblot technikával a szívhomogenátumokból határoztuk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy PARP-gátlók (Verapamil és Metoprolol) egyaránt javították a kreatin-foszfát-, ATP- és pH-szintek helyreállítását, a funkcionális szívparaméterek (dp/dt, RPP és LVDP) normalizálódását, és csökkentették az elhalt terület méretét. Továbbá csökkentették a lipidperoxidációt és a fehérjeoxidációt, valamint aktiválták az Akt, a GSK-3 β és az ERK1/2 kinázokat. Mindezen vonatkozásokban a PARP-gátlók szignifikánsan jobb hatást értek el, mint a másik két vegyület. Az Akt LY294002 inhibitorral és az ERK1/2 PD98059 inhibitorral történő gátlása lerontotta az összes vegyü-

let pozitív hatásait, ami azt bizonyítja, hogy ezen kinázok aktiválása szignifikánsan hozzájárult a vegyületek védő hatásához. A PARP-gátlók tehát a Ca^{2+} -csatorna- és β -blokkolóknál hatékonyabban védik a szívet, valószínűleg azért, mert erőteljesebben aktiválják az Akt1 és az ERK1/2 kinázokat. A PI-3-kináz-Akt- és az ERK1/2-útvonalak aktiválása mind a PARP-gátlók, mind a Ca^{2+} -csatorna- és β -blokkolók esetében új hatásmechanizmust jelent, amely egyben az ischaemiás szívbetegek terápiajában új gyógyszerként is szerepelhet.

E7-04 Egyes poli-(ADP-ribóz)-polimeráz-gátlók kardioprotektív hatásának és a posztischaemiás szívglükóz-anyagcseréjének néhány összefüggése

Berente Z., N. Kiss Gy., Bognár E., Sümegei B.

PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

A poli-(ADP-ribóz)-polimeráz gátlószereiről már hosszabb ideje ismert, hogy ischaemiareperfúziót követően javítják az energiametabolizmus visszatérését a normoxiás állapot irányába; a mögöttes molekuláris mechanizmus tisztázására maig komoly erőfeszítések tesznek világszerte. Jelen vizsgálatunk tárgyává a PARP-gátlóknak az ún. metabolikus védő hatással való kölcsönhatását választottuk. A metabolikus védő hatás konkrét modellünkben (akut globális ischaemiát követő reperfúzió Langendorff szerint perfundált patkányszívben) azt jelenti, hogy az ischaemiát követően a szív az energiát a normoxiás állapothoz képest sokkal inkább glükózból és sokkal kevésbé zsírsavakból nyeri. Kísérleteink során vizsgáltuk az izolált szív glükózfelvételt, és monitoroztuk a szív energiametabolizmusát *in situ* ^{31}P NMR-spektroszkópiás úton, a glükóz sorsát ^{13}C -jelölt glükóz alkalmazásával követtük szívextraktumokban különféle *in vitro* NMR-kísérletekkel, illetőleg több jelátviteli útvonal aktiválódását vizsgáltuk *Western blot* módszerrel. Azt találtuk, hogy egyes PARP-gátlók fokozzák a glükózfelvétel sebességét, és ebben kulcsszerepet játszik a PARP-gátlók AMP-függő protein kináz (AMPK) aktiváló hatásának. Az előadásban ezeken túlmenően a glükóz sorsát kutató kísérleteink által felvetett további hipotézisekről és perspektívákról is szó lesz.

E7-05 A miofibrilláris rendszer oxidatív és nitrozatív károsodása humán kamrai szívműködésben

Hertelendi Z., Tóth A., Borbély A., Galajda Z., Vaszyly M., Édes I., Papp Z.

DE OEC, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Debrecen

Célunk humán, szíveredetű kontraktilis fehérjék oxidatív és nitrozatív károsodásainak elemzése volt. Bal kamrai izomintákból nyert membránpermeabilizált szívműködéseket a szulfhidrilcsoport (SH) specifikus oxidáns, 2,2'-ditioldipiridin (DTDP) vagy peroxinitrit (PN) jelenlétében *in vitro* inkubáltunk. Az inkubációk előtt és után izometriás kontrakciókat váltottunk ki ($pCa: 4,75$), a kialakuló izomerót (F_o) és az aktin-miozin-ciklus sebességét ($k_{tr,max}$) mértük. A kapott mechanikai válaszokat több SH-specifikus redukáló ágens (ditiotritol (DTT), glutathion (GSH), N-acetil-L-cisztein (NAC)) használva igyekeztünk reverzálalni. Az SH-oxidáció mértékét Ellman-reakció segítségével követtük. Mind a DTDP, mind a PN koncentrációfüggő módon csökkentette a miofibrilláris erőt ($EC_{50,DTDP} = 2,73$ mM; $EC_{50,PN} = 26,2$ μ M). A DTDP okozta teljes funkcióvesztéshez valamennyi miofilamentális fehérje teljes SH-oxidációja társult. Amikor az izomerót 1 mM PN segítségével számoltuk fel, az SH-oxidáció mértéke csak részlegesen nőtt ($0\% \rightarrow 31 \pm 6\%$). 2,5 mM DTDP hatására a $k_{tr,max}$ 1,05 \pm 0,05 1/sec értékről 0,78 \pm 0,05 1/sec értékre csökkent, míg 50 μ MPN nem befolyásolta azt. Továbbá, a 2,5 mM DTDP hatására létrejövő F_o - és $k_{tr,max}$ -csökkenéseket 10 mM DTT teljesen visszafordította, míg az 50 μ M PN hatására kialakuló F_o -csökkenés csak részben volt megfordítható (a kontroll 58 \pm 4%-áról 69 \pm 4%-ra). 10 mM GSH vagy 10 mM NAC képtelen volt az F_o -csökkenés helyreállítására DTDP-kezeléseket követően, míg a NAC és a DTT egyformán effektív volt PN-alkalmazások után. Eredményeink szerint a humán szívből, a DTDP vegyülettel szemben, a PN-kezelésre kialakuló mechanikai funkcióbeli változások csak kismértékben rendelhetők SH-oxidációhoz. A mechanikai hatások visszafordíthatóságát az oxidáló és redukáló ágens molekularis tulajdonságai messzemenően befolyásolják. (ETT 449/2006)

E7-06 A koleszterindús diéta rontja a szívfunkciót apoB100 transzgenikus egerekben: az oxidatív és nitrozatív stressz szerepe

Csont I.

SZTE ÁOK, Biokémiai Intézet, Kardiiovaszkuláris Kutatócsoport, Szeged

A hiperkoleszterinémia igen fontos rizikófaktor a kardiiovaszkuláris megbetegedésekben. Kísérleteinkben a koleszterindús diéta direkt ha-

tását vizsgáltuk a szívre, valamint a szívben kifejlődő oxidatív stresszre vad típusú és apoB100 transzgenikus egerekben, melyeket 18 hétig 2% koleszterinnel dúsított táppal etettünk. A szív működését izolált dolgozó szívperfúzió során jellemeztük. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a szív működését jellemző aortaátáramlásban a normál diétán tartott vad típusú, illetve apoB100 transzgenikus egerek esetében ($0,24 \pm 0,02$, illetve $0,26 \pm 0,02$ ml/min/g testtömeg). Azonban a koleszterindús diéta az apoB100 transzgenikus egerek szívében szignifikánsan csökkentette, míg a vad típusúakban nem befolyásolta az aortaátáramlás értékét ($0,14 \pm 0,03$ és $0,22 \pm 0,02$ ml/min/g testtömeg, $p < 0,05$). A miokardiális szuperoxid anion-képződést lucigenin-kemilumineszcenciával határoztuk meg. A koleszterindús diéta fokozta a szuperoxid-termelést az apoB100 transzgenikus egerek szívében (23 ± 9 cpm/mg értékről 73 ± 19 cpm/mg értékre, $p < 0,05$), azonban a vad típusú egerek szívében nem befolyásolta azt (22 ± 7 és 26 ± 5 cpm/mg). A szöveti spincapdázást követően ESR-spektroszkópiával meghatározott miokardiális nitrogén-monoxid mennyisége nem változott az egyes csoportokban. A peroxinitrit bomlását elősegítő vegyület, FeTPPS (2×20 mg/kg i.p.), normalizálta az aortaátáramlást ($0,23 \pm 0,02$ ml/min/g testtömeg) a koleszterindús diétán tartott apoB100 transzgenikus egerekben. A koleszterindús diéta fokozza a miokardiális oxidatív és nitroztatív stressz mértékét, s ezáltal szívfunkciós károsodáshoz vezet az apoB100 transzgenikus egerek szívében.

E7-07 Testedzés és a DNS védelme

Radák Zs.

SE, TSK, Budapest

E8 – Jelátvitel

E8-01 A receptor-oligomerizáció szerepe az AT₁-angiotenzinreceptorok működésében

Hunyady L., Karip E., Süpeki K., Turu G.

SE, Élettani Intézet, Budapest

Számos adat utal arra, hogy a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerek vagy oligomerek formájában vannak jelen a sejtek plazmamembránjában. A heterooligomerizációval kapcsolatba lépő receptorok képesek befolyásolni egymás expresszióját, jelátvitelét, internalizációját, illetve farmakológiai tulajdonságait. Kísérleteinkben az 1-es típusú angiotenzinreceptort (AT₁R) vizsgáltuk, mely az angiotenzin II legfontosabb életani és kóreltani hatásait közvetítő, G-fehérjéhez kapcsolt receptor. Sárga fluoreszcens fehérjéhez, illetve renilla luciferázhoz kapcsolt AT₁R-ek együttes expresszióját követően biolumineszcencia-rezonancia-energiatranszfer (BRET) módszerrel igazoltuk, hogy a sejtekben létrejön a receptorok homooligomerizációja. Ennek funkcionális jelentőségét az általunk létrehozott, receptorantagonistát (candesartant) nem kötő, S109Y mutációt tartalmazó AT₁R, valamint egy G-fehérjét nem aktiváló mutáns receptor (DRY/AAY) segítségével vizsgáltuk. E fehérjéket HEK 293 sejtekben koexpresszáva azt találtuk, hogy a candesartan gátolja az inozitol-foszfát-választ, annak ellenére, hogy azt a candesartant nem kötő S109Y mutáns receptor hozta létre. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a candesartan kötődése a homodimerizált receptorban lévő egyik receptorhoz a másik receptor aktiválódását is gátolja. Mivel a koexpresszált receptorok angiotenzin-II-kötése candesartan jelenlétében is megtartott, a hatásért nem az S109Y mutáns receptor angiotenzin-II-kötésének gátlása felelős. Adataink alapján arra következtethetünk, hogy bár a receptorok oligomerizációja angiotenzin II hormontól függetlenül jön létre, az összekapcsolódó receptorok képesek befolyásolni egymás működését. (OTKA T-046445, ETT 447/2006, NKTH Jedlik Ányos program 1/010/2005)

E8-02 A foszfatidil-inozitol-3-kináz-izoformák működésének eltérő szabályozása a katalitikus alegység foszforilációjával

Sipeki Sz., Faragó A.

SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest
HepG2 humáni-hepatomasejtekben végzett vizsgálataink alapján a PI 3-kináz p110 α /p85, illetve p110 β /p85 izoformái működésének finom szabályozása jelentősen eltér egymástól a különböző tirozinkinázreceptoroktól aktiválódó jelátviteli rendszerekben. A p110 α katalitikus alegységet a protein kináz C (PKC) foszforilálja, és ilyen módon csökkenti a p110 α /p85 PI 3-kináz lipidkináz-aktivitását. Ennek a mechanizmusnak a HGF/scatter faktor jelpályájában van jelentősége, ahol a PKC a PI 3-kináz aktiválódásának időtartamát csökkentve, a sejt szóródás negatív visszacsatolás

Az emberi sejten több mint egymillió szabad gyök keletkezik naponta, ezért a DNS-molekulák jelentős támadásnak vannak kitéve. A felhalmozott DNS-sérülések nekrozist, apoptózist, mutációt, felgyorsult öregedést és a sejt homeosztázisának teljes felborulását eredményezheti. Ezért a sejtek nagyon hatékony, sérülést javító rendszert fejlesztek ki, és az oxidatív sérülés javításáért elsősorban a báziskivágásos javító enzimek (BER) a felelősek, melyek a sejt magban és a mitokondriumban is megtalálhatók. Ismert, hogy az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek vagy az öregedés megváltoztatja a DNS-sérülések mértékét s a DNS-sérülést javító enzimek aktivitását. Az egyszerű, szokatlan nagyságú fizikai terhelés emeli a DNS-sérülések nagyságát, míg a rendszeres terhelés csökkenti azt. Érdekes módon ez a jelenség nyomon követhető abban a szövetben (vázizom), ahol az oxigénfelhasználás a nyugalmi érték százszorosára nő, s abban is, melyben a negyedére csökken (máj). Az egyszerű intenzív testedzés vagy a nagymértékű terhelés szignifikánsan emeli a DNS-sérülés nagyságát. Eredményeink szerint a 8-oxodG javításáért felelős OGG1 enzim aktivitása a teljes sejtextraktumban emelkedik az egyszerű és rendszeres testedzés hatására is. Amikor azonban megvizsgáltuk a sejt magi és mitokondriális OGG1-aktivitást, azt találtuk, hogy edzés hatására a sejt magban nő és a mitokondriális extraktumban pedig csökken az enzim aktivitása. Ezután megvizsgáltuk az OGG1 fehérje mitokondriális transzportjának hatékonyságát, és azt figyeltük meg, hogy a fizikai inaktivitás jelentősen csökkenti az OGG1 transzportját a mitokondriális mátrixba, a testedzés azonban jelentősen javítja azt. Elképzelhető tehát, hogy a rendszeres testedzés a DNS hatékony védelmével kedvezően hat a sejtek viabilitására, és ez szerepet játszik a testedzés preventív hatásaiban, beleértve például a rákos betegségek elleni prevenciót is.

regulátoraként működik. *In vitro* a PKC képes foszforilálni a p110 β /p85 katalitikus alegységét is, ez a foszforiláció azonban nem vezet a lipidkináz aktivitás csökkenéshez. A foszforilált treoninoldallanc helyének meghatározása után sikerült kifejleszteni egy olyan poliklonális antitestet, amelyik csak a p110 β foszforilált formáját ismeri fel. Ezen antitest segítségével kimutattuk, hogy sejten belül a p110 β /p85 izoforma katalitikus alegysége foszforilálódik, majd gyorsan defoszforilálódik, az intracelluláris foszforilációt azonban nem a PKC katalizálja. Inzulin hatására a p110 β /p85 PI 3-kináz az inzulinreceptor-szubsztrát (IRS) foszfortirozin dokkoló helyéhez kötődik, de a katalitikus alegység foszforilációjának gátlása csökkenti az enzim képességét az IRS-sel történő kapcsolódásra. A p110 β foszforilációjának, úgy tűnik, pozitív modulátor szerepe lehet az inzulin-jelpályában.

E8-03 A Caskin-1 és Abi-2 fehérjék kapcsolatának vizsgálata idegsejtekben

Balázs A., R. Udupa, Solti Z., Buday L.

SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest
Az elmúlt években nyilvánvalóvá vált, hogy a fehérjék jelentős része doménszerkezetű. Az adapter-, illetve az állványfehérjék számos ilyen funkcionális egységet tartalmaznak, így segítségükkel a jelátvitelben fontos szerepet töltenek be a szinapszisokban, ahol a nagyobb fehérje-komplexek a pre- és posztzinaptikus jelátviteli útvonalak kulcsszereplői. Az egyik ilyen, szinapszisban előforduló állványfehérje a Caskin-1. A Caskin proteint elsőként a Cask nevű fehérjével való kölcsönhatása alapján írták le. Szerkezetét tekintve N-terminális ankirinisméltódésekből, SH3-doménből, az azt követő SAM-doménből, prolingazdag régióból és egy rövid C-terminális doménből áll. A Caskin – lévén állványfehérje – számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban vehet részt, ugyanakkor interakcióját eddig csak a Cask proteinnel írták le. Kísérleteink célja volt, hogy azonosítsuk más proteinekkel való kapcsolatát, ezért élesztő-kéthibridtesztben vizsgáltuk embrionális humán agyi cDNS-könyvtár felhasználásával. Sikerült számos lehetséges kötő partnert azonosítanunk, majd az adott fehérjék közül az Abi-2 proteinnel való interakcióját tanulmányoztuk részletesen. Az Abi fehérjéket az Abl és Arg tirozin kinázok szubsztrátjaiként azonosították, melyek az Abl proteinek transzformáló képességét szabályozzák. Az Abi-2 ubiquiter fehérje, legnagyobb mennyiségben az agyban fejeződik ki. Expressziója, hasonlóan a Caskinhoz, az embrionális időszak utolsó harmadában jelenik meg a differenciálódott neuronokban. Egy olyan fehérjekomplex tagja, amelynek – az aktin citoskeleton szabályozásában fontos – Wave fehérjére gátló hatása van. Az idegrendszerben betöltött funkciója még nem tisztázott, de újabb kísérletek arra utalnak, hogy fontos szerepe lehet annak kialakulásában és fejlődésében.

E8-04 A foszfolipáz C γ 2 szerepe az autoimmun izületi gyulladás kialakulásában

Jakus Z., Simon E., Németh T., Mócsai A. SE, Élettani Intézet, Budapest

A különböző fehérvérsejtek, köztük a neutrofil granulociták, központi szerepet játszanak az autoimmun gyulladásos betegségek kialakulásában. A neutrofil granulociták sejtfelszíni receptorai közül mind a β_2 -integrinek, mind az Fc γ -receptorok részt vesznek a gyulladásos folyamatokban, de mindmáig ismeretlen, hogy ehhez milyen intracelluláris jelátviteli folyamatokat alkalmaznak a receptorok. Kísérleteinkben először *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a neutrofil granulociták jelátvitelét. A neutrofilek Ca²⁺-depleciója mind az integrin-, mind az Fc-receptor-mediált sejtválaszokat kivédte. Az intracelluláris Ca²⁺-szint növelésének egyik lehetséges mechanizmusa a sejtben belüli raktárak IP₃-mediált kiürítése, melyet a foszfolipáz C (PLC) különböző izoformái közvetíthetnek. Génhiányos egereken végzett kísérleteinkben ezek közül a PLC γ 2 szerepét sikerült igazolnunk, mivel a PLC γ 2^{-/-} egerekben mind az integrinfüggő, mind az Fc γ -receptorfüggő sejtválaszok teljesen megszűntek. A hatás specificitását mutatja, hogy más receptorokon (például a G-fehérje-kapcsolt formilpeptid-receptoron) keresztül kiváltott sejtválaszokat nem befolyásolta a PLC γ 2 hiánya. További kísérleteinkben *in vivo* körülmények között vizsgáltuk a PLC γ 2 szerepét egy autoimmun izületi gyulladás, a K/BxN szérumtranszfer-arthritis segítségével. Míg a vad típusú egerekben az arthritist kiváltó szérum adása súlyos izületi gyulladást és a végtagfunkció következményes károsodást eredményezett, a PLC γ 2^{-/-} egerekben sem az izületi gyulladás, sem a funkcióvesztés nem jött létre. Eredményeink arra utalnak, hogy a foszfolipáz C γ 2 elengedhetetlen a neutrofil granulociták integrinreken és Fc-receptorokon keresztüli aktivációjához, valamint az autoimmun izületi gyulladás létrejöttéhez.

E8-05 TbPTP1: A Trypanosoma brucei életciklus-szabályozásának kulcsa

Szőőr B.^{1,2}, J. Wilson¹, H. McElhinney^{1,2}, L. Taberner², K. Mathews¹
¹Institute for Immunology and Infection Research, Asworth Laboratories, University of Edinburgh, UK; ²Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK

Az afrikai alomkór közel 60 millió ember életét fenyegeti Afrika szubszaharai részében. A megbetegedések száma becslések alapján évi 500 ezerre tehető. Az alomkór kórokozója, az ostoros egysejtű *Trypanosoma brucei*, összetett életciklusa során bonyolult fejlődési folyamatot megy keresztül különböző gazdaszervezetekben, így az emlős vérében és a cecelégyméhszervében. Az általunk azonosított trypanoszómaprotein tirozin foszfátáz (TbPTP1) a *T. brucei* 10. kromoszómáján található, mRNS-szintje a parazita fejlődése során jelentős ingadozást mutat. A rekombináns enzim eukarióta tirozin foszfátázokhoz hasonló sebességgel defoszforilál különböző foszfortirozin-szubsztátókat, aktivitását ismert tirozinfoszfátáz-inhibitorok gátolják. A TbPTP1 enzimaktivitása reverzibilis oxidációval szabályozott, és savas pH-tartományban maximális értéket mutat. Figyelemreméltó, hogy a TbPTP1 enzimaktivitás gátlása a vérben jelen lévő fejlődési alakban spontán átalakulást eredményez az úgynevezett prociklikus sejtformává, amely természetes körülmények közt csak a cecelégyméhszervben fordul elő. Ezt az emlős gazdaszervezet immunrendszere felismeri és elpusztítja. Az enzimaktivitás gátlása mind RNS-interferenciával, mind kémiai gátlószerekkel kiváltható volt. Eredményeink alapján új modellt javasolunk a trypanoszóma fejlődésének megértésére és a fertőzés terjedésének csökkentésére. A gazdaszervezetben a paraziták prociklikus alakká való átalakulását a TbPTP1 akadályozza meg. Ez a gátlás külső inger hatására megszűnik, így lehetővé válik a parazita új fejlődési formába való alakulása. Célunk ennek az ingernek és a hozzá kapcsolódó jelátviteli útnak az azonosítása, valamint specifikus PTP1B-gátlószerek használatával, a parazitának az emlősből a légyvektorba való átterülésének megakadályozása, mely megakadályozhatja az alomkór terjedését.

E8-06 Toll-like receptoros jelátvitel a plazmacitoid dendritikus sejtekben

Magyarics Z., Bácsi A., Rajnavölgyi É.
DE OEC, Immunológiai Intézet, Debrecen

A plazmacitoid dendritikus sejtek (pDS-ek) – mint nagymennyiségű I-es típusú interferonokat termelő sejtek – fontos szereppel bírnak a vírusok elleni immunválaszban. Effektor funkciójuk mellett az aktiválást követő érés után professzionális antigénprezentáló sejtekként képesek – a naiv T-limfociták stimulálása révén – az adaptív immunválasz elindítására. Sokáig ismeretlen volt a sejtek funkcionális kettősségének és egyedülálló mértékű interferontermelésének háttere. Korábban az interferonszabályozó faktor-7 (IRF-7) állandóan magas expressziójának tulajdonították ezt a képességet, a közelmúlt eredményei alapján azonban úgy tűnik, hogy a pDS-ek egyedi

jellegzetességeit egy sajátos, tér- és időbeli szabályozás biztosítja. Ebben a folyamatban meghatározó jelentőségű az ún. Toll-like receptor (TLR) – ligandum – adaptorfehérje-komplexnek az endoszomális visszatartása, mely kizárólag ebben a sejttypusban valósul meg. A TLR-eknek a különböző típusú ligandumokkal való kapcsolódása eltérő intracelluláris kompartmentekben történik meg, és különböző jelátviteli utak aktiválódását indukálhatja. Eredményeink szerint az aktiválást követő érés során a pDS-ek fenotípusa nagyban függ az aktiváló TLR ligandumok tulajdonságaitól, és egyazon receptor ligandumai eltérő hatással bírnak a pDS-ek fenotípusára és funkciójára. A TLR-9 szintetikus agonistái közül az A-típusúak a pDS-ek citokinszekrécióját segítik elő inkább, míg a B-típusúak a sejtek érését és antigénprezentáló funkcióját. Ennek a különbségnek az oka az egyazon receptorról induló, eltérő jelátviteli utak aktiválása. Ezeket a különbségeket a későbbiekben a pDS-ek modulációján alapuló terápiás próbálkozások során lehet kihasználni, mivel a megfelelő TLR-ligandumok alkalmasak lehetnek az interferontermelő effektor funkció és az antigénprezentáló funkció elkülönítésére, azaz a szelektív immunmodulációra.

E8-07 A protein kináz C szerepe a humán szívizomsejtek kontraktilitásának fenntartásában

Molnár A., Borbély A., Szilágyi Sz., Hertelendi Z., Pásztorné Tóth E., K. Jaquet, Vaszyly M., Galajda Z., Papp Z., Édes I., Tóth A. DE OEC, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Debrecen

A protein kináz C (PKC) enzimek részt vesznek a szívizom-kontraktilitás szabályozásában, azonban az életteni hatások és biokémiai mechanizmusok még nem minden részletükben feltártak. Saját vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a humán szívizom kontraktilitásának fenntartásában szerepet játszhatnak citoszolikus PKC enzimek (maximális kontraktilis erő 10 perces, félmaximális kontraktúrát követően: izolált miofibrillum: 65 ± 3%, miofibrillum + citoszol: 100 ± 3%, miofibrillum + citoszol + PKC-inhibitor: 87 ± 6%). A humán szívizomzat PKC izoenzim expressziós mintázatát vizsgálva a PKC α expresszálódott legnagyobb mennyiségben (expresszió: PKC α : 189 ± 31, PKC δ : 7 ± 3, PKC ϵ : 7 ± 2 ng/mg protein). A lehetséges biokémiai folyamatokat tanulmányozva azt találtuk, hogy a Ca²⁺-függő PKC α izoenzim az inkubációk során a citoszolból a miofibrillaris rendszerhez transzlokálódott (a miofibrillumokhoz kötődő PKC α mennyisége a nyolcszorosára nőtt Ca²⁺-ionok jelenlétében). A transzlokáció Ca²⁺-függése (EC₅₀) 645 nM értékűnek adódott (összevetésül a félmaximális kontrakciót kiváltó Ca²⁺-koncentráció 1260 nM). A PKC α -kötő miofibrillaris fehérjék kimutatására *overlay assay* eljárást használtunk, mellyel legalább öt fehérjéhez mutattuk ki a PKC α kötődését. A kötőfehérjék molekulamérete alapján feltételeztük, hogy ezek egyike a troponin-I (TnI). Ezt megerősítette, hogy sikerült kimutatni a PKC α Ca²⁺-függő kötődését tisztított, rekombináns TnI fehérjéhez. Immunhisztokémiai eredmények szerint a humán szívizomban is megfigyelhető a TnI és PKC α kolokalizációja. Végül, *in vitro* foszforilációs kísérletekben igazoltuk, hogy a PKC α számos miofibrillaris fehérjét képes foszforilálni. Összefoglalva, kimutattuk, hogy a PKC α szerepet játszhat a humán szívizomsejtek kontraktilitásának fenntartásában. (OTKA F48873)

E8-08 A dexametazonkezelés a felszíni szialiláltság csökkentésével fokozza a humán makrofágok fagocitáló képességét

Mádi A.¹, Májai Gy.², Vámosi Gy.³, C. Koy⁴, Szántó A.³, M. O. Glocker⁴, Fésüs L.^{1,2}

¹MTA Apoptózis és Genomika Kutatócsoport, Debrecen; ²DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; ³MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen; ⁴Proteome Center, University of Rostock, Rostock, Germany

A szervezetben nagy mennyiségben keletkező apoptotikus granulociták eltakarítása alapvető fontosságú a gyulladásos folyamatok megelőzésében. A gyulladásgátló glükokortikoidok jelentősen növelik a makrofágok fagocitáló képességét. A glükokortikoidkezelés segíti a fagocitózishoz szükséges citoskeleton-átrendeződést; de eddig nem ismert, vajon át is alakítja-e a makrofágok felszínét. A plazmamembránban lévő szialilált fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek közötti kapcsolatok alakulásában. Munkánk során ezért dexametazon (DXM) hatására bekövetkező fehérjeexpressziós változásokat vizsgáltunk humán makrofágokban, különböző szénhidrát-részekre specifikus lektinek felhasználásával. Az alkalmazott lektinek közül az alfa 2-6 glikozidos kötésben lévő szialinsavra specifikus *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) segítségével kimutattuk, hogy DXM-kezelés hatására a kezeltlen sejtekhez képest 51,4 ± 4,7%-ra csökken a felszíni szialiláltság, mely elsősorban a foszfátidil-szerint kötő annexin2 fehérjét és egy MHC-molekulát érint. Emellett, a kezelt sejteken belül a β -haptoglobulin jelenik meg szialilált állapotban. Fagocitózisméréseinkben a kezeltlen makrofágok 22,8 ± 2,61%-a, míg a kezelt 48,9 ± 4,3%-a fagocitált apoptotikus

neutrofileket. A felszíni szialsavakat lefedő SNA hatására a kezeletlen sejtek fagocitózisa $39 \pm 5,3\%$ -ra nőtt, míg a kezeltékét nem befolyásolta ($45,8 \pm 3,6\%$). Eredményeink szerint az egyes szialsavas csoportok eltűnése a makrofágokról elősegítheti az elhaló sejtek felszínén megjelenő foszfatidil-szerin kötődését, növelve a makrofágok fagocitálóképességét.

E8-09 A retinoidok az RAR γ -receptoron keresztül apoptózist váltanak ki, az RAR α -receptoron keresztül pedig fokozzák az egértimociták glükokortikoid indukálta apoptózist

Tóth K. Á., R. Rühl, Kiss L., Kiss B., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A retinoidok az A-vitamin (retinol) származékai. Régóta ismert, hogy az A-vitamin hiánya immundeficienciát okoz. E vitaminhiány *transz*-retinsav adásával pótolható. Kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy a retinsav receptorainak ligálása befolyásolja-e a T-sejtek apoptózisprogramját. Ko-

rábban bizonyítottuk, hogy a retinoidok gátolják a T-sejtek negatív szelekcióját. Előadásomban bemutatom, hogy a retinoidok az RAR γ -receptor ligálásán keresztül a Nur77 sejthalált kiváltó transzkripció faktor indukcióján keresztül váltanak ki apoptózist. Azt is bemutatom, hogy a retinoidok az RAR α ligálásával fokozzák a timociták glükokortikoid-hormon által indukált apoptózist. Ez utóbbi a két receptor ligandumfüggő interakcióján alapul, és a glükokortikoidreceptor fokozott transzkripció aktivitását eredményezi. Emellett a két receptor együtt transzlokálódik a mitokondriumba is, ami egyes tanulmányok szerint szükséges a glükokortikoidreceptor apoptózist kiváltó hatásához T-sejtekben. Bemutatom azt is, hogy retinol van a timuszban, és a *transz*-retinsav retinolból történő szintéziséhez szükséges gének kifejeződnek a születést követő timuszfejlődés során. Ennek ellenére nem *transz*-retinsav keletkezik. Adataink arra utalnak, hogy a timuszban egy alternatív retinoid-anyagcsere zajlik, és hogy e még meghatározandó termék(ek) a retinoidreceptorokon keresztül modulálhatják a timociták szelekciós programját. (OTKA T049445)

BSD – A Bio-Science-díj nyertesének előadása

BSD-01 A C1-inhibitor térszerkezete: a polianionok moduláló hatásának és egy konformációs betegség mechanizmusának atomi szintű magyarázata

Beinrohr L.¹, Harmat V.², Dobó J.¹, Lórinz Zs.¹, Gál P.¹, Závodszy P.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²ELTE TTK, Elméleti Kémiai Tanszék, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, Budapest

A humán C1-inhibitor a komplement és kontakt rendszerek proteázait gátló szperin típusú inhibitor. Specifitásának köszönhetően széles körű gyulladásgátló hatással rendelkezik. A C1-inhibitor deficienciája potenciálisan halálos örökletes betegséget okoz (örökletes angioödéma, HAE). A C1-inhibitor terápiás alkalmazását más, gyulladással járó megbetegedésekben is sikeresen tesztelték (szepszis, szervátültetés, infarktus). A C1-inhibitor atomi felbontású térszerkezete eddig ismeretlen volt, noha az elmúlt évtized(ek)ben számos kutatócsoport próbálkozott röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározásával. A világon elsőként sikerült meghatározunk a C1-inhibitor térszerkezetét. A szerkezet ismeretében új mechanizmust javasoltunk arra, hogyan aktiválják a polianionok a C1-

inhibitor, és hogyan modulálják a proteázgátlás specificitását. A szelektív moduláció a C1-inhibitor felszínén kialakuló szokatlan töltésszeparációnak köszönhető: az egy helyen csoportosuló pozitív töltések – a célproteázok töltésétől függően – vonzó vagy taszító hatást fejtenek ki a proteázokra. A terápiás szempontból fontos, negatív töltésű polianionok (például heparin) kötődnek a C1-inhibitorhoz, leányékolják ezeket a pozitív töltéseket, így megfordítják a kölcsönhatás előjelét. Ezzel megmagyarázható, hogy a polianionok egyes esetekben miért növelik meg akár százszorosára a gátlás sebességét, más esetekben pedig miért csökkentik azt. Az eddig ismert, a természetben előforduló, körülbelül 180, betegséget okozó mutáció közül számosval kapcsolatban a mutáció hatásának molekuláris mechanizmusa is megérthetővé vált: a szerkezet megmutatta, hogy a C1-inhibitor reaktív része mélyen be tud ágyazódni a fehérjétestbe, emiatt nem hozzáférhető a proteázok számára. Szerkezeti eredményeink alapján a már létező terápiás célú fehérjépreparátumok továbbfejlesztésére is lehetőség nyílt.

(Szponzor: Bio-Science Kft.)

P – Poszterek

P-01 Az Arabidopsis PP6 protein foszfatáz szerepe az abiotikus stresszválasz szabályozásában

Ábrahám E.¹, Cseh É.², Szabados L.¹, Koncz Cs.^{1,3}, Dombrádi V.², Farkas I.²

¹MTA SZBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged; ²DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ³Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Germany

A szerin/tryonin-specifikus foszfoprotein foszfatázok (PPP-k) minden eukariótában megtalálhatók. Az új típusú növényi PPP enzimek funkciója alig ismert; szerepükre a nullmutáns növények fenotípusa alapján próbálunk következtetni. *Arabidopsis thaliana* fajban két PP6 protein foszfatáz enzim található. Egy Arabidopsis T-DNS-inzerció mutánsgyűjteményt génspecifikus és a T-DNS-határszekvenciáira specifikus primerpárral, polimeráz láncreakcióval szűrve azonosítottuk a PP6A1/AtFYPP1 génben inzerciót hordozó mutáns vonalat (*atfypp1*). Fenotípus-vizsgálat céljából a T2 generációban homozigóta mutáns növényeket választottunk ki. A mutánsok DNS-ének Southern blot analízise szerint T-DNS más génbe nem épült be. RT-PCR vizsgálat alapján az *atfypp1* nullmutáns. Az *atfypp1 A. thaliana* mutáns felépítése és növekedése nem tért el a vad típusú növénytől a szokásos tenyésztési körülmények között. Csírázási tesztekben hiperszenzitív volt nagy koncentrációjú nátrium-kloridra, mannitolra és abszcizinsavra (ABA). Gyengült a prolinfelhalmozó képessége, és csökkent benne a prolin bioszintézisét reguláló, stressz- és ABA-indukált P5CS1 gén expressziója. Ismeretes, hogy a növényekben az abiotikus stresszhatások (nagy sókoncentráció, szárazság, hideg) különféle fiziológiai és biokémiai reakciókat váltanak ki, többek között növelik a prolinfelhalmozódást. A túlélés érdekében ABA-függő vagy -független útvonalakon indukálódik a stressztűrőben szerepet játszó gének expressziója. Eredményeink szerint a PP6A1 foszfatáznak szerepe lehet az ABA által mediált metabolikus válaszok szabályozásában. (OTKA T038324)

P-02 Új típusú protein foszfatázok vizsgálata Drosophila fajokban

Ádám Cs.¹, Miskei M.¹, Nagy O.², Pál M.², Deák P.², Friedrich P.³, Dombrádi V.¹

¹DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ²MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ³MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A sejtek életében jelentős szabályozó szerepet tölt be a fehérjék protein kinázok általi foszforilációja és protein foszfatázok általi defoszforilációja. A Ser és Thr oldallánca specifikus foszfoprotein foszfatázok csoportjába tartoznak a molekuláris biológiai módszerekkel azonosított „új típusú” protein foszfatázok, melyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak a „klasszikus” foszfatázokhoz képest. Genomszekvenencia-analízáló programok felhasználásával megállapítottuk, hogy a Pp1-szerű, új típusú protein foszfatázok csak a *Drosophilidae* család *melanogaster* fajcsoportjában található meg. Közülük a PpN és PpY génekről rendelkezünk a legtöbb irodalmi adattal, mindkét gén herespecifikus expressziót mutat és a második kromoszómán lokalizálódik. A Pp1-Y1 és Pp1-Y2 az Y kromoszóma heterokromatin régiójában, a PpD5 és PpD6 pedig a második kromoszómán található. Az utóbbi négy gén expressziójára vonatkozólag nem közölték kísérletes eredményeket. A *melanogaster* fajcsoport genomsekvenciadataiból hiányzott néhány új típusú protein foszfatáz jelenlétét igazoló adat. Ezért a gének kódoló szekvenciáira specifikus primerpárokat terveztünk a közeli rokon fajok szekvenciái alapján, majd PCR módszer segítségével kimutattuk az új típusú protein foszfatázok jelenlétét a kérdéses esetekben. RT-PCR eljárással megvizsgáltuk az új típusú protein foszfatázok expresszióját a *D. melanogaster* különböző egyedfejlődési stádiumaiban, és azt találtuk, hogy mRNS-ük főképp bábban és kifejtett hím egyedekben mutatható ki. A Pp1-Y1 génről megbizonyosodott, hogy herespecifikus expressziót mutat. Eredményeink arra utalnak, hogy az új típusú foszfatázok kb. 10 millió évvel ezelőtt jelentek meg a *melanogaster* fajcsoport fajaiban. Hím-specifikus expressziójuk alapján feltételezzük, hogy a fertilitásban játszanak szerepet. (OTKA 60723)

P-03 Az ABCA1 aktív transzporter szerepe a szfingozin-1-foszfat exportjában

Baksa A.¹, Kasza I.², Hegyi Z.², Szabó K.¹, Liliom K.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²OGYIK, Budapest

A szfingozin-1-foszfat (S1P) sejtélettani szempontból fontos lipidmediátor, amely korábban a szfingolipid-anyagcsere metabolitjaként volt ismert. A S1P számos sejtélettani funkciót szabályoz, így a sejtosttódást,

túlélést, sejtalakot, migrációt, valamint a Ca²⁺-homeosztázist. Ezen funkcióit elsődleges hírvivőként sejt felszíni G-fehérjével kapcsolt receptorok aktiválásával fejt ki (S1P₁₋₅). A S1P intracellulárisan keletkezik szfingozinból (Sph) a szfingozin-kinázok (SK) általi foszforilációval. A keletkezett S1P tipikusan autokrin vagy parakrin módon hat az említett sejt felszíni receptorokon keresztül. A S1P exportja a sejtekből azonban nem tisztázott. Amíg a Sph lipidoldékonyságánál fogva képes diffúzióval átjutni a membránra, addig a S1P nagyméretű töltött fejcsoportja miatt nem. Feltételezhető, hogy egy vagy több aktívtranszport-fehérjének (ABC transzporterek) szerepe van ebben a folyamatban. Az irodalomból ismert, hogy az ABCA alcsaládba tartozó ABCA1 szubsztrátuma a koleszterin és bizonyos foszfolipidek, illetve ez a transzporter szerepet játszik a vérben a nagy sűrűségű lipoproteinek (HDL) összeszerelésében. Az is ismert, hogy a vérben mindig megtalálható S1P a HDL-formákban koncentráldódik. Feltételezésünk szerint a S1P exportjában szerepet játszik az ABCA1 transzporter is, mely hipotézisünket vad típusú és mutáns ABCA1 fehérjéket expresszáló emlősejt vonalakon (humán B-limfocita, MDCK, HEK293) teszteljük. Triciált Sph alkalmazását követően időben követjük a jelölt S1P mennyiségét a sejten és a médiumban. Az ABC transzporterek különböző inhibitorainak alkalmazásával tanulmányozzuk azt is, hogy mely egyéb ABC transzporterek játszhathatnak szerepet a S1P exportjában.

P-04 Multidrogrezisztens HIV-1 proteinázok jellemzése és összehasonlítása

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 vírusrészcsekk 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. Ezért különösen fontos a megjelenő mutációk, illetve a mutáns enzimek részletes tanulmányozása. Munkánk során antivirális terápiában részt vevő betegekből izolált, több proteinázinhibitorra is rezisztens HIV-1 proteinázokat kívántunk vizsgálni. A fehérjék expressziója pMalC2-H6 vektorrendszerben történt, mely imitálja a HIV-1 PR prekursor formáját, ezért a vizsgálata a poliprotein formában lévő proteolitikus enzimforma tulajdonságairól adhat felvilágosítást. Tisztítás után elvégeztük a vad típusú és mutáns HIV-1 fúziós proteinek enzimatikai jellemzését és a kapott adatok összehasonlítását. A vizsgálatok során kapott specificitási eredményeket az enzimek molekuláris modelljeinek figyelembevételével értelmeztük. (OTKA T43482, T34479)

P-05 Fehérjetermelő *in vitro* translációs vektorok fejlesztése

Bardóczy V.¹, Géczy V.¹, Mészáros T.²

¹BME, Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék, Budapest;

²SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet,

Budapest

A proteomikai kutatások gyakori limitáló lépése a kérdéses fehérje megfelelő mennyiségben és minőségben történő előállítás. Napjaink általánosan elterjedt fehérjetermelő eljárásai élő sejtek alkalmazásán alapulnak, minek következtében a sejtek fiziológiáját kedvezőtlenül befolyásoló fehérjék termelése különös problémát jelenthet. Az eukarióta fehérjék előállításával kapcsolatos további nehézség, hogy döntő részük *E. coli* termelőszervezetben nem veszi fel a megfelelő másodlagos, harmadlagos szerkezetet, így ezek termelése során költség- és időigényesebb eukarióta sejt rendszeret kell alkalmazni. A búzacíra-sejtkivonaton alapuló *in vitro* fehérjetermelés mentes a fenti hátrányos tényezőktől, így módon ígéretes alternatívája a hagyományos fehérjetermelő rendszereknek. Munkánk során búzacíra-sejtkivonatra optimalizált *in vitro* translációs vektorokat fejlesztettünk tovább. A létrehozott vektorcsalád tagjai a ligálásfüggetlen klónozás (LIC) alkalmazásával lehetővé teszik a kívánt gént hordozó vektorok gyors és egyszerű előállítását. A translációs reakcióval szintetizált fehérjék affinitástisztításra alkalmas motívumhoz funkcionáltak, a fehérjék elválasztását követően a tisztításra használt motívumok pedig proteázhasítással eltávolíthatók. A vektor funkcionálási tesztje során az *in vitro* fehérjetermeléssel szintetizált fehérje kinázaktivitása nagyságrendekkel nagyobbak adódtak, mint az *E. coli* szervezetben termelté. A továbbfejlesztett vektorok ezen tulajdonságai következtében megfelelnek a modern proteomikai kutatások követelményeink, lehetővé teszik nagyszámú fehérje általános lépések alkalmazásával történő, gyors előállítását.

P-06 Nod-like receptorok és funkcionális partnereik konstitutív és UV-B indukálta expressziója humán korneális epitelsejteken

Benkó Sz.¹, Tózsér J.², Miklóssy G.², Kádás J.², Csutak A.³, Berta A.³, Rajnavölgyi É.¹

DE OEC, ¹Immunológiai Intézet, Debrecen; ²Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; ³Szemészeti Klinika, Debrecen

A Nod-like receptorok (NLR) családjának tagjai olyan citoszolikus fehérjék, melyek szerkezetileg hasonlítanak a természetes immunválasz kialakításában szerepet játszó Toll-like receptorokhoz (TLR), illetve a növényi rezisztenciáért felelős R-fehérjékhez. Speciális komplexek (például inflammaszóma, szignaloszóma) részeként képesek érzékelni a patogén vagy saját károsodott struktúrákat, IL-1b vagy IL-18 gyulladásozó citokinek termelését és/vagy az NFkB/MAPK-út vonal szabályozását befolyásolhatják. A korneális epitelsejteken az immunrendszer első védelmi vonalaként a mikroorganizmusok elleni védekezés mellett fontosak a retina traumával és stresszfaktorokkal (például UV sugárzással) szembeni védekezésében. Míg a TLR expressziója már széles körben tanulmányozott, az NLR fehérjék expresszióját eddig még nem vizsgálták humán korneális epitelsejteken. Munkánk során összehasonlítottunk immortálizált humán korneális epitelsejt vonal (HCE-T) és szemkorrekciós műtétekből származó (PRK) humán primer korneális epitelsejtek NLR mRNS-expresszióit Q-PCR technika segítségével. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy UV-B sugárzás hatására hogyan változik a korneális epitelsejt vonalban az NLR-ek génexpressziója és citokintermelése. Eredményeink szerint a sugárzást követő 6. órában az általunk vizsgált NLR-ek mRNS-szintje csökkent. A sugárzást követő 24. órában azonban, míg a komplexeket alkotó adaptorok (ASC, Cardinal) és enzimek (kaspázok) szintje továbbra is alacsony volt a kezeletlen mintákhoz képest, addig a Nalp-szenzorok mRNS-szintjei a kontrollhoz képest nem változtak vagy indukálódtak. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy UV sugárzás hatására a szenzorok érzékelhetik a károsodott molekulákat, a csökkent adaptor- és kaspázszintek miatt viszont nem áll össze funkcionális inflammaszóma, nem indul gyulladási folyamat.

P-07 Sejt felszíni tiolfunkciót gátló nukleotid, s⁴UMP antiproliferatív hatása tumorsejt vonalokon és primer tumorsejteken

Berényi E.¹, Benkó I.², Beck Z.³, Tárkányi I.⁴, Kovács P.⁵, Kiss A.⁵, Fésüs L.¹, Aradi J.¹

DE OEC, ¹Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen;

²Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Debrecen; ³Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen; ⁴III. sz. Belgyógyászati Klinika, Debrecen;

⁵II. sz. Belgyógyászati Klinika, Debrecen

A 4-tio-uridilát (s⁴UMP) tRNS-ekben előforduló természetes pirimidin-nukleotid. Hajlamos keto-enol tautomeriára, így enol formája a 4-es pozícióban egy reaktív tiolcsoportot hordoz. Ez a vegyület 2–20 µg/ml koncentrációban számos tumorsejt vonal viabilitását csökkenti (MTT assay). Különösen aktív leukémiák és kissejtes tüdőcarcinóma-sejtekkel szemben, de más eredetű malignus sejtvonalak proliferációját is gátolja. *In vivo*, egérben intravénásan adva 1000 mg/kg koncentrációban sem mutatható ki toxikus hatása. Akut mieloid leukémiás beteg első diagnosztikus csontvelői blastsejtjeinek kolóniaképző aktivitását azonos koncentrációban jobban gátolja, mint a sejtvonalak proliferációját (~10 µg/ml). Előzetes kísérleti adatok azt jelzik, hogy az s⁴UMP apoptózist indukál, de a pontos szignálút vonal nem ismert. Nukleotid lévén, az s⁴UMP nem juthat be a sejtekbe. Reaktív tiolcsoportja sejt felszíni eseményeket befolyásolhat, reakcióba lépve fehérjék tiolcsoportjaival, ezáltal gátolva a sejt felszíni oxidoreduktív folyamatokat, tiolfunkciókat. Fontos támadáspontja lehet a sejt felszíni protein diszulfid izomeráz és tioredoxin. Ezzel jó összhangban van az, hogy gátolja a glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz enzimet, melynek aktív centrumában esszenciális tiolcsoport található. Az s⁴UMP ígéretes, potenciális tumorelleses ágens, melynek szabadalmi bejelentése megtörtént, a szabadalom tulajdonosa a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centruma lesz (PCT/HU2007/000004). Az s⁴UMP előállítását a Biomer Kft. végzte.

P-08 Magreceptorok- és koregulátoraik kölcsönhatásának vizsgálata *in vivo* fluoreszcenciámikroszkópiával

Brázda P.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A magreceptorok az általuk befolyásolt folyamatok révén a többsejtű szervezet működésének gyakorlatilag minden területére hatással vannak, beleértve az embriogenezist, a homeosztázis fenntartását, a szaporodást, valamint a sejtek növekedését és halálát. Olyan transzkripció faktorok,

melyek ligandumfüggő módon képesek szabályozni célgénjeik átíródását. A magreceptorok fehérjecsalcájába tartoznak a szteroidreceptorok – például az ösztrogénreceptor és a progeszteronreceptor – és a retinoidreceptorok is. Utóbbi csoportba tartozik a reténsavreceptor (RAR) és a retinoid-X-receptor (RXR). A működésüket leíró általános modell alapján ligandum hiányában korepressor komplex kötődik hozzájuk, s a transzkripció ekkor gátolt. Agonista ligandum hatására a lezajló konformációváltozások nyomán koregulátorcseré történik, melynek eredményeként a receptordimerhez koaktivátor kapcsolódik. A célgén transzkripciója ekkor aktív. A területen zajló intenzív kutatások ellenére számos alapvető kérdés vár még megválaszolásra. Munkám során a receptor-receptor-, illetve a receptor-koregulátor-molekulák kölcsönhatását, annak dinamikáját és ligandumkezelés hatására történő változását tanulmányozom. Ehhez fluoreszcens mikroszkópiás eszközöket alkalmazok. Fluoreszcens korrelációs spektroszkópiával (FCS) lehetséges fehérje–fehérje kölcsönhatások *in vivo* tanulmányozása. Így tehát a módszer segítségével élő sejtekben tanulmányozhatók a receptordimerek és a koregulátorkomplekx kialakulása és mobilitása. A kísérletekhez zöld, illetve vörös fluoreszcens fehérjével (GFP, mRFP) fuzionált RXR, RAR magreceptor, DRIP, ACTR koaktivátor- és SMRT korepresszorklónokat hoztam létre. A konstruktumok HeLa- és COS-1-sejtekbe történő transzfecciója után lehetséges autokorrelációs mérésekkel a fehérjék mobilitásának vizsgálata, FRET és FCS alkalmazásával pedig a kialakuló kölcsönhatások tanulmányozása.

P-09 A poli-(ADP-ribóz) polimeráz-2 aktivitásának kimutatása a zsírsejt-differenciáció során

Brunyánszki A.¹, Sipos A.¹, A. Huber², V. Schreiber³, Kiss B. K.², Gergely P.¹, Virág L.¹, Bai P.¹

¹DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ²Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen; ³Strasbourg School of Biotechnology, University Louis Pasteur, Illkirch, France

A poli-(ADP-ribóz) polimeráz-2 enzimnek (PARP-2) kiemelkedő szerepe van a DNS-javító mechanizmusokban, bizonyos stresszfaktorok által kiváltott nekrozisban és több más folyamatban. Előzetes munkánk során kimutattuk, hogy a PARP-2 a zsírsejt-differenciációt szabályzó peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ (PPAR γ) fontos kofaktora. A zsírsejtek fejlődése és differenciálódása *in vitro* modellekkel vizsgálható. A differenciálódás folyamata két fázisra bontható. Az első fázist klonális expanziónak nevezzük (1–2 nap). Ekkor a sejtek számos sejtosztódáson esnek át. A második szakasz a terminális differenciáció, ekkor a differenciálódó sejtek citoplazmája lipidcseppekkel telítődik (3–6 nap). Vizsgálatainkban 3T3-L1 sejtek differenciációja során vizsgáltuk a PARP-2-expresszió változását, illetve a PARP-2-aktivitás megjelenését. A 3T3-L1 sejtek indukálása után a PARP-2 expressziója megemelkedik a klonális expanzió során, ám lecsökken a terminális differenciációban. Indukció után a sejtekben egy kb. 70 kDa molekulatömegű, nukleáris, poli-ADP-ribozilált sáv jelenik meg. A differenciáció 3. napjától megjelenik egy kb. 110 kDa sáv, mely a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) automodifikációjának tekinthető, miközben a 70 kDa sáv intenzitása folyamatosan csökken. PARP-2^{-/-} egérembrío-fibroblasztsejtekben (MEF) a 70 kDa sáv intenzitása jelentősen csökken a vad típushoz képest, vagyis a PARP-2 aktivitásához köthető a 70 kDa molekulatömegű fehérje módosítása, a PARP-1^{-/-} MEF-sejtekben nem tapasztaltunk változást a 70 kDa sáv megjelenésében. A 70 kDa sáv poli-ADP-ribozilálása specifikus PARP-inhibitorral gátolható. A PARP-aktivitás első két napon történő gátlása csökkentette a 3T3-L1 sejtek differenciálódását. A PARP-2 a zsírsejt-differenciációt tehát nemcsak a terminális differenciáció fázisában szabályozza, hanem már az expanziós fázisban is szükséges. Kísérleteink alapján különböző jelátviteli útvonalak játszanak szerepet a PARP-2 aktiválásában. (FEBS Long Term Fellowship, ETT 12/2006, OTKA K60780, Bolyai ösztöndíj, CNRS, ULP, EDF, CEA, ARC, Ligue Contre la Cancer, ANR)

P-10 A TIMAP fehérje a tüdőendotélium gátfunkcióját pozitívan szabályozza

Czikora L.^{1,2}, Oláh G.², A. D. Verin³, Csontos Cs.^{1,2}

¹DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ²Dept. of Medicine, Div. of Biological Sciences, University of Chicago, Chicago
A TIMAP (TGF β -inhibited membrane-associated protein) fehérje expressziós szintje az endotélsejtekben igen magas más sejtípusokhoz viszonyítva. Szerkezetéből adódóan a MYPT család tagja, így azt feltételezik, hogy a PP1c egy regulátor alegysége az endotélsejtekben. Rekombináns GST-TIMAP fehérjét állítottunk elő és pull-down assay segítségével vizsgáltuk humán tüdőartéria endotélsejtjeinek (HPAEC) PP1c α - és β -izoformáival való kölcsönhatását. A TIMAP a PP1c β -izoformájához

kötődik, az α -izoformához viszont nem. A TIMAP endotéliumban betöltött fiziológiai szerepének vizsgálatához siRNS módszert használtunk. Csökkentett (<10%) TIMAP-tartalmú monoretegen mértük a sejtek elektromos rezisztenciáját különböző effektorok jelenlétében. A kontrollhoz képest a gát (barrier) funkciót erősítő szfingozin-1-foszfát és ATP hatása lecsökkent, míg a gátdiszzfunkciót kiváltó ágensek, thrombin és nokodazol, megemelkedett. Ebből arra következtettünk, hogy a TIMAP a gátfunkciót pozitívan szabályozza. Immunfluoreszcenciás módszerrel kolokalizációt mutattunk ki a TIMAP és a moezin (ezrin-radixin-moesin (ERM)) fehérjecsalcád tagja) között HPAEC-ben. Ezt a kölcsönhatást immunprecipitációval is meg tudtuk erősíteni, így feltételezzük, hogy a TIMAP az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásán keresztül fejtheti ki védő funkcióját. A HPAEC cAMP-szintjét forskolinnal megemeltük, majd vizsgáltuk az ERM fehérjék foszforilációs szintjét további kezelések nélkül, illetve thrombin adása után. A forskolin-előkezelés a thrombin által kiváltott gátdiszzfunkciót kivédte, nem jelentek meg aktin stresszkábelek, az ERM fehérjék foszforilációja sem emelkedett meg. siRNS-sel kezelt sejteknél a forskolin ugyanezen hatását nem tapasztaltuk, amiből arra következtettünk, hogy a TIMAP ERM fehérjéket szabályozó funkciója protein kináz A-aktivitás által kontrollált. (OTKA T043133 és az NIH HL067307, HL58064)

P-11 A szöveti transzglutamináz neutrofilgranulocita-differenciálódásban betöltött szerepének vizsgálata

Csomós K., Balajthy Z., Zahuczky G., Fésüs L.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A mieloid eredetű neutrofil granulociták differenciálódása a csontvelőben kezdődik, majd az innen kijutó előalakok a keringésben válnak érett funkcióképes sejtekké. A csontvelői osztódó promielocitasejtek nem tartalmaznak szöveti transzglutamináz (TG2), azonban a differenciálódásuk során az enzim indukálódik és az érett sejtek citoplazmájában és sejt-magjában nagy mennyiségű aktív enzim mutatható ki. Az TG2 neutrofil granulocitasejtekben betöltött szerepének megismerése érdekében két modellrendszerben vizsgáltuk. Egyrészt rendelkezésünkre áll a TG2-kiütött egértörzs, másrészt az NB4 promielocita-sejtvonal, melyből all-transz-retinsavas (ATRA) kezeléssel egy, a természetes neutrofil granulocita állapothoz közeli alak differenciálható. Lentivirus alapú shRNS-vektor felhasználásával az eredeti NB4 sejtvonalból létrehoztunk egy stabil TG2-kiütött sejtvonalat, mely az ATRA-kezelés után is csak mintegy 15%-ban képes a TG2 enzimet expresszálni. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy amennyiben a sejtek differenciációja TG2 hiányában (KO egér), illetve csökkentett expresszió (kiütött NB4) mellett zajlik, több, a neutrofil funkcióban szerepet játszó gén expressziója megváltozott indukciót mutat. Eredményeink felvetik a sejtmagi transzglutamináz génextpressziót moduláló szerepét. Ennek kiderítése érdekében, hogy a TG2 mely gének expresszióját befolyásolja a neutrofil granulociták differenciálódása során, teljes génextpressziós vizsgálatot végeztünk DNS-microarray technika alkalmazásával. Összehasonlítva a TG2-kiütött NB4 sejtek differenciálódására jellemző génextpressziós mintázatot a normál NB4 sejtekével 100 körüli gént találtunk, amelyek legalább háromszoros expressziós növekedést vagy csökkenést mutattak a TG2-kiütött sejtekben. A kiválasztott gének mRNS-szintjének változását TaqMan low density array használatával erősítettük meg. Az azonosított gének között több neutrofil funkcióval kapcsolatos gén, a sejtproliferáció, valamint az apoptózis folyamatában szerepet játszó gén szerepel.

P-12 A humán szöveti transzglutamináz szubsztrátspecifitásának tanulmányozása in silico módszerekkel – a rendezetlen régiók szerepe a szubsztrátfelismerésben

Csosz É.¹, Bagossi P.², Dosztányi Zs.³, Simon I.³, Fésüs L.¹

¹DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; ²Apoptózis Kutatólaboratórium, Debrecen; ³Retrovirális Biokémiai Laboratórium, Debrecen; ⁴MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A transzglutaminázok (TG) a fehérjék Ca²⁺-függő poszttranszlációs módosítását katalizáló enzimek, amelyek ϵ -(γ -glutamil)-lizin-keresztkötések hoznak létre a polipeptidláncok glutamin- és lizinoldallancai között. Továbbá részt vesznek a glutaminoldallancok deamidálásában (például gliadin, RhoA), az ϵ -(γ -glutamil)-lizin-keresztkötés és bizonyos észterek (például *p*-nitrofenil-acetát) hidrolízisében és észterkötések létrehozásában. A TG2 és TG3 esetében kimutatták az enzim GTPáz aktivitását; GTP jelenlétében, a TG2 G-fehérjeként a szignalizációban vesz részt. A TG2 transzamidációs szubsztrátspecifitása jelenleg nem ismert, a szubsztrátként felhasznált aminosavak a fehérje felszínén helyezkednek el. Mun-

kánk során a TG2 szubsztrátfehérjét egy adatbázisba rendszereztek (<http://www.fuel1.biochem.dote.hu/TRANSDAB>), és a kristályszerkezettel rendelkező fehérjékben a glutamin, illetve a lizin 3D környezetét vizsgáltuk. Továbbá a szekvencia alapján, az IUPred, DISPROT, VL3H prediktorok segítségével megjósoltuk a fehérjékben a rendezetlen régiókat. A számos, eddig azonosított TG2-szubsztrát közül néhány fehérje teljesen rendezetlen szerkezetet mutat (például β -kazein, α -szinuklein, oszteopontin, citokróm C stb.), míg más fehérjék esetében (például troponin I, α -B-kristallin, fibrinogén stb.) a szubsztrát glutamint, illetve lizint tartalmazó régiója rendezetlen. Az eredményeket összefoglalva feltételezhetjük, hogy a rendezetlen régiók fontos szerepet játszanak a TG2 szubsztrát-specifitásának kialakításában.

P-13 Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin hatása az inzulinérzékenységre

Docsa T.¹, Hüse Cs.², Somsák L.², Németh J.³, Döbrönte R.³, Szilvássy Z.³, Peitl B.³, Gergely P.⁴

¹MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen; ²DE TEK-TTK, Szerves Kémia Tanszék, Debrecen; ³DE OEC, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debrecen; ⁴DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A diabetes mellitus genetikai és környezeti tényezők együttes hatására alakulhat ki, anyagcsere zavarak és érrendszeri szövődmények képében. A betegek többsége nem szorul inzulinkezelésre (nem inzulindependens diabetes mellitus, NIDDM), mert rendelkeznek endogén inzulinnal, azonban az inzulin nem tudja vércukorszint-csökkentő hatását kellően kifejteni. A NIDDM terápiájának egyik lehetősége az orális hipoglükémizáló szerek alkalmazása. Korábbi eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) a glikogén lebontásának gátlásával ($K_i=5-10 \mu\text{M}$) és szintézisének elősegítésével hatékonyan elősegítheti a vér normoglycaemiájának kialakítását. Munkánk során vizsgáltuk (normál és streptozotocin indukálta diabeteses állatokban) a TH által a vér glükózkoncentrációjának a változására és az állatok inzulinérzékenységére kifejtett hatást. Bebizonyítottuk hogy *in vivo* adagolt TH hatására az indukált diabeteses állatokban csökkent a plazma glükózkoncentrációja, és növekedett az állatok inzulinérzékenysége.

P-14 Előkísérletek a mononukleáris fagociták fagocitotikus aktivitásának posztgenomikai vizsgálatához

Doró Z., Erdei S., Fésüs L., Keresztes G.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Sejtjeink többsége rövidebb ideig él, mint a szervezetünk. Szöveiteink állandóan megújulnak, az öreg vagy szükségtelen sejtek elhalnak, és helyüket újak veszik át. A szervezetünket érő fertőzések, sérülések során is rengeteg sejt pusztulhat el. Az elhaló sejtek vagy a környezetbe távoznak, vagy gyakrabban a szervezetben található mononukleáris fagociták, a makrofágok és dendritikus sejtek veszik fel és bontják le őket. E folyamat során a teljes szervezetünk akár évente kicserélődhet, bizonyos sejtípusok lassabban, mások gyorsabban. A különböző okokból elhaló sejtek különbözőképpen is halnak el, s a különbözőképpen elhaló sejteket a mononukleáris fagociták különbözőképpen ismerik fel. Ennek hatására különböző jeleket bocsátanak ki, amelyek fontos információt szolgáltatnak az immunrendszer sejtjeinek, de feltehetőleg szerepük van a szövetek homeosztázisában és regenerációjában is. A mononukleáris fagociták heterogenitást mutatnak annak tekintetében, hogy egy adott fagocitózis-szubsztrátípusot felvesznek-e vagy sem. Nem világos az, hogy az alaktanilag és a jelenleg ismert sejt felszíni markerek kifejeződése szempontjából homogénnek tűnő fagocitapopulációk miért mutatják ezt a heterogenitást. Középtávú célunk az, hogy posztgenomikai módszerekkel kiderítsük a heterogenitás molekuláris alapját, illetve azt, hogy a különböző fagocitózisszubsztrátok bekebelezése milyen változásokat indukál a mononukleáris fagocitákban. Ahhoz, hogy posztgenomikai módszereket tudjunk a jelenség vizsgálatára felhasználni, számos technikai nehézséget kell leküzdenünk. Poszterünk ezen akadályok leküzdésére tett kezdeti lépéseinket mutatja be.

P-15 Az apoptotikus sejtek felvételére képes mononukleáris fagociták tisztítására alkalmas eljárás kifejlesztése

Erdei S., Doró Z., Fésüs L., Keresztes G.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Szervezetünkben naponta átlagosan minden ötszázadik-ezredik sejt kicserélődik, s az öreg vagy haszontalan sejtek természetes sejtihalállal elhalnak. Bár az elhaló sejteket a környező sejtek is felvehetik, különleges szerep jut ebben a feladatban a mononukleáris fagocitáknak, a dendritikus sejteknek és a makrofágoknak. Az eddig vizsgált mononukleáris

fagocitapopulációk szinte kivétel nélkül heterogénnek bizonyultak az apoptotikus sejtek felvételére való képesség tekintetében. E heterogenitás oka ma még alig ismert. A heterogenitás vizsgálatát nehezíti, hogy máig nem ismert olyan marker, amely képes lenne az apoptotikus sejteket fagocitálni képes és képtelen sejt populációkat szétválasztani. Ilyen markereket legegyszerűbben úgy kereshetünk, ha az apoptotikus sejteket fagocitálni képes és képtelen sejt populációkat szétválasztjuk, és a szétválasztott frakciókat összehasonlítjuk. Ilyen módszer azonban jelenleg nem áll rendelkezésre. Kísérleteink célja egy ilyen eljárás kifejlesztése. A javasolt eljárásban a fagocitózisszubsztrátok apoptotizáló neutrofil granulociták. Választásunk két okból esett e sejtekre. Egyrészt ez a sejtípus maga is fagocitál, ami lehetővé teszi a sejtek jelölését mágnesezett részecskékkel, másrészt a neutrofil granulociták spontán apoptotizálnak. Ilyen módon viszonylag egyszerűen előállíthatunk mágnesezett apoptotikus neutrofil granulocitákat. A mágnesezett fagocitózisszubsztrátot felvevő mononukleáris fagociták maguk is mágneseződnek, így lehetőség nyílik az apoptotikus sejteket fagocitálni képes és képtelen mononukleáris fagocitapopulációk hatékony szétválasztására.

P-16 Az Ac-202, új típusú rákellenes szer génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata

Faragó N.¹, Fehér L.², Puskás L.^{1,2}

¹MTA SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged;

²Avicor Kft., Szeged

Korábbi vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy az Ac-202 különböző humántumor-sejtvonalakon tumorellenes aktivitást mutat. Kísérleteinkben az anyag tumorellenes hatásának mechanizmusára vonatkozó információkra voltunk kíváncsiak, amelyet a sejtekre gyakorolt génexpressziós mintázatból kívántunk kikövetkeztetni. Munkánk során különböző koncentrációban alkalmazott Ac-202 anyagot RVH melanóma-sejtvonalakon inkubáltunk. Teljes RNS-tisztítás után a transzkripció változásokat DNS-chip-technikával vizsgáltuk. Ehhez 40 000 génpróbát tartalmazó oligonukleotid DNS-chipeket alkalmaztunk. Több represszáldó, illetve túlexpresszáldó gént is azonosítottunk. A változást mutató génekre specifikus univerzális TaqMan PCR primereket terveztünk, melyeket Sybr Green és univerzális TaqMan PCR technikákkal elemeztünk. Több olyan gén változását sikerült detektálnunk, amelyek az Ac-202 anyag tumorellenes hatását megmagyarázhatják.

P-17 Inhibitorból aktivátort: sejtpermeabilis kalpainspecifikus aktivátor előállítás és tesztelése agszeleten

Farkas A.¹, Világi I.², Kiss D. S.², Borbély S.², Halasy K.³, Bánóczy Z.⁴, Hudecz F.¹, Friedrich P.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²ELTE TTK, Neurobiológiai Tanszék, Budapest; ³SzIE ÁOTK, Anatómia és Szövettan Tanszék, Budapest;

⁴ELTE TTK, Peptidkémiai Kutatócsoport, Budapest

Korábban kimutattuk, hogy a kalpasztatin A és C szubdomének 1-1 arányú elegye *in vitro* aktiválja az m-kalpain. Ennek alapján kifejlesztettünk egy sejtpermeabilis kalpainaktiváló párt. A kalpasztatin A és C peptidkezek oligoarginin jelzést (*tag*) kapcsoltunk, amely elősegíti a fragmensek sejtbe jutását. Az aktiváló hatást *ex vivo*, patkányagyszeleteken vizsgáltuk. Az agykéreg és a hippokampusz alap- és hosszú távú megerősítés (LTP) ingerlékenységének változását követtük nyomon. A hippokampus régióban mind az alapinglerlékenység, mind az LTP jelentős növekedését tapasztaltuk az aktivátorpár hatására. Feltételezésünk szerint az aktivátorkonjugátumok bármely emlőssejtípuson eredményesen alkalmazhatók a kalpainok aktiválására oly módon, hogy közben az egyéb – kalciumfüggő – jelátviteli utak nem aktiválódnak. Ez a specifikus aktivátorpár számos új lehetőséget nyit a kalpainfüggő sejten belüli folyamatok tanulmányozására.

P-18 Az Ac-202, új daganatellenes vegyület hatásának igazolása humán sejt kultúrákban és állatkísérletekben

Fehér L.¹, Rásó E.², Molnár E.¹, Vizler Cs.³, F. Ayaydin⁴, Puskás L.¹

¹Avicor Kft., Szeged; ²Országos Onkológiai Intézet, Tumorprogressziós Osztály, Budapest; ³MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ⁴MTA SZBK,

Mikroszkópos Sejtanalízis Labor, Szeged

Lipidcseppecskékkel kölcsönható vegyületsalád különböző tagjainak hatását vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal és kolorimetriás sejtosztódási teszttel (MTS *assay*) humántumor- és normál sejt vonalakban. A vegyületek közül az Ac-202 citotoxikus hatást mutatott és potenciálisan kemoterápiás szernek bizonyult. Az Ac-202 fluoreszcens vegyület sejten belüli lokalizációját és szöveti eloszlását konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Kísérleti állatokat különböző időtartamig, különféle ol-

dószemben feloldott Ac-202 vegyülettel kezeltünk, melyet többféle módon (i.v., i.p. és per os) juttattunk be. Vizsgáltuk a vegyület farmakokinetikáját az egerek szerveiből (szív, vese, máj, agy és tüdő) készült metszetek fluoreszcencia intenzitása alapján. A daganatellenes aktivitás meghatározására patkányok különböző tumorok szubkután implantálását követően i.p. Ac-202-kezelést kaptak. Két óra múlva a vegyület minden vizsgált szervbe, így a tumoros szövetekbe is felszívódott, azonban hat óra múlva az anyag mennyisége jelentősen lecsökkent. Patkánylépbe oltott tumor esetén az Ac-202 anyaggal elő- és utókezelt állatokban a letapadás és metasztázis kialakulását vizsgáltuk. Az előkezelt állatok esetében szignifikáns gátlást mutattunk ki. Továbbá 12 napon keresztül patkányokba per os bejuttatott vegyület csökkentette egy szubkután beültetett primer tumor növekedését is.

P-19 A minimál *Escherichia coli* fehérjetermelési képességének javítása

Fehér T.¹, Karcagi I.¹, Balikó G.¹, Umenhoffer K.¹, Györfy Zs.¹, Csörgő B.¹, G. Plunkett III^{2,3}, D. Frisch², J. Campbell², F. R. Blattner^{2,3}, Pósfai Gy.¹

¹MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; ²Scarab Genomics LLC, Madison, WI, USA; ³Dept. of Genetics, University of Wisconsin, Madison, WI, USA

Az *E. coli* genomjának teljes áttervezésével egy felhasználóbarát, könnyen programozható sejtet kívánunk létrehozni. A munka egyik célja a sejt rekombináns fehérjegyárként való alkalmazhatóságának javítása. A genom átalakítása során: *i.* a genom magját (*core*) megtartva a *niche*-specifikus szigeteket deletáltuk (66 szegmens, 20%); *ii.* az összes mobilis genetikai elemet (fágok, IS-elemek) eltávolítottuk; *iii.* hibás metabolikus útvonalakat korrigáltunk; *iv.* gyakorlati szempontból fontos géneket beültettünk. Mindezek eredményeként a sejt az erőforrásokat hatékonyabban használja (gyorsabb növekedés), a genom stabilabb (csökkent mutációs ráta), a sejt könnyebben transzformálható, egyes instabil plazmidok jobban fenntarthatók, rekombináns fehérjék magas szinten termelhetők. Nem várt módon egyes toxikus fehérjék expresszálatásával szemben a sejt toleránsabb. Ennek hátterében a ritka kodonokban gazdag génfrakció kiejtése, és ezzel a ritka kodonokhoz tartozó aminoacil-tRNS nagyobb mennyiségben való rendelkezésre állása állhat. További érdekesség, hogy a tervszerűen létrehozott MDS66 és a gyakorlatban szelektált standard fehérjetermelő *E. coli* BL21 törzs az újabb adatok szerint igen sok hasonlóságot mutat mind a géntartalomban, mind a génextpressziós mintázatban.

P-20 *A Thermobifida fusca* fajtól izolált intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata

Fekete Cs. A., Kiss L.

DE TEK-TTK, Biokémiai Tanszék, Debrecen

A Thermobifida fusca fajtól izolált intracelluláris β -D-xilozidáz katalitikus aminosav-oldalláncainak vizsgálatát specifikus kémiai módosítással végeztük. Az enzim által katalizált reakció sebességének pH-függése alapján megállapítható, hogy az enzim aktív centrumában két különböző pK_a-jű aminosav-oldallánc található, egy protonált és egy deprotonált aminosav-oldallánc, amelyek a szubsztrát hasításában vesznek részt. Annak bizonyítására, hogy az aktív centrumban egy karboxiláttípusú aminosav-oldallánc vesz részt a katalitikus folyamatban, a karboxilátot N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilkarbodiimid (EDAC) katalizálta peptidkötés kialakításával azonosítottuk, melyhez glicin-metil-észtert alkalmaztunk. Az enzim koncentrációfüggően inaktíválódott a módosítás során, ami igazolta a karboxiláttípusú katalitikus nukleofil jelenlétét. A katalitikus nukleofil azonosítására egy affinjelölőt, N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamidot szintetizáltunk. Az enzimet az affinitásjelölő koncentrációfüggő módon inaktíválta, melyből meghatároztuk az inaktíválás sebességi állandóját, valamint a reakció rendűségét, amely azt mutatta, hogy egy molekula affinitásjelölő egy molekula enzimmal reagált. Annak igazolására, hogy az inaktíválási reakció az aktív centrumban történt, kompetitív inhibitor jelenlétében is elvégeztük az inaktíválási reakciót, aminek eredményeként a kompetitív inhibitor megvédte az enzimet az inaktíválástól, igazolva azt, hogy valóban a katalitikus nukleofil szerepét betöltő aminosav-oldallánc módosult. Az inaktíválódás sebességének a pH-függését vizsgálva kimutattuk, hogy az inaktíválás sebessége az enzim pH-optimumán a legnagyobb, ezzel is igazolva, hogy a katalitikus nukleofil módosult.

P-21 Egy szerinproteáz-homológ központi szerepe a *Manduca sexta* immunrendszerében

Felföldi G.^{1,2}, I. Eleftherianos¹, R. H. ffrench-Constant¹, I. Venekei², S. E. Reynolds¹

¹Dept. Biology and Biochemistry, University of Bath, UK; ²ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A *Photorhabdus luminescens* (*Enterobacteriaceae*) Gram-negatív, rendkívül rovarpatogén baktérium, amelynek fertőzése teljesen szimbiota partnertől, *Heterorhabditis* sp. fonálféregtől függ. A *Photorhabdus* egyik lehetséges virulenciafaktora a PrtA, amely a serralizin-családba tartozó cink-metalloenzim. Feltételeztük, hogy az enzim szerepet játszik a fertőzés kialakításában, s ennek bizonyítására természetes szubsztrátfehérjéket kerestünk a dohányszender (*Manduca sexta*, Lepidoptera) hemolimfájában. Hat különböző, a PrtA által szelektíven hasított fehérjét találtunk, melyek közül az egyik az SPH-3. Erről kimutattuk, hogy transzkripciója bakteriális fertőzés hatására indukálható a *M. sexta* hemocitáiban és zsírtestjében egyaránt. RNS-interferencia (RNSi) technika használatával inaktíváltuk az SPH-3 gént, aminek következtében az SPH-3 mRNS-szintje nullára zuhant mind a zsírtestben, mind pedig a hemocitákban, valamint drasztikusan lecsökkent a rovarok túlélési ideje *Photorhabdus*-fertőzést követően. További kísérleteink kimutatták, hogy az SPH-3-géncsendesítés a *Manduca* immunfelismerő fehérjéinek (*Hem*, *Iml-2*, *PGRP*, *PRSP*, β GRP-1, β GRP-2) génátírására (mRNS-szintjére) semmilyen hatással nincsen, viszont az összes eddig ismert, effektor funkciót ellátó immunfehérje (attacin, cecropin, lebecin, lizozim, moricin, profenoloxidáz) mRNS-szintje nullára lecsökkent. Ezek a megfigyelések azt bizonyítják, hogy: *i.* a PrtA egyik hatása az immunválasz koordinálásának gátlása; *ii.* az SPH-3 központi szerepet játszik a *M. sexta* immun-jelátviteli rendszerében; *iii.* nem egy, hanem két, jobbra független jelátviteli útvonal létezik az immunfelismeréstől a génextpresszió-szabályozás felé.

P-22 Az aktivációs domén glicin-csuklópontjainak szerepe a tripszin aktivációjában és működésében

Gombos L., Kardos J., Patthy A., Medveczky P., Szilágyi L., Málnási-Csizmadia A., Gráf L.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A tripszinszerű szerin proteázok sajátos aktivációs mechanizmussal rendelkeznek, melynek során a zimogén egy rendezetlen doménje (aktivációs domén) rendezett szerkezetet nyer. E folyamat során az aktivációs domén szegmensei konzervált glicin-csuklópontok körül fordulnak el. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a konformációs flexibilitás szerepét az aktiváció folyamatában oly módon, hogy a csuklópontokban található glicineket alaninra cseréltük helyspecifikus mutagenézis révén. Megvizsgáltuk a mutációk hatását mind az aktivációt kísérő konformációs átmenet, mind pedig a tripszin katalitikus mechanizmusára. Mutánsaink zimogénszerű szerkezetet mutattak, melyet bizonyos aktivációs doménszakaszok megnövekedett flexibilitása, a molekula N-terminálisának fokozott hozzáférhetősége, valamint az aktív hely deformitása jellemez. Mindez arra utal, hogy a csuklópontok körüli flexibilitás csökkentése gátolja a zimogén/aktív enzim átalakulást, így eltolja a két forma közötti egyensúlyt a zimogén forma irányába. Szubsztrátanalógok kötődése azonban az aktív forma irányába tolja el az egyensúlyt, mivel inhibitoroktól állapotban a mutáns tripszinek is a vad típushoz hasonló szerkezeti jellemzőket mutattak. A zimogenitás mértéke jól korrelált a k_{cat} csökkentésével, illetve a K_M növekedésével. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a zimogénszerű szerkezet aktívá válás történő átalakulása indukált illeszkedés mechanizmussal történik.

P-23 Nagy áteresztőképességű tesztelési eljárások alkalmazása: kémiai, biokémiai és sejt alapú módszerek

Hegedűs Cs.¹, Kovács I.¹, Kovács K.¹, Kónya K.², Pazurik I.², Patonay T.², Virág L.¹

¹DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ²DE TEK-TTK, Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen

A modern gyógyszerkutatás alapja a gyógyszerjelölt molekulák azonosítása nagy áteresztőképességű tesztelési, ún. *high-throughput screening* (HTS) módszerekkel, melyek akár több százezer vegyület vizsgálatára is alkalmasak. Ennek a tipikusan gyógyszergyári környezetben működő technológiának egyetemi környezetben is van létjogosultsága, mivel a gyógyszergyárak csupán egy szűk célmolekula-spektrumra fókuszálnak, az egyetemi HTS viszont az akadémiai szféra alapkutatásaihoz kapcsolódva alkalmas kutatási célú gátlószerek, illetve kisebb betegcsoportok gyógyszerfejlesztési szempontból is ígéretes molekuláinak azonosítására. Vizsgálatainkban kémiai, biokémiai és sejt alapú módszerek beállításával indítjuk útjára a Debreceni Egyetem HTS-laboratóriumát, mely rendelkezik egy Tecan Freedom EVO folyadékkezelő robottal, Tecan 384 fejes mikroátalamosóval, Perkin-Elmer Victor V³ többszörös jelöléshez is alkalmas mikroátalamosóval, valamint a sejtes vizsgálatokhoz egy komplett sejtenyitő egységgel. Vizsgálatainkhoz a Debreceni Egyetem jelenleg 2000 molekulát tartalmazó molekulabankjának (<http://ret.chem.klte.hu/ret>) vegyületeit hasz-

náltak. Egyszerű kémiai reakcióval (ABTS dekolorezációs teszt) antioxidáns hatású vegyületeket azonosítottunk a molekulabankban. Enzimátikus módszerrel a poli-(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) potenciális gátlószereit kerestük, míg Jurkat humán T-sejtvonalon citotoxikus, illetve citoprotektív vegyületeket azonosítottunk Alamar Blue redukció alapuló eljárással. A laboratórium szolgáltatásai mind az egyetemi mind a külső partnerek rendelkezésére állnak (<http://www.parp.dote.hu/utslab.html>). (RET 06/2004, OTKA K60780, ETT257/2006)

P-24 Egy új proteázinhibitor-variáns kifejlesztése szerin proteázok hatékonyabb izolálására és proteomikai vizsgálatához

Héja D., Pál G.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A szerin proteázok olyan létfontosságú élettani folyamatokban vesznek részt, mint például az emésztés, vérárvadás, immunfolyamatok stb. Ezen enzimeket a részletes vizsgálathoz nagy tisztaságban kell előállítani. A tisztítás során gyakran használnak egy – tanszékünkön előállított – *E. coli* baktérium által termelt, széles specifikitású inhibitor, az ecotint. Az ecotin erősen köt egy sor szerin proteáz, például a tripszinteket, kimotripszinteket, elasztázokat, a vérárvadási faktorok közül pedig a Xa és XIIa fehérjét. Az ecotin homodimer fehérje, melyben a két alegység nem kovalens módon kapcsolódik egymáshoz. Egy dimer egyszerre két proteáz képes gátolni. Az ecotint eddig úgy használták affinitáskromatográfiai célra, hogy a nem kovalens dimert nem irányított módon kötötték kovalens kötésekkel a szilárd felszínhez. Ez két potenciális nehézséggel jár: a molekulák egy része proteáz kötésre alkalmatlan módon rögzül a felszínen, illetve a használat során azon dimerek, melyek csak egyik alegységükön keresztül rögzültek, elveszthetik a nem kovalensen rögzített alegységet. Ezen problémák elkerülésére rekombináns DNS-technikákkal két lényeges változást hoztunk létre az ecotinban. Egyrészt az egyik alegység C-terminálisát egy rövid peptidszakasszal a másik alegység N-terminálisához kapcsoltuk. Az így létrehozott egyláncú formában a két alegység immár kovalensen kapcsolódik össze. Másrészt az összekötő peptidben elhelyeztünk egy ciszteint. Ezen a felszíni ciszteinen keresztül az egyláncú ecotin irányított módon köthető szilárd felszínhez. Igazoltuk, hogy az új variánsok nagy mennyiségben termelhetők egyszerű bakteriális rendszerben, és megőrzik az eredeti vad típusú forma aktivitását. Ugyancsak igazoltuk, hogy a szabad ciszteinen keresztül az új forma irányított módon szilárd fázisra köthető, és sikeresen használható affinitáskromatográfiai célokra.

P-25 Regulált és nem regulált miozin II izoformák S2 fragmentumainak összehasonlító vizsgálata

Hóbor F., Süveges D., Kardos J., Nyitrai L.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A miozin II izoformák között szabályozottságuk alapján két fő típus különíthető el: a regulált és a nem regulált miozin II. A nem regulált miozinoknál a reguláció az aktinhoz kapcsolódó troponin–tropomiozin komplexen keresztül valósul meg. Ezzel szemben a regulált miozinoknál a szabályozás a regulációs könnyű lánc foszforilálásával (sima izom, nem izom miozin II) vagy közvetlenül a Ca²⁺-ionkoncentráción keresztül (kagylóizom) történik. A sima izom és a kagylóizom miozin II fehérjéinek kikapcsolott állapotában a fejek visszahajlanak és interakcióba lépnek a csavart csavar szerkezetű S2 doménnel (szubfragmentum 2), azaz a miozindrúd fejhez kapcsolódó N-terminális régiójával. Ennek tükrében azt várjuk, hogy a miozin II fehérjénél a rúd proximális részének flexibilitása meghatározó lehet a különböző izoformák működésénél. Kísérleteink során regulált (kagyló- és csirke-simaizom), és nem regulált (emlőszív- és -vázizom) miozin II S2 fragmentumok stabilitását vizsgáltuk spektroszkópiai (cirkuláris dikroizmus) és kalorimetriás (differenciált pásztázó kalorimetria) módszerekkel. Eredményeink szerint az S2 nagyobb stabilitást mutat a nem regulált miozinok esetében, ahol szerepe csupán a két fej együtt tartása, mint a regulált miozinoknál, ahol fontos funkcionális szerepet is betölt. Feltehetőleg a kikapcsolt, aszimmetrikus szerkezet csak úgy jöhet létre, ha az S2 N-terminális régiójában a csavart csavar szerkezetű dimer letekeredik. Kísérleti adatainkat alátámasztják a kagylómiozin II S2 röntgendiffrakciós szerkezetei, valamint *in silico* szekvenciaelemzések és molekuladinamikai szimulációk. (OTKA K61784, TS49812)

P-26 A DLC foszforilációja – egy érdekes szabályozás

Hódi Zs.¹, Molnár T.¹, Buday L.³, Schlett K.², Rapali P.¹, Kardos J.¹, Stafford W. F.⁴, Nyitrai L.¹

ELTE TTK, ¹Biokémiai Tanszék, Budapest; ²Élettani és Neurobiológiai Tanszék, Budapest; ³SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; ⁴Boston Biomedical Research Institute, Watertown, MA, USA

Az eukarióták egyik legkonzervatívabb fehérjeje a 10 kD molekulatömegű dinein könnyű lánc. A humán genomban két paralógja található: DLC1 és DLC2. Előbbit a dinein, míg utóbbit a miozin Va alegységeként írták le, de ezen motorfehérjéken kívül számos egyéb (>60) kötőpartnerük ismert. Szerkezetét tekintve a DLC homodimer, és a dimerizációval létrejövő árokba kötődnek a partnerfehérjéi. Korábbi munkáinkban már ismertettük a DLC2 általunk feltérképezett kötőhelyét a miozinon, és az ezen belül található három aminosavas, alternatívan kifejeződő B exon esszenciális szerepét a DLC kötésben. Miután kiderült, hogy a DLC szintje sok mellrákos sejtnél megemelkedik, és hogy ez kapcsolatba hozható a DLC Ser88 PAK1 kináz általi foszforilációjával, ezen a vonalon folytattuk a kísérleteket. Ser→Glu-cserével mimikáltuk a DLC foszforilációját, hogy stabil fehérjét kapjunk *in vitro* kísérletekhez. Gélszűrőssel, CD-spektroszkópiával és analitikai ultracentrifugálással bizonyítottuk, hogy a mutáns DLC szerkezetét tekintve monomer, aminek a két, térben nagyon közeli foszfát/glutamát az oka. A monomerizáció hatására azonban eltűnik a kötő árok is, így elvileg nem tudja kötni a partnereit. Ezt igazoltuk is néhány fehérje-fragmentummal (nNOS, PAK1), ám meglepetésünkre a nagyobb, stabil csavart csavar szerkezetű (tehát stabil dimer) miozin Va fragmentum kötötte a monomer DLC fehérjét is, ellentétben a monomer miozin-fragmentumokkal. Ez a felfedezés új változatokat nyithat a DLC működéséről és szabályozásáról alkotott eddigi elképzeléseinkben, mert fölveti, hogy a foszforiláció a kötő partnerek közti szelekcióban (is) szerepet játszhat. (OTKA K61784, TS49812)

P-27 Kalcineurin vizsgálata humán melanóma-sejtvonalakban

Juhász T.¹, Matta Cs.¹, Szijgyártó Zs.^{2,3}, Zákány R.¹

DE OEC, ¹Anatómia, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, Debrecen;

²Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ³MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen

A melanoma malignum cutis az epidermis pigmenttermelő sejtjeiből, a melanocitákból kiinduló, rosszindulatú daganatos megbetegedés. Mélyen invazív és metasztatizáló variánsai nagyon rossz túlélési prognózissal járnak. A melanómasejtek nagyfokú apoptózisrezisztenciát mutatnak, melyért részben a Ras-Raf-MEKK-ERK-útvonal hiperaktivitása felelős. Kísérleteinkben két eltérő biológiai viselkedésű humán melanóma-sejtvonalban vizsgáltuk a kalcineurin (Ca-/kalmodulinfüggő Ser/Thr protein foszfátáz) funkciót, melynek specifikus farmakológiai inhibitora a ciklosporin A (CSA). A HT-168M1 egy májmetasztázisból előállított, míg a WM35 egy metasztázist nem adó, de invazív (a bazális membránt áttörő, a dermiszben megjelenő) primer melanómából izolált sejtvonal. A WM35 sejtjei alacsonyabb szintű kalcineurinféherje-expressziót és enzimaktivitást mutatnak, amint azt *Western blot*, illetve enzimaktivitás-mérések segítségével találtuk. A MEKK-inhibitor PD098059 (2'-amino-3'-metoxi-flavon) vegyületet a melanómasejtek tápfolyadékához adva a kalcineurin fehérjeje alig detektálható a *Western blot* módszerrel, míg RT-PCR eljárással az mRNS-szint – feltehetőleg kompenzatorikus – enyhé emelkedését láttuk. Boyden-kamrában, kemoattraktánsként fibronektint használva, a WM35 sejtjei erőteljesebb migrációs aktivitást mutatnak, mint a HT-168M1 sejtvonal sejtjei. CSA-kezelésre ellentétesen reagáltak a migráció során a sejt-típusok: a HT-168M1 sejtjei közül a kezeletlen kontrollhoz képest többen migráltak, míg a WM35 sejtjeinek migrációs képessége erőteljesen csökkent. Eredményeink arra utalnak, hogy a kalcineurin szerepet játszhat a melanómasejtek invazívításának és apoptóziskészségének szabályozásában. (DE OEC Mecenatúra grant, OTKA K60620, ETT 083/2006)

P-28 Foszfátázinhibitorok és a MYPT1 szerepe a retinoblasztóma-fehérje defoszforilációjában

Kiss A.^{1,2}, Lontay B.¹, Márkász L.³, Oláh É.³, Gergely P.^{1,2}, Erdődi F.^{1,2}

¹MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen; ²DE OEC, Orvosi

Vegytani Intézet, Debrecen; ³DE OEC, Gyermekgyógyászati Klinika, Debrecen

A retinoblasztóma-fehérje (pRb) foszforilációja fontos szerepet játszik a sejtciklus során a G1/S-átmenet szabályozásában. A pRb defoszforilációjában a protein foszfátáz-1 (PP1) katalitikus alegysége (PP1c) szerepét feltételezik, a folyamatot szabályozó regulátor alegységet azonban még nem azonosították. Irodalmi adatok a pRb és a miozin foszfátáz holoenzim regulátor alegysége (MYPT1) kölcsönhatására utalnak. Ezért THP-1 leukémiás sejtekben tanulmányoztuk foszfátázinhibitorok és a MYPT1 lehetséges szerepét a pRb foszforilációs szintjének és degradációjának szabályozásában. Immunprecipitációs és *pull down* kísérletekkel igazoltuk a MYPT1 és a pRb kölcsönhatását, valamint fluoreszcens mikroszkópia segítségével kimutattuk részleges kokalizációjukat is THP-1 sejtek sejtmagjában. Foszfátázaktivitás-mérésekkel igazoltuk a MYPT1 szerepét a PP1c pRb szubsztráthoz való irányításában. Az apoptózist indukáló daunorubicinos

(DNR) kezelés növelte a sejtek foszfatázaktivitását. A protein foszfatázokat gátló kalikulin-A (CL-A) csökkentette a DNR által kiváltott kaszpáz-3-aktiválódás és pRb-degradáció mértékét, miközben növelte a pRb T826, valamint a MYPT1 T695 és T850 oldalláncainak foszforilációs szintjét. CL-A-kezelés hatására a MYPT1 részlegesen a citoplazmába transzlokálódik. Mindezek a tényezők a foszfatázaktivitás átmeneti csökkenését és a pRb foszforilációs szintjének növekedését eredményezhetik. Eredményeink szerint a PP1c pRb szubsztráthoz történő irányításában a MYPT1 fontos szerepet játszhat, és ez a miozin foszfatáz új szabályozó funkciójára utal. (BIOINKUB-DEBIOINK, ETT 244/2006, Mecenatura 07/2005)

P-29 A *Drosophila CalpA* gén expressziójának vizsgálata

Kókai E.¹, Pop F. S.², Molnár I.², Farkas A.³, Dombrádi V.¹, Friedrich P.³, Gausz J.², Ádám G.²

¹ DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ² MTA SZBK, Genetika Intézet, Szeged; ³ MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A *Drosophila*-genomban négy kalpaingén található, amelyek közül csak kettő terméke, a CalpA és a CalpB rendelkezik kalciumfüggő tiolproteáz-aktivitással. Kutatásaink során a *CalpA* gén szöveti kifejeződését vizsgáltuk az egyedfejlődés különböző szakaszaiban, CalpA-specifikus ellenanyag segítségével. *E. coli* baktériumban rekombináns 6xHis-CalpA fehérjét termeltettünk, amelynek felhasználásával poliklonális anti-CalpA ellenanyagot állítottunk elő nyúlban. A *CalpA* gén szerkezete egy hosszabb (2928 bp) és egy rövidebb (2341 bp) mRNS átíródását is lehetővé teszi. Az anti-CalpA antitest felismeri a hosszabb mRNS-ről képződő 94 kDa, és az ebből autolízisre keletkező 81 kDa molekulatömegű fehérjéket. Az antitest segítségével megállapítottuk, hogy a 94 kDa fehérje a *Drosophila* egyedfejlődésének minden szakaszában, a 81 kDa méretű pedig csak az első két lárvális stádiumban van jelen. A második és harmadik stádiumú lárvákban megjelenik egy 62 kDa méretű sáv is, amely a rövidebb mRNS-ről átíródó fehérjének felelhet meg. A kompetíciós kísérletekben a rekombináns CalpA fehérje jelenléte gátolta a specifikus jelek kialakulását. Immunhisztokémiai vizsgálataink kiegészítik a CalpA szöveti eloszlására vonatkozó korábbi adatokat. Kimutattuk, hogy a CalpA fehérje az általános membránlokálizáció mellett a legtöbb sejtben a sejtmagokban is kimutatható. Korai embriókban a CalpA az aktinsejtváz mentén található, a poszterior részen erősebb felhalmozódással. Petekamrákban már a fejlődés legkorábbi szakaszában megjelenik, s a későbbi stádiumokban mind a csírasejtek, mind a follikuláris sejtek sejtmembránja mentén és a sejtmagokban is megtalálható. Tesztiszekben a mitotikus sejtekben és a spermaticitákban egyaránt kifejeződik, ahol szintén membrán- és sejtmagi elhelyezkedést mutat. A CalpA fehérje kettős lokalizációját a lárvális szövetek közül a zsírtest, a gyűrűmirigy és az aorta sejtjeiben is ki lehet mutatni. Ezen kívül lárvában a CalpA a központi idegrendszer néhány sejtjében is látható, illetve az ímágókorongokban, ahol erős expresszió figyelhető meg. (OTKA 060723)

P-30 A kalcineurin szerepe az endotélsejtek citoskeletrendszerének újrendeződésében

Kolozsvári B., Bakó É.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Az endotélsejtek konfluens monoréteget alkotnak az erek belső falán. Feladatuk, hogy szelektív gátat képezzenek a keringő vér és a szövetek között. A citoskeleton elemeinek átrendeződése, az aktin-mikrofilamentumok és az aktin-miozin kölcsönhatás változásai meghatározzák például az endotélsejtek alakját és a vaszkuláris gát (*barrier*) integritását. Gyulladásos folyamatokban bioaktív ágensek hatására az endotélsejtek kontrakciója és így a sejtek közötti hézagok képződése figyelhető meg, a gátfunkció sérül, többek között a miozin könnyű lánc foszforilálásának következményeként. A reverzibilis fehérjefoszforiláció számos sejt-folyamat szabályozásában kiemelkedő jelentőségű. A foszforiláció protein kinázok, a defoszforiláció protein foszfatázok révén valósul meg. A kalcineurin (protein foszfatáz 2B, PP2B) kalcium/kalmodulinfüggő foszfo-Ser/Thr-specifikus enzim, mely két alegységből, katalitikus (CnA) és regulátor (CnB) doménekből áll. A katalitikus alegységnek három izoformáját mutatták ki endotélsejtekben (α , β , γ), amelyek pEGFP vektorban készített konstrukciói korábbi munkánk eredményeként rendelkezésünkre állnak. Kutatásaink során a kalcineurin katalitikus alegység különböző izoformáinak szerepét vizsgáljuk emlős-endotélsejtvonalban (CPAE CCL-229). Tanulmányoztuk a PP2B szerepét, a gátfunkció és a citoskeleton szabályozásában sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel. Vizsgáltuk a CnA alegység különböző izoformaplazmidjaival tranziensen transzfektált endotélsejtek citoskeletrendszerének változását thrombinkezelést követően. Vizsgálataink arra mutatnak, hogy a kalcineurin fontos szerepet tölthet be a gátfunkció regenerálásában, a diszfunkció megszüntetésében. (OTKA K60620)

P-31 Az uracil-DNS-degradációs faktor szerkezet-funkció vizsgálata csonkított mutánsaival

Kónya E., Pukáncsik M., Békési A., Vértessy G. B.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az uracil-DNS-degradációs faktor (UDE) fehérje nem mutat azonosítható homológiát egyetlen eddig azonosított nukleázcsaláddal sem. Az UDE fehérjéhez hasonló szekvenciákat összehasonlítva öt konzervált motívum azonosítható, melyekből az első duplikált. A másodlagos szerkezet vizsgálatából kiderült, hogy a duplikált fragmens főleg α -helikális. A limitált proteolízis eredményei arra utalnak, hogy a katalitikus kötőhelyet valószínűleg a megfelelő konzervált motívumok alakítják ki. Olyan UDE-mutáns fehérjéket tervezünk, melyek a konzervált motívumokat eltérő módon tartalmazzák. Az első csonkított mutáns (1-157 aminosav) csak az első motívumot tartalmazza az N-terminálison. Ez a fehérje inaktív, és nem vágja az uracil-DNS-t. A második csonkított mutáns (1-248 aminosav) a duplikált motívum mindkét tagját magába foglalja. A harmadik mutáns tervezésénél figyelembe vettük a limitált proteolízisra vonatkozó eredményeket, melyek szerint a C-terminális régió rendezetlen, flexibilis. Ezt a régiót levágva olyan csonkított mutánst hoztunk létre (1-340 aminosav), mely az összes konzervált szegmenst tartalmaz, és feltehetőleg proteolízisre kevésbé érzékeny. Reményeink szerint ezen mutáns kristályosításával képet kaphatunk a teljes enzim szerkezetéről. Célunk az UDE fehérje szerkezeti felderítése csonkított mutánsai által nagy áteresztőképességű (HTP) krisztallográfia segítségével. Az eddigi kristályosítási kísérleteink sikertelenségét az N- és C-terminális végeken lévő rendezetlen régió is okozhatta, így a csonkított mutások segítségével nemcsak a szerkezetéről, hanem a fehérje funkciójáról is felvilágosítást kaphatunk. Ezenkívül az 1-157 konstrukt multidimenzionális NMR-vizsgálatokra is megfelelő méretű, így itt oldatbeli szerkezetmeghatározás is lehetséges. (HHMI, GVOP, EUFP6)

P-32 Jelátviteli szfingolipidek sejtben belüli kalciumfelszabadításának lehetséges mechanizmusai: kalmodulin a hiányzó láncszem?

Kovács E., Liliom K.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A szfingozin-1-foszfát (S1P) és a szfingozil-foszforil-kolin (SPC) újonnan felismert jelátvivő molekulák. Érdekességük, hogy mind elsődleges, mind másodlagos hírvivők lehetnek. Míg sejt felszíni G-fehérje-kapcsolt receptorok azonosítottak és jól jellemzettek, addig nem sokat tudunk intracelluláris célfehérjéikről. Másodlagos hírvivőként legismertebb hatásuk, hogy a sejt belső raktáraiból kalciumot képesek felszabadítani – máig még tisztázatlan módon. Az SPC vegyületről kimutatták, hogy képes aktiválni a rianodinreceptort, az endoplazmatikus retikulum egyik kalciumcsatornáját. A kalmodulin, az egyetemes kalciumszensor, a rianodinreceptorhoz kötődve szabályozza annak működését. Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy az SPC kötődik a kalmodulinhoz, és disszociáltatja a kalmodulin-célfehérje komplexet, így gátolja a célfehérjék kalmodulin általi aktivációját. Ennek alapján feltételeztük, hogy az SPC úgy szabadít fel kalciumot a belső raktárakból, hogy a kalmodulint disszociáltatja a rianodinreceptorral, így befolyásolja annak működését. Hipotézisünk igazolására a rianodinreceptor kalmodulinkötő doménjét tartalmazó peptid és a kalmodulin kölcsönhatását vizsgáljuk SPC és S1P jelenlétében. Danziljelölt fehérje, valamint a peptid triptofánfluoreszcenciája egyaránt azt mutatja, hogy az SPC disszociáltatja a kalmodulin-rianodinreceptor peptidkomplexet, míg az S1P nem. A jelenség további megértéséhez agyból, illetve szívizomból preparált endoplazmatikus retikulumon mérünk SPC hatására bekövetkező kalciumfelszabadulást kalmodulininhibitorok, valamint feleslegben adott kalmodulin jelenlétében. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a kalmodulin a hiányzó láncszem az SPC és a rianodinreceptor között.

P-33 A *Drosophila* kalpain B enzimének működése foszforilációval regulálható

Kovács L.¹, Alexa A.², Sperka T.³, Tózsér J.³, Dombrádi V.¹, Friedrich P.²

¹ DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ² MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ³ DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A kalpainok Ca²⁺-aktivált neutrális, citoplazmatikus tiol proteázok, melyek sokoldalú szerepet játszanak a sejtben belüli jelátviteli folyamatokban. Szubsztrátfehérjéiken limitált proteolízist hajtanak végre, ezáltal új funkcionális állapotba hozva őket. A *Drosophila melanogaster* mint modellorganizmus segíthet megérteni az emlős-, illetve humán életfolyamatok molekuláris szintjeit, így e viszonylag egyszerű szervezetben számos kérdés könnyebben megválaszolható a kalpain és a protein kináz rendszerek

kölcsönhatásával kapcsolatban is. Ezért tanulmányoztuk a *Drosophila* kalpain B foszforilációját és az enzim aktivitását különböző foszforilációs állapotban. *In vitro* körülmények között igazoltuk a rekombináns kalpain B foszforilációját protein kináz A katalitikus alegységgel (PKA), MAP kináz 1 (ERK1) és MAP kináz 2 (ERK2) enzimekkel. Azt tapasztaltuk, hogy a PKA $0,2 \pm 0,04$; az ERK1 $0,56 \pm 0,29$; az ERK2 pedig $0,94 \pm 0,4$ foszfátcsoportot épít be a polipeptidláncba. Tömegspektrometriás módszerekkel meghatároztuk a PKA, ERK1 és ERK2 enzimeken a foszforilációs helyeket. Azt találtuk, hogy a PKA a Ser845 és az ERK1/ERK2 enzimek a Thr747 oldalláncot foszforilálják. Az így foszforilált kalpain B aktiválódását és aktivitását fluoreszcens dipeptidsubsztráttal (NYAMC), illetve egy fehérjesubsztráttal (MAP2c) követtük. Azt találtuk, hogy az ERK2 enzimmel végzett foszforiláció a kalpain B aktiválódást majdnem kétszeresére ($1,9 \pm 0,3$), az aktivitást közel másfélszeresére növeli. A többi kináz hatásának elemzése és az *in vivo* foszforiláció igazolása jelenleg folyik. (OTKA 60723, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj – Alexa Anita)

P-34 A szöveti transzglutamináz hatása a makrofágok gyulladási citokintermelésére

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

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az apoptotikus sejtfehérje gyulladáscsökkentő hatásával kapcsolatban általánosan elfogadott az a nézet, miszerint abban a főszerepet egy immunosuppresszáns hatású szolubilizáló molekula, a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) játssza. A TGF- β biológiailag inaktív fehérje formájában termelődik, makrofágok által történő 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 ezért azt kívántuk vizsgálni, hogy a TG2 hiánya befolyásolja-e az apoptotikus sejtek gyulladási citokintermelést (IL-6, TNF- α) csökkentő hatását hasüregi és csontvelői őssejtekből differenciáltott, Toll-like receptoron (TLR) keresztül ható lipopoliszachariddal (LPS) stimulált makrofágokban *in vitro*. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a TG2 távolléte nem – ezáltal az aktív TGF- β hiánya sem – befolyásolta a gátlás létrejöttét és mértékét. Ez azt mutatja, hogy a közvetlen gátlás folyamatában nem vesz részt sem a TG2, sem a TGF- β . Emellett mindkét makrofágtípusnál TG2 hiányában a sejtek magasabb szintű gyulladási citokintermeléssel reagáltak LPS-stimulációra. A TG2 tehát gátló módon beleszól a gyulladási citokinek TLR mediálta indukciójába, adataink alapján azonban nem TGF- β -függő módon. Transzferkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a makrofágok termelnek parakrin módon ható molekulát, mely a TLR fehérjéken kiváltott hatást csökkenteni képes, azonban a csökkenés TGF- β hiányában, illetve a TGF- β hatásának blokkolásakor is megfigyelhető volt. Ez nem zárja ki egyértelműen a TGF- β részvételét a folyamatban, csupán kétségbe vonja annak központi szerepét, és egyéb, eddig nem azonosított molekula – vagy molekulák – létezését veti fel. Emellett a csökkentő hatás LPS vegyületekkel, illetve apoptotikus sejt felülűszojával kezelt makrofágok felülűszojával is kiváltható volt. (OTKAT049445 ETT100/2033)

P-35 NADPH-termelés az endoplazmás retikulum lumenében

Margittai É.¹, P. Simona², B. Angelo², Bánhegyi G.¹

¹ SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest; ² Dept. Pathophysiology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy

Az endoplazmás retikulum (ER) lumene a citoszoltól elkülönült piridinnukleotid-készletet tartalmaz. A lumen redukzáinak, egyebek között a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának (11 β HSD1) kofaktor-ellátásához szükség van a NAD(P)H folyamatos újratermelésére. A 11 β HSD1 kulcsszerepet játszik a glukokortikoidok preceptorális aktiválásában, s így a metabolikus szindróma patogenezisében is. A jelenlegi feltételezések szerint a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PDH) az ER lumenális kompartmentumának legfontosabb NADPH-generáló enzime. Szubsztrátellátását az ER glukóz-6-foszfát transzportere (G6PT) biztosítja. A H6PDH szerepét vizsgálva patkány máji mikroszomális vezikulákban 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 anti-apoptotikus hatású a granulocitákban. A G6PT-H6PDH-11 β HSD1 rendszer elemeit patkány epididimális zsírszövetéből származó mikroszómá-

kon is kimutattuk. Feltevéünk szerint adipocitákban a rendszernek szerepe lehet a szénhidrátanyagcserét követő lokális glukokortikoid-aktivációban, s így a trigliceridraktározásban. Bár a H6PDH alapvető fontosságúnak tűnik az ER lumenális redoxhomeosztázis fenntartásában, a H6PDH-génkiütött egér életképes és gyakorlatilag tünetmentes. Ez arra utal, hogy a H6PDH mellett más dehidrogenázok is részt vesznek az intraluminális NADPH-termelésben. Patkány máj-mikroszómában kimutattuk, hogy a lumenben NADP⁺-függő izocitrátdehidrogenáz- és malátdehidrogenáz-aktivitás mérhető. Az aktivitások látensnek voltak, csak a membrán permeabilizálása után váltak mérhetővé. Bár az izocitrátdehidrogenáz-aktivitás kinetikai paraméterei eltértek a citoszolban található enzimétől, immunoblot-vizsgálatban a citoszolbeli izoenzim elleni antitest reagált a lumenális formával. Összefoglalás-képpen megállapíthatjuk, hogy az ER lumene több, NADPH-generálásra képes enzimet tartalmaz. Az enzimek NADPH-termeléshez való *in vivo* hozzájárulásának felmérése további vizsgálatokat igényel.

P-36 Ionotróp purinerg receptorok a differenciálódó kondrocitákon

Matta Cs.¹, Fodor J.², Juhász T.¹, Sziójyártó Zs.^{3,4}, Csernoch L.², Zákány R.¹

DE OEC, ¹Anatómia, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, Debrecen; ²Élettani Intézet, Debrecen; ³Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ⁴MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Munkacsoport, Debrecen

Az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában számos Ca²⁺-függő jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet. Kondrogenikus modellünkben a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer „nagy sűrűségű” mezenchimális sejt kultúrákban 6 nap alatt spontán porcképződés történik. A tenyésztés különböző napjain a kultúrák sejtjeiben az intracelluláris (*i.c.*) Ca²⁺-szintet fluoreszcenciás módszerrel megmérve a tenyésztés 3. napján átlagosan 140 nM *i.c.* Ca²⁺-koncentrációcsúcsot detektáltunk. A csúcsot kiváltó kalcium az extracelluláris közegből származik, mert a 2. és a 3. napon adott Ca²⁺-kelátor (EGTA) hatására elmarad az *i.c.* Ca²⁺-szint emelkedése. A detektált Ca²⁺-csúcs szükséges a porcdifferenciációhoz, mert EGTA-kezelés után a dimetil-metilénkékkel metamorfiázisan festődő porc mennyisége csökkent. A membránba beépülő mobilis Ca²⁺-iontranszporter, Ca²⁺-ionofor, a A23187 kis koncentrációban (0,1 μ g/ml) használva szignifikánsan fokozta a porcképződést, míg nagyobb (1 és 5 μ g/ml) koncentrációban gátolta azt. A porcosodó kultúrák sejtjei Ca²⁺-szint-emelkedéssel reagálnak az extracellulárisan adott 180 μ M ATP-re, a sejtválasz időfüggést mutat: ATP hatására csak a 3. tenyésztési napon mértünk Ca²⁺-szint-emelkedést. A sejtválasz jellege ionotróp purinerg receptorként viselkedő Ca²⁺-csatornák jelenlétére utal. RT-PCR reakciókkal sikerült kimutatnunk a P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 és P2X5 purinoreceptorok mRNS-ét, illetve *Western blot* és immuncitokémiai festési technikával igazoltuk a legtöbb receptor jelenlétét a sejtekben és a sejtmembránban. Az expressziós mintázat alapján valószínűsíthető, hogy az extracelluláris Ca²⁺-ionok a P2X1 és a P2X3 receptor segítségével juthatnak be a sejtekbe a differenciáció 3. napján. (DE OEC Mecénatúra program, OTKA K60620, T49151, ETT 083/2006)

P-37 Mutáns deltaretrovírus-proteázok vizsgálata

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

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A retrovirális proteázok (PR) jelentős szerepet játszanak a retrovírusok fertőzőképességének kialakulásában. A proteázok működésének jobb megismeréséhez az enzimkinetikai tulajdonságok jellemzése mellett fontos a proteázok szerkezeteinek meghatározása is. Mivel a potenciális kemoterápiai célpont szolgáló humán T-sejtes leukémia- (HTLV) és marhaleukémia- (BLV) vírusok teljes hosszúságú proteázainak szerkezetei még nem ismertek, ezért olyan módosított proteázokat terveztünk, amelyek vizsgálatával lehetővé válhat ezen deltaretrovírus-proteázok kristályosítása. A teljes hosszúságú HTLV-1 proteázt eddig még az enzim autodegradációs és aggregációs hajlama miatt nem sikerült kristályosítani, ezért olyan mutánsokat terveztünk és állítottunk elő, amelyek gátolják az autodegradációt (M37K, A43K), valamint csökkentik az enzim aggregációját (L72D, F80D). A négy mutáns proteáz közül hármat (M37K, A43D, L72D) proteolitikusan aktívnak találtunk kis kultúrában végzett expressziós kísérleteink során. Ezen enzimeket nagyobb léptékben expresszáltattuk és tisztítottuk összehasonlító autodegradációs és aggregációs kísérletek elvégzéséhez. A BLV proteáz esetében az enzim N-terminális autoprocesszási helyét módosítva, MBP-PR fúziós fehérjét expresszáltattunk, ami enzimatikusan aktívnak bizonyult. Az így módosított PR a vad típusú enzimmel való összehasonlító enzimkinetikai vizsgálatok elvégzése után felhasználható szerkezetmeghatározásra alkalmas kristályok előállítására.

P-38 Az amiloidszálak törésének szerepe a β 2-mikroglobulin polimerizációjában

Micsnai A.¹, Gráf L.¹, Závodszy P.², Y. Goto³, Kardos J.¹

¹ ELTE TTK, Biokémia Tanszék, Budapest; ² MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ³ Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan
Napiainkban egyre súlyosabb problémát okoznak a fehérjék kóros aggregációjával kapcsolatos degeneratív betegségek, mint például az Alzheimer- és Parkinson-kór. Munkánk során az MHC-I molekula egyik alegysége, a vesedialízishez kötött amiloidózis kialakulásáért felelős β 2-mikroglobulin (β 2m) *in vitro* aggregációját vizsgáltuk. A folyamat erősen nukleációfüggő, magok hozzáadására a β 2m késedelem nélkül amiloidszálakat képez, míg a tisztán monomereket tartalmazó oldat polimerizációja csak hosszú időbeli elmaradási fázis után indul el. Az irodalomban a spontán nukleáció jelenségével magyarázzák az elmaradási fázis végét jelentő felgyorsult reakciót. Egy másik lehetséges magyarázat a szálak törése és az így keletkező polimerizációra képes új szálvégek keletkezése. Ennek kimutatásához hosszú szálakat növesztettünk, alacsony magkoncentrációt és a spontán nukleációhoz szükségesnél alacsonyabb monomerkoncentrációt alkalmazva. Azonban ezen reakciók esetében is tapasztalunk elmaradási fázist és felütést, ami a szálak törésével magyarázható. Hipotézisünket a reakció kinetikájának fluoreszcenciaspektroszkópiai vizsgálatával és elektronmikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk. Kimutattuk, hogy a szálak érzékenyek a mechanikai behatásokra is. Alkottunk egy modellt és egy számítógépes szimulációt, mellyel a kísérleti eredményekhez illeszthetők a száleloszlásra és -kinetikára vonatkozó elméleti paraméterek. Eredményeink arra utalnak, hogy a szálak törése *in vivo* szerepet játszhat a betegség időbeli lefutásában, és akár egyetlen β 2m amiloidszál kialakulása is elindíthatja a betegség kifejlődését.

P-39 A többszörösen telítetlen zsírsavak és anyagcseretermékek hatása a magreceptor-specifikus célgének expressziójára

Mihály L., R. Rühl

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az olyan többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), mint a linolénsav, eikozapenténsav és arachidonsav, esszenciális tápanyagok, valamint a retinoid-X-receptor (RXR), a peroxiszóma-proliferálást aktiváló receptor (PPAR) $\alpha/\beta/\gamma$ és a retinsavreceptor (RAR) magreceptorok tápanyag jellegű aktivátorai. Ezen zsírsavak monohidroxilált anyagcseretermékei a hidroxí-eikozatetrénsav (HETE), hidroxí-eikozapenténsav (HEPE) és hidroxí-oktadiénsav a PPAR-fehérjék erősebb aktivátorai. Ezeket a zsírsavakat és anyagcseretermékeiket MM6 (humán monocita) sejtekbe inkubáltuk 10^{-6} - 10^{-9} M koncentrációban, majd RT-QPCR segítségével határoztuk meg olyan magreceptor-specifikus célgének expresszióját, mint a zsírsavkötő protein (FABP4) és az adipocitadifferenciációval kötött protein (ADRP), melyek PPAR-célgének, valamint a transzglutamináz, amely RAR/RXR célgén. Fiziológiailag, valamint táplálkozás szempontjából releváns koncentrációjú zsírsavak és metabolitok esetében a magreceptor-célgéneknek csak alacsony transzkripció aktivitását tudunk megfigyelni, hatékony szintetikus agonisták aktiválásához képest. PUFA-vegyületek RXR-agonistákkal történő együttes kezelésekor magasabb aktiválás figyelhető meg. E kísérletek alapján azt állapítottuk meg, hogy a PPAR PUFA és PUFA-anyagcseretermékek általi transzkripcióját főleg mindkét heteroreceptor dimerizációja közvetítette. Különböző endogén RXR-agonisták kombinálási kísérletei folyamatban vannak annak érdekében, hogy táplálkozás szempontjából lényeges, magreceptorok által mediált gének aktiválását határozzuk meg.

P-40 Mutáns HIV-1 proteázok transz domináns gátló hatása

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

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A retrovirális proteázok jelentős szerepet töltenek be minden replikáció-kompetens vírus életciklusában. Elsődleges szerepük a Gag és a Gag-(Pro)-Pol prekursorfehérjék funkcionális részekre való hasítása, ami a vírusokat éretté és ezáltal fertőzőképesé teszi. Az AIDS-terápiában meghatározó szerepet töltenek be a különböző proteázinhibitorok, ezek azonban az enzimen bekövetkező mutációk miatt kialakuló rezisztens törzsek esetében már nem hatásosak. Mivel a proteázalegységek dimerizációja az aktivitás előfeltétele, ezért az inaktív, de dimerizációra képes monomerek alternatív gátlási lehetőséget jelenthetnek. 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 proteázmonomereket terveztünk, amelyekben a szubsztrátkötő zsebet aminosav-oldal-

lávakkal töltöttük fel a természetes szubsztrátok kötődésének megakadályozására. Az *in vitro* gátlásvizsgálatokat a laboratóriumunkban kidolgozott mikrotiterlemezen történő fluoreszcens mérési módszer segítségével végeztük a fehérjék újratekérése után. Sejttenyésztésben a gátlás hatásfokát egy génterápiás HIV-1 vektorrendszer elemeinek felhasználásával teszteltük, melynek során 293T-sejtek transzfektáltunk a vad és a mutáns proteázokat expresszáló plazmidokkal, majd a felülúszóban lévő virionok fertőzőképességét áramlási citométerrel vizsgáltuk. (OTKA T43482)

P-41 Ac-202: egy új típusú rákellenes szer molekuláris célpontjának felderítése Avi-Link™ affinitáskromatográfiával

Molnár E.¹, Fehér L.¹, F. Ayaydin², Farkas A.³, Krizbai I.³, Puskás L.¹

¹ Avicor Kft., Szeged; ² MTA SZBK, Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium, Szeged; ³ MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

Az Avicor Kft. által kifejlesztett Avi-Link™ affinitásoszlop olyan kémiai-módosított üvegszemcséket tartalmaz, amelyek felületükön többféle funkció csoportot hordoznak, így különösen alkalmasak gyógyszerjelölt kismolekulák kikötésére, majd az ezen kismolekulákkal kölcsönható fehérjék affinitáskromatográfiával történő azonosítására. Az Ac-202 – egy új, potenciális kemoterápiás szer – molekuláris célpontjait is ezzel a módszerrel határoztuk meg. Több, általunk azonosított fehérje – irodalmi adatok alapján – a lipidcseppecskében és az endoplazmatikus retikulumban fordul elő. A fluoreszcens Ac-202 vegyületet ugyanezekben a sejtalkotókban mutattuk ki, így az affinitáskromatográfia eredményei összhangban állnak a vizsgált kismolekula sejten belüli lokalizációjával.

P-42 Amiláz enzimek szubsztrátkötő helyeinek vizsgálata molekuláris modellezéssel

Mótyán J. A.¹, Bagossi P.², Harangi J.¹

DE ¹TEK-TTK, Biokémiai Tanszék, Debrecen; ²OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az α -amilázok $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidos kötések hidrolizálnak. Vizsgálatukat széles körű ipari alkalmazásuk és a humán eredetű enzimek diagnosztikai szerepe indokolja. Az amilázok szerkezet-funkció összefüggéseinek tanulmányozására lehetőséget biztosítanak a röntgendiffrakciós mérésekkel meghatározott 3D szerkezetek és a kísérletes enzimkinetikai és termékmintázat-elemzési adatok. Munkánk során olyan számítógépes eljárás kidolgozását tűztük ki célul, amelynek segítségével vad típusú és mutáns α -amiláz enzimek működését tudjuk magyarázni, illetve a későbbiekben jóslni a 3D szerkezeti modellek segítségével. Munkánk alapját a tanszéken korábban vizsgált olyan α -amiláz enzimek képezték, melyek termékmintázat-elemzését és elhelytérképezését elvégezték. A modell felállításához humán nyál- α -amiláz (vad típus, W58L, Y151M mutáns) és árpa- α -amiláz (vad típus, Y105A/F/W, Y105A/T212Y, T212Y mutáns) enzimeket használtunk. A bontási kép meghatározása kromofór csoportot tartalmazó malto-oligoszacharid-szubsztrátsorozatok segítségével történt, amelyből az helyek kötési energiáit a tanszéken kifejlesztett SUMA (SUbsite Mapping of α -Amylases) számítógépes programmal határoztuk meg. Eljárásunkban az alhelyek kötési energiáit a röntgenkristallográfiai vagy a homológ modellezéssel felépített 3D szerkezetek molekuláris mechanikai számításokból kapott enzim-szubsztrát kölcsönhatási energiaértékekből számoltuk ki. Módszerünk kalibrálásához a SUMA programmal korábban kiszámolt energiaértékeket használtuk, a korrelációs együttható értéke 0,7–0,9 volt. Tesztelésre új mutánsok bontási képét határoztuk meg, amelyet összehasonlítottunk a modellünk által jóslottal. Az eljárás felhasználható lehet különböző α -amilázok működésének gyors jóslására anélkül, hogy költséges és hosszadalmas kísérletes folyamatban határoznánk meg a hasítási képet és az helyek kötési energiáit.

P-43 A switch-2 aktívhelyhurok szerepe a miozin 5 processzív működési mechanizmusában

Nagy N., Kovács M.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A vezikuláris transzportot végző miozin 5 processzív motorfehérje, amely kétféle egyedi molekulaként számos enzimműködés és mechanikai lépés elvégzésére képes az aktinról való leválás nélkül. Ezt az teszi lehetővé, hogy a miozin-5-fej az ATP-áz ciklusidő nagy részét aktinhoz kötve tölti. Mechanizmusa ezért drasztikusan eltér az izommiozin-2-étől, mely ciklusidejének túlnyomó részét az aktinfilamentumról leválva tölti, hogy ne akadályozza a többi fej által hajtott elmozdulást. A switch-2 hurok valamennyi miozin nukleotidkötő helyének konzervatív szerkezeti eleme (aminosav-szekvenciája LDIXGFE). Az X pozíciót miozinozostályonként különböző aminosav foglalja el (miozin 2 fehérjében A vagy S, miozin 5

fehérjében Y). Az ATP kötését követően a *switch-2* konformációváltozása (nyitott-zárt átmenet) során a *switch-2* peptidgerince az ATP-molekulával a hidrolízishez kulcsfontosságú hidrogénkötést létesít. A *switch-2* peptidben lévő X pozíciónak a miozin 5 mechanizmusában betöltött szerepét pontmutáns miozin-5-konstrukciókkal (Y439A, Y439S, Y439E) vizsgáltuk. A mutánsokat egyensúlyi és tranzienzi kinetikai, valamint fluoreszcencia-spektroszkópiai vizsgálatokban hasonlíttottuk össze a vad típusú kontrollal. Az ATP-kötés hatására bekövetkező triptofánfluoreszcencia-változás mértéke (amely a *switch-2* konformációváltozását is jelzi) összhangban állt a konstrukciók ATPáz-aktivitásával: a *switch-2* kinyílását előidéző mutációk a foszfátfelszabadulás gyorsításán keresztül az ATPáz-aktivitás növekedését okozták. Eredményeink arra utalnak, hogy a *switch-2*-hurok az ATP-hidrolízisben játszott szerepén kívül a termékfelszabadulás modulálásával teszi lehetővé a miozin 5 processzív működését.

P-44 IL2-indukált Stat5-kötőhelyek genomiszintű azonosítása leukémiás T-sejtvonalban

Nagy Zs. S.¹, Bálint B. L.², Nagy L.², R. A. Kirken¹

¹Dept. of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, USA; ²DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az IL2 az aktivált T-sejtek fő növekedési faktora, amely számos jelátviteli úton (Ras/Raf/Erk/Mapk, PI3K és Jak1-3/Stat5) fejti ki hatását. A Stat5 jelátvivő és transzkripció faktorok két izoformája ismeretes, a Stat5a és a Stat5b. Géntechnológiai úton módosított egerekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy e két izoforma egyedi és egymással átfedő feladatokat is ellát: míg a Stat5a főként az emlőmirigyek kifejlődésében működik közre, a Stat5b a növekedés szabályozásában vesz részt a növekedési hormonokon keresztül. A T-sejtekben azonban kritikus túlélési faktorként a két fehérje redundáns szerepet tölt be. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy egyike között a limfoid és leukémiás rákos sejtekben konstitutíve aktív (például tirozinon foszforilált) Stat5 van jelen. Emellett humán perifériás mononukleáris vérsejtekben és limfoid vagy leukémiás rákos sejtekben a Stat5 expresszójának gátlása apoptotikus sejthalált indukálva súlyosan ronthatja a sejt életképességét. Ezen eredmények alapján a Stat5-inhibitorok a rákos sejtek túlélését gátló, új gyógyászati hatóanyagok lehetnek. Emiatt immunológiai jelentős Stat5 célgenek azonosítása fontos célpont lett az új rákellenes gyógyászati módok fejlesztésében. Napjainkig csupán néhány specifikus Stat5 célgen ismeretes. Vizsgálatainkban IL2-indukált Stat5 célgenek azonosítására törekedtünk *ChIP on chip* módszerrel. Kit225 humán IL2-függő leukémiás T-sejteket IL2 faktorról 30 percig stimuláltunk, formaldehidben fixáltunk, majd a Stat5a és Stat5b faktorokat kromatin-immunprecipitációval kicsaptuk. A módszer ellenőrzésére a humán IL2R α gén *enhancer* régióban a Stat5-kötőhely IL2-mediált felhalmozódását mértük kvantitatív PCR módszerrel. A következő lépésben a DNS-hez kötődött Stat5 faktort amplifikáltuk, jelöltük, majd *Affymetrix Human Promoter 1.0R array* rendszerben hibridizáltattuk. A bevitt DNS és a normál nyúlászernum mind a stimulálatlan, mind az IL2-stimulált, kontrollként alkalmazott sejtekből megkötötte a „háttér”-DNS-t. A statisztikai analízis hatékonyságának növelése érdekében biológiai ismétléseként a kísérleteket három, egymástól független ismétlésben végeztük. A vizsgálat eredményeképpen várhatóan a humán promoterekben az IL2-indukált Stat5-kötőhelyek genomiszintű térképét kapjuk meg. Ezt követően a legérdekesebb gének Stat5-mediált szerepét *ChIP*, elektroforitikus mobilitáseltolódási teszt (EMSA) és siRNA-mediált depléción, majd kvantitatív PCR módszer segítségével validáljuk.

P-45 A falloidin nem kooperatív módon kötődik az ADP.BeF_x- és ADP.AIF₄- aktinfilamentumokhoz

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

Az aktin meghatározó szerepet játszik az eukarióta sejtek citoskeletonjának felépítésében, a sejtek alakváltozásában és motilitásában. Az aktin előfordulhat monomer vagy filamentum formában. Minden aktinmonomerhez kötődik egy nukleotid és egy kation. A polimerizáció során a monomerekhez kötött ATP-molekulát az aktin hidrolizálja, ezért a filamentumokat a foszfát disszociációját követően ADP-aktin-protomerek építik fel. Jelen vizsgálatainkban a tranzienzi ADP.P_i állapotot kívántuk tanulmányozni. Ennek az állapotnak az élettartama viszonylag rövid, ezért a vizsgálatainkban ADP.BeF_x és ADP.AIF₄ foszfátanalógokat alkalmaztunk. Munkánk során a pártázó differenciálkalorimetria (DSC) módszert használtuk arra, hogy az ADP.BeF_x- és ADP.AIF₄-aktin-filamentumokban a falloidin kötődése által kiváltott változásokat leírjuk. Nukleotidanalógok és falloidin nélkül az aktinfilamentumokra jellemző átmeneti hőmérséklet (T_m) 64,1 °C volt. A nukleotidanalógok (ADP.BeF_x: 84,8 °C; ADP.AIF₄: 84,7 °C) vagy a falloidin (82,3 °C) kötődésének hatására a T_m

értéke megnőtt, ami azt mutatta, hogy megnőtt a filamentumok termikus stabilitása. Amikor mind a falloidint, mind a nukleotidanalógokat az adatokhoz adtuk, a filamentumok termikus stabilitása tovább nőtt (95,5 °C ADP.BeF_x, és 95,9 °C ADP.AIF₄ esetében). Az, hogy a nukleotidanalógok által stabilizált filamentumok termikus stabilitását a falloidin tovább tudta növelni, azt mutatta, hogy a falloidin és a nukleotidanalógok más-más molekuláris mechanizmusokon keresztül fejti ki hatását az aktinfilamentumokra. Egy korábbi munkánkban ismertetett stratégia szerint megvizsgáltuk azt is, hogy a falloidin kooperatív módon kötődik-e az ADP.BeF_x- vagy ADP.AIF₄-aktin-filamentumokhoz. Azt tapasztaltuk, hogy ellentétben a nukleotidanalógok nélkül polimerizált filamentumokon mértekkel, az ADP.BeF_x- és ADP.AIF₄-aktin-filamentumok nem kooperatív módon kötik a falloidint. Megállapítottuk, hogy a falloidin által kiváltott konformációs módosulásoknak a filamentum hossza mentén való terjedése nem lehetséges a nukleotidanalógok által stabilizált aktinfilamentumok esetében.

P-46 A lizofoszfátidsav szerepe a β 2-mikroglobulin amiloidképződésében

Pál-Gábor H.^{1,2}, Gombos L.¹, Micsonai A.¹, Kovács E.², Kovács J.¹, Gráf L.^{1,2}, Y. Goto³, Liliom K.², Kardos J.¹

¹ELTE TTK, Biológiai Intézet, Budapest; ²MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ³Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

A β 2-mikroglobulin (β 2m) minden sejt felszínén megtalálható immunfehérje, a fő hisztokompatibilitási komplex-I (MHC-I) egyik alegysége. Vesedialízisben részesülő betegeknel többéves kezelés során a β 2m amiloid formában lerakódhat az ízületekben és izmokban, súlyos mozgásszervi problémákat okozva. A β 2m amiloidszálak *in vitro* is növeszthetők alacsony pH-értéken, illetve nátrium-dodecilszulfát (SDS) és a már felnevelt szálak szonikálásával kapott magok jelenlétében semleges pH-értéken. Azonban mindmáig nem tisztázott, mely tényezőktől játszanak szerepet az amiloidképződésben fiziológias körülmények között. Munkánk során megvizsgáltuk az SDS-hez hasonló felépítésű, fiziológiasan előforduló lizofosfolipidek esetleges szerepét a β 2m polimerizációjában. A monomerek szerkezetére és stabilitására gyakorolt hatást CD-spektroszkópiás és kalorimetriás úton vizsgáltuk, a képződött amiloidszálakat fluorimetriás mérésekkel, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatokkal detektáltuk. Megmutattuk, hogy a lizofoszfátidsav (LPA, a vérben jelen lévő lizofosfolipid) képes speciális kölcsönhatásba lépni a β 2-mikroglobulinnal. Ennek során az LPA a natív, monomer β 2m szerkezetét destabilizálja, illetve magok jelenlétében elősegíti az amiloidszálak képződését. Ez felveti az LPA és a hozzá hasonló szerkezetű lipidek szerepét a vesedialízishez kötött amiloidózis kialakulásában.

P-47 A dUTPáz enzim mechanizmusának és funkciójának vizsgálata a *C. elegans* modellen

Pécsi I., Tóth J., Vértessy G. B.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz az egyedüli olyan enzim, amely specifikus módon a dUTP nukleotid-trifoszfát hidrolízisét katalizálja. A dUTPáz hiányában kialakuló uraciltartalmú DNS kaskádszerű káros mechanizmust indít el a sejtben, ami a DNS fragmentálódáshoz vezet. Az eddig vizsgált legtöbb fajban (például baktériumok, vírusok, humán, ecetmüsze) előforduló dUTPáz szimmetrikus homotrimer molekula. A *Caenorhabditis elegans* dUTPáz enzime (továbbiakban cDUT) azonban az eddig ismert egyetlen olyan forma, amelyben a monomer szekvenciák egyetlen polipeptidláncban találhatók 20–25 aminosavnyi összekötő régiókkal elválasztva egymástól. Ez a szerkezet új lehetőséget nyújt a monomerek közötti kommunikáció tanulmányozására. Célkitűzéseink a következők voltak: *i.* a funkció szempontjából fontos aminosavak azonosítása homológiaszerkezeti modellben, mutagenézis; *ii.* a vad típusú és mutáns fehérjék termelése és összehasonlító szerkezeti és funkcionális karakterizálása; *iii.* cDUT-expresszió-vizsgálata *C. elegans* tesztállatban. A *C. elegans* dUTPáz enzimét pET45b bakteriális expressziós rendszerben termeltettük, és affinitáskromatográfiás úton tisztítottuk. A rekombináns fehérje mért kinetikai állandói: $K_{\text{kat}} = 1,5 \text{ sec}^{-1}$, $K_M = 3 \mu\text{M}$. Az első monomer szekvenciát követő összekötőbe egy stopmutációt vittünk be, ezzel imitálva a humán dUTPáz homotrimer szerkezetét. A monomer azonban nem oligomerizálódott, és mivel a dUTPázban mindhárom aktív hely felépítésében mindhárom monomer részt vesz, a mutáns monomer fehérje nem mutatott enzimaktivitást sem. Az alapkonstrukcióból kiindulva két ciszteinmutánst is kényszerítettünk annak felderítésére, hogy a szerkezeti modell alapján valószínűsíthető diszulfidhidaknak van-e szerepük a fehérje feltekeredésében és aktiválásában. Az erre irányuló méréseink folyamatban vannak. (HHMI, GVOP, EUFP6)

P-48 Komplex gyulladásos betegség genetikai analízise

Póliska Sz.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) egyre növekvő jelentőségű kór a világon, azonban hatásos gyógyszeres kezelése jelenleg nem ismert. A kórkép jellemzője a légzőfelület csökkenése, amely lassú, többnyire visszafordíthatatlan folyamat. A légzőfelület csökkenésével együtt emphysema és krónikus bronhitisz, valamint tüdőgyulladás jelenik meg. Az emphysema során az alveoláris fal sérül, a gázcserefelület csökken, az alveoláris rendszer sérülése miatt a kisebb légutak elzáródnak, és az alveoláris parenchyma roncsolódása a tüdő rugalmasságának elvesztéséhez vezet. A beteg tüdejében fellépő krónikus hörgő- és parenchymagyulladás kialakulásában neutrofil granulociták, alveoláris makrofágok és citotoxikus (CD8+) T-limfociták vesznek részt. Az alveoláris makrofágok központi szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok koordinálásában, különböző citokinek és kemokinek termelése révén. Célunk génextpressziós mintázat felvétele, és annak meghatározása volt, hogy milyen különbségek láthatók a beteg- és kontrollminták között, valamint nagy áteresztőképességű DNS-genotipizálás beállítása, s így a betegség genetikai hátterének megismerése. Munkánk során COPD-pozitív és -negatív páciensekből bronchoalveoláris mosófoliadékok (BALF) és perifériás vérmintát vettünk. BALF-ből alveoláris makrofágokat izoláltunk, majd RNS-t preparáltunk, a vérmintákból genom DNS-t tisztítottunk. Az RNS-mintákat Affymetrix HG U133A *chipse* jelöltük és hibridizáltattuk. A *microarray* adatokat a GeneSpring programban elemeztük, amelynek segítségével megkaptuk az egyes minták génextpressziós mintázatát. Az elemzés során olyan géneket azonosítottunk, amelyeknek expressziós profilja szignifikáns különbséget mutat a COPD-pozitív és -negatív minták között. Az Affymetrix adatokat QPCR segítségével TaqMan *low density array* rendszerek futtatásával igazoltuk. A genotipizálásra TaqMan *assay* módszert használtunk. A reakciókat 384 lyukú mikrotálcan TECAN pipettázó robottal raktuk össze, és ABI 7900-as RT-QPCR készüléken futtattuk. A vizsgálatba 580 páciénst vontunk be.

P-49 Közös cisz reguláló elemek levélrozsda-fertőzéssel asszociált búza-apoplasztfehérjék génextpressziójában

Pós V.¹, Cserháti M.², Hunyadi-Gulyás É.³, Manninger S.-né,⁴

Györgyey J.³, Medzihradzsky F. K.³, Lukács N.¹

¹BCE, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék, Budapest; ²MTA SZBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged; ³MTA SZBK, Proteomikai Kutatócsoport, Szeged; ⁴MTA NKI, Budapest

2D-PAGE szeparálást követő MS (MALDI-TOF) analízissel egy glukánendo-1,3-β-D-glükózidáz, egy kitináz 1 enzimet és egy PR 1.1 fehérjét azonosítottunk búza (*Triticum aestivum* L.) csiranövény apoplasztjában, melyek levélrozsda-fertőzést (*Puccinia recondita* fsp. *tritici*) követően a fogékony Thatcher vonalhoz képest korábban indukálódnak és nagyobb intenzitással expresszálódnak az Lr1 rezisztenciagént hordozó közel izogén genotípus intercellularisaiban. Mivel az irodalomból ismert, hogy az azonosított enzimek rezisztens és fogékony vonalak stresszválaszában is közreműködhetnek, feltételezzük, hogy egyes esetekben éppen eltérő expressziójuk révén válhatnak mégis a sikeres védekezés érdemi közreműködőivé. Az eltérő expresszió feltételezett okait kutatva a talált búzaszekvenciákkal erős homológiát (Gramene blast, e-score: <10⁻⁶⁰) mutató rizsgéneken (14 glukánáz, 9 kitináz és 6 PR 1.1 szekvencia) promotervizsgálatot végeztünk, melyből az alábbi eredmények adódtak: *PlantCare* analízissel 2, 1, illetve 5 olyan promotermotívumot találtunk, amelyek kizárólag a leginkább homológ (a mi búzagénjeinkkel ortológnak tekinthető) két glukánáz, két kitináz, illetve egy PR1.1 rizsgén promóterében szerepelnek. Az 5 PR1.1-homológ promotermotívum közül három bizonyítottan stresszindukált folyamat részese. Előbbiekén túl, a vizsgálatba vont 29 rizsgén promoterszekvenciáin tetrameriáid-analízáló programot alkalmazva 164 olyan tetranukleotid-párost sikerült azonosítanunk, melyek mindhárom ortológ csoport legalább egy-egy tagjának promóterében meghatározott távolságban elrendeződő, közös motívumként definiálhatóak. Ezekből 41 annotált, 10 konstrukciót pedig ismeretlen különféle stresszválaszokban tartanak számon.

P-50 Uracil-DNS-degradáló faktor doménanalízise

Pukáncsik M.¹, Békési A.¹, Zagyva I.¹, Leveles I.¹, Hunyadi-Gulyás É.²,

Klement É.², Medzihradzsky F. K.², J. Bujnicki³, Vértessy G. B.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²MTA SZBK, Proteomikai Laboratórium, Szeged; ³Lab. of Bioinformatics and Protein Engineering, International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland
Uracil a DNS-ben citozin dezaminációjával vagy timin helyettesítésével

keletkezhet. A DNS-beli uracilt a szervezet általában hibaként érzékeli, és a báziskivágási javító rendszer révén eltávolítja. Ezen javító rendszer első eleme, az uracil-DNS glikozidáz (UDG) enzim génje hiányzik a *Drosophila melanogaster* genomjából, így itt létrejöhöz uraciltartalmú DNS. *Drosophila* lárváknál hiányzik a dUTPáz enzim is, ezért a DNS uraciltartalma szignifikánsan megnövekedhet. Uracil-DNS-affinitáskromatográfia segítségével azonosítottunk egy uracil-DNS-re specifikus degradáló faktort (UDE). A fehérje nukleázaktivitását EDTA jelenlétében is megőrzi, azaz aktivitásához nem igényel exogén Mg²⁺-ionokat. A homológ szekvenciák összerendezésével öt szigorúan konzervált motívumot azonosítottunk. A fehérje másodlagos szerkezetére vonatkozó szerkezeti predikció szerint az első két konzervált motívum α-helikális szerkezetű. Ezen analízis eredményei azt sugallják, hogy a kötő, illetve katalitikus helyek kialakításában mindkét egységből a megfelelő konzervált régiók vesznek részt. A fehérje részletes szerkezeti analízisét tűztük ki célul, így megkezdtük az UDE kristályosítását 15 bázispár hosszú oligonukleotidok jelenlétében. Limitált proteolízissel végzett kísérletek azt mutatják, hogy a DNS-kötés a konzervált motívumok mentén történik és a fehérje konformációs változását indukálja, mely szignifikáns védelmet nyújt többféle proteáz hasításával szemben. Szokatlan szekvenciájának és kivételes specificitásának köszönhetően az UDE a fehérjék egy új családját képviseli, amely felismeri és degradálja az uracilt tartalmazó DNS-t. (HHMI, GVOP, EUPF6)

P-51 Új *Escherichia coli* expressziós vektorok tervezése és tesztelése

Radnai L.¹, Süveges D.¹, Pohl G.², Stráner P.², Hódi Zs.¹, Molnár T.¹, Nyitrai L.¹
ELTE TTK, ¹Biokémiai Tanszék, Budapest; ²Szerves Kémiai Tanszék, Budapest

A bakteriális fehérjeexpressziós rendszerek használatát korlátozhatja a hibás feltekeredés vagy a proteolitikus degradáció. Ezeket a problémákat az expresszió sebességének szabályozásával, jól oldódó fúziós partnerek használatával, továbbá affinitáscímkek alkalmazásával orvosolhatjuk. Célunk volt olyan *E. coli* expressziós vektorok tervezése és tesztelése, melyek a fenti hátrányok közül minél több kivédésére képesek, valamint további előnyös tulajdonságokkal is rendelkeznek. A pEGT vektort a pET15b módosításával, míg a pCM1 vektort a pET21c módosításával állítottuk elő. Előbbi használatával a rekombináns fehérje N-terminálisára zöld fluoreszcens fehérje (GFP) és His-tag, míg C-terminálisára T7-tag fuzionáltható. A GFP stabil, jól oldódó, intenzív zöld színű, fluoreszcens fehérje, mely lehetővé teszi az expresszió egyszerű optimalizálását, a specifikus detektálást a tisztítási lépések során, továbbá a pontos, gyors és érzékeny koncentrációmérést. A pEGT rendszer alkalmas kis, izotópjelölt peptidok termelésére is, mégpedig extra aminosavak nélkül a C- és N-terminálison. Ez a módszer sokkal olcsóbb, mint a kémiai szintézis, ezért nagy jelentőségű az NMR spektroszkópiai kutatásokban. A pCM1 vektort röntgenkristallográfiai célokra terveztük. Használatával nagy mennyiségű és tisztaságú, degradációmentes mintához juthatunk. A célfehérje N-terminálisára kalmódulint, míg C-terminálisára His-tag-szakaszt fuzionálunk. A kalmódulin kicsi és rendkívül jól oldódó fehérje, mely kalcium jelenlétében specifikusan kötődik fenil-Sepharose mátrixhoz, így affinitáskromatográfiát tesz lehetővé. A degradációmentességet és tisztaságot az affinitáscímkek fenti elrendezése biztosítja. A kromatográfiai lépések, továbbá a fúziós partnerek proteolitikus eltávolítása közben puffercserélő eljárásokra nincs szükség, ezért a módszer gyors és egyszerű, a veszteségek minimálisak. (OTKA K61784, TS49812)

P-52 A szöveti transzglutamináz emeli a foszfatidil-szerin-kifordulás sebességét és a kalpain aktivitását kalciumionofór-indukált vörösvértest elhalásában

Sarang Zs., Mádi A., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az érett vörösvértestek (vvt) a sejttaggal rendelkező sejtek apoptózisához hasonló mechanizmussal halnak el, melynek során a sejtek zsugorodnak és felszínükön foszfatidil-szerin (PS) jelenik meg, amelyet felismerve a makrofágok bekebelezik őket. Az elhalás során a sejtben belüli Ca²⁺-koncentráció megemelkedik, melynek következtében a Ca²⁺-szabályozott cisztein proteáz μ-kalpain és szöveti transzglutamináz (TG2) aktiválódik. A TG2 számos membrán alatti vázfehérjét keresztköve felelőssé tehető az elhaló vvt-k Ca²⁺-indukált tartós alakváltozásáért és a membrán deformálhatóságának elvesztéséért. Kalciumionofórral kezelt vvt-eket használva kimutattuk, hogy a TG2-hiányos sejteknek – a vad típusú sejtekhez hasonlítva – csökken a makrofágok általi felvétele. További kísérleteink szerint a kalciumionofórral kezelt, illetve oxidatív vagy hiperoszmotikus stressznek kitett TG2^{-/-} vvt-k felszínén lassabban jelenik a PS, mint a ^{+/+} sejteken, és feltételezhetően ez felelős a csökkent makrofágok általi felvételükért. Ugyanakkor a sejt felszíni PS eloszlásában nem tapasztaltunk eltérést a két sejt között.

Próbálkozásunk során, hogy a lassult PS2-kifordulásért felelős fehérjéket megtaláljuk, kimutattuk, hogy az aktivált TG2 képes keresztköttni a sejten belül nem kovalensen asszociált kis és nagy kalpainalegységet. Hogy meghatározzuk a TG2-függő kalpain-kereszt-kötés hatását, megmértük *in vitro* az enzim aktivitását TG2^{-/-} és ^{+/+} vvt-kben ionofórkezelés előtt és után, valamint időben követtük a vvt-kben a kalpainszubsztrát membránvázfőhéjre, a spektrín lebomlását. Azt találtuk, hogy a kalpainaktivitás a kalciumionofór-kezelt TG2^{+/+}-sejtekben volt a legnagyobb. A kalpainnak a vvt-k elhalásában játszott szerepének tisztázására kalpain ^{+/+} és ^{-/-} sejtek között is összehasonlítottuk a kalciumindukált PS-kifordulás sebességét, de nem találtunk különbséget a két sejttípus között. A következőkben vizsgáltuk a TG2 hiányának a vvt-k *in vivo* élettartamára kifejtett hatását, és azt találtuk, hogy a nincs különbség a ^{+/+} és ^{-/-} sejtek élethosszában. Adataink arra engednek következtetni, hogy a TG2 a kalpainaktivitás szabályozásán keresztül elősegíti a kalpainszubsztrátok lebontását és – bár a sejthalál inicializálásában nem vesz részt – kalpaintól függetlenül gyorsítja a PS megjelenését az elhaló sejteken. (OTKA T049445 és ETT 100/2003)

P-53 Androgén szteroidok bioszintézisének gátlása új 17β-exo-heterociklusos androszteronszármazékokkal

Szécsi M.¹, Tóth I.¹, Wölfling J.², Schneider Gy.², Julesz J.¹
¹SZTE ¹Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratórium, Szeged;
²Szerves Kémiai Tanszék, Szeged

Szteroidoknak a 17α-hidroxiláz/C_{17,20}-liáz, valamint az 5α-reduktáz 1-es és 2-es típusú izozim (5αR1 és 5αR2) által katalizált átalakulásai az androgén szteroidhormonok bioszintézisének kulcslépései. A 17α-hidroxiláz/C_{17,20}-liáz elsősorban a here tesztoszterontermelésében játszik szerepet. Az 5αR1 és 5αR2 a tesztoszteron→5α-dihidro-tesztoszteron konverziót magukban az androgén célszervekben (például a bőrben vagy a prosztatában) viszik végbe. Vizsgálataink során újonnan szintetizált 17β-exo-heterociklusos androszteronszármazékok szteroidkonvertáló enzimekre gyakorolt inhibitor hatását kutattuk. A C_{17,20}-liáz, az 5αR1 és az 5αR2 aktivitás mérését *in vitro* radioszubsztrát-inkubációs módszerekkel végeztük. Specifikus C_{17,20}-liázgátló hatást találtunk az androszteronváz 17-es szénatomjához nem a karbamátgyűrű nitrogénjén, hanem annak 4-es szénatomján kapcsolódó tetrahydro-oxazinon-szubsztituens esetén. Az N-(p-metil-fenil)- és a dimetil-tetrahydro-oxazinon-származék specifikus 5αR1-, illetve specifikus 5αR2-inhibitornak bizonyult. Az androszteronvázhoz nitrogénjén keresztül kapcsolódó tetrahydro-oxazinon, valamint az ötgtagú gyűrűs analóg tetrahydro-oxazon-származék C_{17,20}-liáz és 5αR2 kettős gátló hatást mutatott. Az N-(p-etil-fenil)-, illetve az N-(p-etoxi-fenil)-tetrahydro-oxazinon hatékony 5αR1- és 5αR2-inhibitornak bizonyult. Az új 17β-exo-heterociklusos androszteronszármazékoknál megfigyelt molekulaszerkezet-inhibitorhatás összefüggések értékes adatként szolgálhatnak a célzott antiandrogén hatást enzim szinten kifejtő, új gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésében, és hozzájárulhatnak a prosztata androgénfüggő daganatos elváltozásainak (benignus hiperplázia, karcinóma) kezelésében alkalmazott terápiás lehetőségek bővüléséhez.

P-54 Az LC8 dinein könnyű láncok szerkezet nélküli fehérjékhez vagy doménekhez kötődnek

Szenes Á.¹, Hódi Zs.¹, Tompa P.², Nyitrai L.¹
¹ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; ²MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az eukarióták legkonzervatívabb fehérjéi közé tartoznak a 10 kD molekulasúlyú dinein könnyű láncok (DLC; két humán paralóg génjük a DYNLL1 és a DYNLL2). Eredetileg a dinein motorfehérje alegységeként és az nNOS enzim inhibitoraként írták le őket, de később kiderült, hogy a miozin Va motorfehérjéhez, s további több mint 60 fehérjéhez kötődnek (a csak élesztő-kettőshibrid módszerrel, illetve fehérjekomplexek MS-analízisével kimutató potenciális kötőpartnereik száma 200 fölött van), azaz a proteom „gócféhrjéinek” tekinthetők. A sejtekben betöltött szerepük csak részben tisztázott, de mindenképpen széles körű – a motorfehérjéken kargó adapterek, egyes fehérjéket szekvesztrálnak, részt vesznek az apoptózis, a sejtproliferáció, a génexpresszió szabályozásában. A DLC kötőpartnereket az IUPred szerkezetjelző programmal vizsgálva azt találtuk, hogy szinte kivétel nélkül vagy szerkezet nélküli fehérjék, vagy a DLC-felismerő motívumok szerkezet nélküli doménben található. A bennük található rövid lineáris felismerő motívum (SLM) gyenge konszenzusszekvencia, amely β-láncként kötődhet a homodimer DLC két kötőárába. A kötőpartnerek szerkezetnélkülisége magyarázatot adhat – legalábbis részben – a DLC promisszkuitására. A DLC-hez kötődés valószínűleg nem jár együtt a kötődő domén nagymértékű rendezetlen→rendezett szerkezeti átmenetével, de befolyásolhatja szomszédos domének szerkezetét, interakcióit. Ezt támasztja alá, hogy sok kötőpartner-

ben találtunk a DLC kötőmotívum közelében olyan szekvenciákat, amelyek csavart csavar típusú szerkezetet vehetnek fel. A DLC molekuláris „ragasztóként” a csavart csavar kialakulását, ezáltal dimerek és nagyobb fehérjekomplexek kialakulását segítheti elő. Korábbi kísérleteinkben azt találtuk, hogy a DLC kötődése a miozin Va-hoz a csavart csavar farokdomének stabilitását jelentősen fokozta. (OTKA K61784, T549812)

P-55 A protein kináz Cδ a porcdifferenciáció egyik szabályozó eleme

Szűgyártó Zs.^{1,2}, Juhász T.³, Matta Cs.³, Zákány R.³
¹DE OEC, ²Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; ³MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen; ³Anatómia, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, Debrecen
 A PKCδ a protein kináz C család új típusú, kalciummal nem aktiválható izoformái közé tartozik, porcdifferenciációban betöltött szerepéről nincsenek adatok. A kondrogenezist csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer „nagy sűrűségű” mezenchimális sejt-kultúrákban vizsgáljuk, ahol 6 nap alatt spontán porcképződés történik, a kondrociták differenciálódása dominánsan a tenyésztés 2-3. napján zajlik. A különböző életkorú tenyésztetkekből készített mintákban RT-PCR módszerrel a 2. és 3. tenyésztési napokon kissé megemelkedett PKCδ-mRNS-szintet találtunk, míg *immunoblot* vizsgálatban a PKCδ erőteljesen emelkedett szintjét láttuk. A PKCδ farmakológiai inhibitorát, a rottlerint (Ro) 2,5 μmol koncentrációban a tenyésztés 2. és 3. napján a kultúrák tápfolyadékához adva a metakromáziasan festhető porc mennyiségének csökkenését tapasztaltuk. Meglepő módon a Ro-kezelések hatására a PKCδ mRNS- és fehérjeszintje expressziója is visszaszorult, ami esetleges autoreguláció lehetőségét is felveti. A sejtek életképességének Ro-kezelések hatására bekövetkező fokozódását 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium bromid (MTT) teszttel detektáltuk, míg a sejtek osztódó képességét jelző triciáltimidin-beépülés mértéke erőteljesen csökkent. Ez arra utal, hogy a Ro nem citotoxicus, és a sejtproliferáció gátlása miatt csökkentheti a porcképződést, mivel a porcdifferenciációt serkentő transzkripció faktorok, a Sox9 és a CREB expressziója inkább fokozódik a porcosodó sejtekben. További kísérleteinkben a PKCδ konstitutív aktív katalitikus doménjének transziens túlexpressziójával szeretnénk pontosabb képet nyerni a PKCδ porcdifferenciációra és porcképződésre gyakorolt hatásairól. (DE OEC Mecenatúra grant, OTKA K60620, ETT 083/2006)

P-56 Egy új inhibitor, a blebbistatin hatása a miozin 2 működése közbeni szerkezetváltozásokra

Takács B., Gyimesi M., Kintses B., Málnási-Csizmadia A., Kovács M.
 ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest
 A blebbistatin nemrég felfedezett inhibitor, amely vázizom és nem izom miozin 2 izoformákra specifikus. Korábban kimutattuk, hogy a blebbistatin alloszterikus gátló: az aktinkötő árok mélyére kötve stabilizálja az ATP-hidrolízist követő, termékkötött miozinintermediert, és így lassítja a foszfátfelszabadulást. Jelen munkánkban azt vizsgáltuk, hogy a blebbistatin hogyan befolyásolja a miozin 2 motordoménnek az ATPáz-ciklus során végbemenő konformációváltozásait. Vizsgálatainkhoz egytriptofános *Dictyostelium* motordomén-mutánsokat használtunk, amelyek a hely-specifikus fluoreszcens szenzorként alkalmazott triptofánokat a motordomén különböző kulcspozícióiban hordozzák (*switch-1* és *switch-2* nukleotidkötő hurkok, illetve az erőkar bázisa). A blebbistatin a vad típusú miozin 2 fehérjéhez hasonlóan gátolta a mutánsok ATP-áz-aktivitását. A mutánsok fluoreszcenciaspektroszkópiái és transziens kinetikai vizsgálatából arra következtettünk, hogy az inhibitor az eddig ismert hatásain túl megváltoztatja a nukleotidzseb tartalma és az aktinkötőhely állapota közötti kapcsoltságot, mégpedig oly módon, hogy ADP jelenlétében egy aktint erősen kötő, „felhúzott” erőkarú intermediert stabilizál. Ez a közti állapot – jöllehet a miozin mechanizmusában kiemelkedő fontosságú (véltetőleg az erőfejlesztő lépés kezdőállapota) – eddig azért nem volt hozzáférhető, mert inhibitor távollétében igen rövid az életideje. Adataink arra utalnak, hogy a blebbistatin a már eddig is jól kihasznált, széles körű sejtbiológiai és fiziológiai alkalmazási lehetőségek mellett a miozinmechanizmus szerkezeti alapjainak felderítésében is további haszonnal kecsegtet.

P-57 A humán bőr mindig „elszáll”? – a cannabinoidrendszer szerepe a humán bőr és függelékei növekedésének szabályozásában

Tóth I. B.¹, Telek A.¹, Dobrosi N.¹, Géczy T.¹, Borbíró I.¹, C. C. Zouboulis², G. Kunos³, R. Paus⁴, Bíró T.¹
¹DE OEC, Élettani Intézet, Debrecen; ²Dept. of Dermatology, Dessau Medical Center, Dessau, Germany; ³National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; ⁴Dept. of Dermatology, University of Lübeck, Germany

A legfrissebb tudományos eredmények szerint a cannabinoidrendszer, melyet korábban a neuronális és immunfolyamatok központi molekulacsaládjaként jellemeztek, szerepet játszhat a sejtproliferáció szabályozásában. Jelen kísérletsorozatban a humán bőr sejtei és függelékei növekedésében vizsgáltuk a rendszer elemeit. Kombinált celluláris és molekuláris élettani technikákat alkalmazva kimutattuk, hogy a tenyésztett humán epidermális keratinociták, a faggyúmirigy eredetű sebociták, valamint az izolált szőrtüsző (meglepő módon) egyrészt célpontjai, másrészt forrásai az endocannabinoidoknak. Megállapítottuk ugyanis, hogy az endocannabinoid anandamid (AEA) az összes sejttípusban dóziszfüggő módon gátolta a proliferációt (emellett csökkentette a szőrszál elongációját) és apoptózist indukált. Számos agonista és antagonisták alkalmazásával bebizonyosodott továbbá, hogy ezen hatások a különböző sejteken különböző cannabinoidreceptorok (CB) közvetítésével valósultak meg; azaz, szőrtüsző→CB1, sebocita→CB2, keratinocita→CB1 és TRPV1 (mely utóbbi receptor aktiválódása szintén gátolja a sejtek növekedését). Kimutattuk azt is, hogy sebocitákon a CB2-mediált szignalizáció *i.* fokozza a sebociták differenciálódását; *ii.* részt vesz az arachidonsav lipidtermelést növelő hatásában; valamint *iii.* magában foglalja a protein kináz C δ aktiválódását is. Mivel az endocannabinoidok jelenléte az összes sejttípusban kimutatható volt, eredményeink funkcionális, a sejtek és „miniorganumok” növekedését önmagában gátló endocannabinoid jelátviteli rendszer működését valószínűsítik a humán bőrben.

P-58 A RAR α ligálása fokozza a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist és elősegíti a glükokortikoidreceptor mediálta transzkripciósi folyamatokat

Tóth K. Á., Fésüs L., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A szteroidhormonok családjába tartozó glükokortikoidok nagy jeletőségű antiinflammatorikus, immunosuppresszív és antineoplasztikus aktivitással bírnak, beleértve képességüket a T- és B-limfociták apoptózisának kiváltására. A glükokortikoidok ezen tulajdonsága lehetővé teszi széles körű felhasználhatóságukat az olyan neoplasztikus betegségek kezelésében, mint a leukémia és limfóma. A timociták glükokortikoid indukálta apoptózisa az egyik volt az elsők között elfogadott programozott-sejthalál-formáknak. Ez a hatás a glükokortikoidoknak a glükokortikoidreceptorhoz való kötődésén keresztül valósul meg, melynek következtében a hormon-receptor-komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol génexpresszió szabályozásán keresztül alapvető sejthalál-folyamatokat indít el. Ismert néhány glükokortikoid által indukálható gén, melyek közé a GILZ (glükokortikoid által indukálható leucinpipzár) transzkripciósi faktor is tartozik. A glükokortikoidokon kívül, a transz-retinsav és a 9-cisz-retinsav, melyek ligandumai mind a retinsavreceptorok (RAR), mind pedig a retinoid-X-receptorok (RXR), különböző módokon szintén timocitaapoptózist szabályoznak. A retinoidreceptorok, a glükokortikoid-receptorhoz hasonlóan, a sejtmagi receptorok családjába tartoznak. A transz-retinsav és a 9-cisz-retinsav hasonlóan aktiválják a RAR-t, míg a RXR esetében a transz-retinsav 50-szer kisebb mértékben a 9-cisz-retinsavhoz képest. Retinoidok jelenlétében a retinoidreceptorok RAR/RXR heterodimer, illetve RXR/RXR homodimer formájában fejtik ki aktivitásukat, és génextpressziót szabályoznak. Előzetes kutatásaink igazolták a retinoidok szerepét a timocita sejtelhalás indukciójában és negatív szelekciójuk szabályozásában. Jelen kísérleteink arra irányultak, hogy a retinoidok befolyásolják-e a timuszsejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist, ha igen, ez mely retinoidreceptorokon keresztül és milyen mechanizmussal történik. Immunprecipitációs és emlőskéthibrid módszer alkalmazva igazoltuk, hogy a RAR α direkt interakció révén kapcsolódik a glükokortikoidreceptorhoz. További eredményeink igazolják, hogy a ligált RAR α a szintén ligált glükokortikoid-receptorral együtt transzlokálódik a mitokondriumba. Kimutattuk, hogy a retinoidok glükokortikoidérzékeny sejtvonalak apoptózist is fokozzák, jelezve, hogy felhasználhatók lehetnek T-sejt-eredetű, rosszindulatú daganatok kezelésében is.

P-59 A homotrimer humán dUTPáz szerkezet-funkció-vizsgálata

Varga B.¹, Barabás O.¹, Tóth J.¹, Tölgyesi F.², Fidy J.², Vértessy G. B.¹

¹MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; ²SE, Biológiai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A humán dezoxiuridin-trifoszfát nukleotid hidroláz homotrimer enzim, mely a dUTP → dUMP + PP_i reakciót katalizálja. Az azonos monomerekben található öt, szigorúan konzervált motívumból épül fel a három aktív hely. Az egyik monomer C-terminálisa átnyúlik a másik két monomer által kialakított aktív zseb fölé. A szubsztrát bekötésekor ez a kar rázáródik

az aktív zsebre. A humán enzim nukleáris izoformájáról megmutatták, hogy nagy szerepet játszik a multirezisztens ráksejtvonalak túlélésében. Nagy termelékenységű expressziós rendszert sikerült létrehozni ezen izoforma rekombináns, His-jelzéssel ellátott változatára, valamint ugyanennek a rekombináns enzimnek egy Trp-mutáns változatára. A C-terminálison található, szigorúan konzervált motívum fenil-alaninját cseréltük triptofánra, kötődési vizsgálatok fluorimetriás követéséhez. A kalorimetriás és fluorimetriás úton követett szubsztrátkötődési vizsgálatokhoz a dUTP térszerkezetileg közel azonos analógját, az α , β -imido-dUTP-t használtuk. A foszfátpufferben végzett izotermális kalorimetriás titrálás alapján nem volt egyértelmű a három kötéshely független működése; más mérések azonban a foszfát/pirofoszfát ion(ok) ilyen jellegű szabályozó szerepét nem támasztották alá. A humán dUTPáz- α , β -imido-dUTP-komplex 3D kristályszerkezetének megoldásával láthatóvá vált a támadó nukleofil „near-attack” konformációja. (HHMI, GVOP, EUPF6)

P-60 Toxikogenomikai szűrés nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR technikával

Vass L.¹, Fehér L.², Lőrincz Zs.³, Cseh S.³, Dormán Gy.⁴, Puskás L.^{1,3,5}

¹MTA SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged; ²Avicor Kft., Szeged; ³Recomgenex Kft., Budapest; ⁴AMRI Hungary Zrt., Budapest;

⁵Aviadin Kft., Szeged

Humán hepatocarcinoma- (HepG2) sejtvonalon citotoxikus hatást mutató anyagok által indukált génextpressziós változásokat vizsgáltunk. A HepG2 sejteket 16 órán át inkubáltuk a vizsgált anyagok LD₁₀-koncentrációjával. A sejtekből RNS-t tisztítottunk, és cDNS-átírást követően nagy áteresztőképességű, nanokapilláris kvantitatív valós idejű PCR-technikával toxikológiai releváns gének és ABC-transportergének relatív expressziós szintjét határoztuk meg. A vizsgált anyagok között volt ismert és ismeretlen hatású toxikus anyag, gyógyszerhatóanyag és kombinatorikus kémiai könyvtárból származó kismolekula. A pozitív kontrollmintákhoz viszonyítva a molekulák metabolizmusában, transzportjában szerepet játszó gének mellett általános toxicitási génmerek expressziójának változását is nyomon követtük. Összesen 102 gén kifejeződését határoztuk meg. A kapott eredmények alapján következtettünk a citotoxikus anyagok lebontásában játszott metabolikus útvonalakra, esetleges mellékhatásokra, és fontos információt kaphatunk potenciális rákellenes szerek kifejlesztésére. A vizsgált anyagok egy része kisebb dózisban, más indikációkban akár gyógyszerkutatás tárgya is lehet. A kapott eredményekből létrehozott adatbank alkalmas lehet ismeretlen toxicitású vegyületek toxikus hatásának predikciójára.

P-61 A transzglutamináz 2 coeliakiás epitópjainak vizsgálata

Vecsei Zs.¹, Király R.^{1,2}, Bagossi P.¹, Fésüs L.^{1,2}, Korponay-Szabó I.³

¹DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; ²MTA Apoptózis és Genomika Kutatócsoport, Debrecen; ³Gyermekgyógyászati Klinika, Debrecen

A szöveti transzglutamináz (TG2) mint a legfontosabb autoantigén meghatározó szerepet játszik a coeliakia patomechanizmusában. 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 található a fő epitópok. Ezenkívül egy 237 aminosavnyi hosszú, antigénként funkcionáló szakaszt is azonosítottak a magdotéménen. Vizsgálataink során a coeliakiás epitóp felépítésében szerepet játszható aminosavakat azonosítottunk számítógépes modellezéssel, és ez alapján az enzim I. doménjén egy Arg (R), a II. (core) doménen egy Glu (E), a IV. doménen pedig egy Met (M) aminosavat cseréltünk Ser aminosavra helyspecifikus mutációval. Kísérleteinkben ezen mutációkat tartalmazó TG-k, és coeliakiás gyermekekből származó szérumminták közötti kölcsönhatást vizsgáltuk anti-TG ELISA eljárással, valamint fibronektinkötött TG felhasználásával (FBN-TG ELISA). Az anti-TG ELISA rendszerben a coeliakiás antitestek csökkentését mutatnak az R- és E-mutánsokhoz (75–80%, a TG100, monoklonális anti-TG-antitest kötődésére vonatkoztatva, vad típus 100%). Amikor a tervezett aminosavcserék egyszerre két doménen szerepeltek (RE dupla mutáns), a kötődés mértéke tovább csökkent (20%), a mindhárom aminosavcserét tartalmazó mutáns (REM) esetében pedig már csak 15% volt. Hasonló eredményre jutottunk, amikor az antitestek kötődését a FBN-TG ELISA rendszerben vizsgáltuk, a kötődés mértéke az REM mutánshoz 30% volt. A kísérleteinkben vizsgált coeliakiás antitestek közel azonos kötődési mintázatot mutattak, így valószínűsíthető, hogy a betegség elején egy domináns epitóp létezik. Ezen konformációs epitóp felépítésében szerepet játszanak az enzim I., II., illetve IV. doménjén található, egymáshoz viszonylag közeli aminosavak is.

P-62 Enzimjelzéses immunoassay (ELISA) és optikai immunszenzor (OWLS) kidolgozása pontyvitellogenin kimutatására

Veshtebey-Levkovets, I.¹, Adányi N.², Bukovszkaja, O.³, Blohin, Sz.³, Szendrő I.⁴, Székács A.¹
¹MTA NKI, Budapest; ²KÉKI, Budapest ³DoubleDelta Kft., Debrecen;
⁴MikroVákuum Kft., Budapest

A vitellogenin (Vtg) gerinctelenekben (rovarok) és bizonyos gerincesekben (halak, kétélűek, madarak) termelődő tojásfehérje-előalak, mely a nőivarú egyedekben termelődik, ám környezeti endokrin zavaró (EED) hatások nyomán szintézise abnormális módon, a hím egyedekben is megindulhat. A Vtg mint az EED hatások biomarkere kimutatására a vitellogenin típusú lipovitellin (Vtn, a Vtg egyik fehérjealegysége) két izoalakját különítettük el ponty- (*Cyprinus carpio*) petefészekből, s a fehérjéket nyulakban immunogénként alkalmazva ELISA rendszert és immunszenzort fejlesztettünk a Vtg kimutatására. A Vtn extrakciós kivonásához az aktív oogenezis stádiumában pontyovárium-mintákat gyűjtöttünk, s pufferes mosás, majd homogenizáció után a lipovitellint tartalmazó frakciót tömény szervesetlen sók (kétféle Na-só és egy Mg-só) oldataival vontuk ki. A terméket SDS-PAGE és ioncserélő kromatográfia segítségével DEAE-cellulóz-oszlopon analizáltuk (174 kDa, 24,8%; 14 kDa, 75,2%). A tisztított fehérjékkel 25 µg/kg dózissal vadas nyulakat immunizáltunk, majd a ter-

melt antitestet ELISA- és OWLS-mérésekhez alkalmaztuk. Szendvics típusú ELISA rendszer kialakítására az anti-Vtn immunglobulint (aVtn) tormaperoxidáz (HRP) jelzőenzimhez kötöttük, majd a szérumokat rögzített aVtn alkalmazásával ELISA rendszerben titráljuk, s a kapott aVtn-Vtn-aVtn-HRP szendvics ELISA rendszerben a Vtn meghatározása a 0,1-5 µg/ml koncentrációtartományban volt lehetséges. Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiái (OWLS) szenzortechnika lehetővé teszi, hogy az immunkémiai folyamatot rendkívüli érzékenységgel, szinte molekuláris léptékben, s egyszersmind valós idejű követéssel detektáljuk. OWLS szenzorok kialakításához glutaraldehid kapcsolással Vtn vagy aVtn fehérjét rögzítettünk az aminocsoportokkal módosított SiO₂-TiO₂ szenzorfelületen, így a Vtg kimutatására mind direkt, mind versengő OWLS rendszerben lehetőséget teremtve. Direkt rendszerben aVtn antitestet (1:1000 hígítás) rögzítve a Vtg lineáris kimutatási koncentrációtartománya 0,5-10 µg/ml volt. Versengő rendszerben Vtg vagy Vtn ismert koncentrációjú oldatait aVtn-oldattal (1:1000 hígítás) előinkubáltuk, majd az oldatot rögzített Vtn fehérjével (3 µg/ml) érzékenyített szenzorra vittük fel. A szenzorfelületre megkötődni képes aVtn mennyisége a mintabeli Vtg-koncentrációval fordított arányban állt, s a Vtg lineáris kimutatási koncentrációtartománya 5-100 pg/ml értéknek adódott. (NKFP 3A058-04, GVOP-3.1.1.-2004-05-0429/3.0, műszertechnika: MikroVákuum Kft.)

TE – Technológiaiismertető előadások (kereskedelmi cégek, képviseltek által szponzorált előadások)

TE-01 Multiplexed quantitative gene expression solution using GenomeLab™ GeXP genetic analysis system

S. J. Gadhner

Beckman Coulter International S.A., Nyon, Switzerland

Gene expression is used to analyze the function of one or more gene(s), determine transcriptional regulation, elucidate signal transduction pathways, map expression-level polymorphisms and aid in the area of molecular medicine, disease diagnosis and treatment. As a first step in the discovery process it is common to employ genome-wide transcript profiling to develop a list of candidate genes. This approach has been used to advance the understanding of complex diseases in humans and has been instrumental in the development of molecular medicine. Gene expression profiling can be used to classify tumors and in doing so has shown that tumors are far more heterogeneous than previously suspected. Further, 'expression profiling' of as few as 30 genes has led to the prediction of the biological response of tumors in response to chemotherapy agents. Similarly, Plant Biologists seek to understand the genetic underpinnings of complex physiological processes such as the control of vegetative and reproductive growth, the response of plants to 'biotic' and 'abiotic' stress and how to increase the yield of agronomic and horticultural plants. To this end, the GenomeLab GeXP Genetic Analysis System utilizes a patented, highly multiplexed PCR* (also known as qPCR, Quantitative PCR, or real-time PCR) approach to quickly and efficiently look at the expression of multiplexed gene sets with greater sensitivity and speed. By utilizing capillary electrophoresis technology, the GenomeLab GeXP provides a solution for quantitative gene expression that is cost-effective. It employs eXpress Profiling (XP-PCR), a patented technology for multiplex gene expression profiling analysis with which up to 30 genes can be easily multiplexed in the same reaction. Such a scalable solution enables the monitoring of tens to hundreds of genes for up to tens of thousands of samples. Examples of multiple applications areas for such gene expression needs include Discovery of Gene Targets, Pathway Analysis, Biomarker Discovery, Microarray Data Validation, RNAi studies, Drug Characterisation, Development of Signatures and monitoring of Gene Regulation. With this super-sensitive gene expression technology, microarray discoveries can be translated into high-throughput assays with good correlation between multiplexed PCR and microarray data. Coupled with capillary electrophoresis readout, this method can be efficiently used to look at focused sets of genes using very small amounts of total RNA (5 ng total RNA/reaction), or varied quality of RNA.
 (Szponzor: Bio-Science Kft., Budapest)

TE-02 Mikro-RNS-expressziós vizsgálatok „stem-loop” RT-PCR módszerrel

Szilassy D.

Applied Biosystems – Applera Magyarország Kft., Budapest

Napjainkra világhíressé vált, hogy mennyire elhamarkodott volt a kódoló géneken kívül eső genomi régiókat „hulladék” (azaz junk) DNS-nek ne-

vezni. Úgy tűnik, a humán genomban a fehérjét nem kódoló mikro-RNS gének száma meghaladja a kódoló génekét. Az is körvonalazódik, hogy a fajok összetettsége sokkal inkább ezen RNS-szekvenciákhoz köthető, mintsem a kódoló génekéhez. Évről évre rohamosan növekszik a mikro-RNS-gének funkcióival kapcsolatos közlemények száma. Mikro-RNS-ek szerepét leírták különböző daganatok esetében, genetikai öröklődésű neurológiai kórképekben, illetve újabban 20 mikro-RNS exkluzív jelenlétét mutatták ki humán embrionális őssejtekben. Amilyen mértékben csigázta fel a tudományos közvéleményt a mikro-RNS, olyan mértékben nőttek az ilyen kutatásokra szánt pénzforrások. Az egymással versengő laboratóriumok közül versenyelőnye van annak, amelyik a leghatékonyabb technológiát alkalmazza a kísérletekben. A kvantitatív PCR módszerre alapozott TaqMan® technológia a szakmai közvélemény – így a „Microarray Quality Control” konzorcium számára is – a leghatékonyabb módszernek bizonyult a messenger RNS-ek pontos mennyiségi meghatározására. Az eljárás – érzékenysége, specifitása és széles dinamikus terjedelme révén – a mikro-RNS-expressziós profil meghatározása esetén is bizonyított. Az előadásban ismertetjük a rövid mikro-RNS-eknél alkalmazott „stem-loop” PCR eljárást, bemutatunk referenciákat, illetve a munkafolyamat fontos részeként ismertetjük a mikro-RNS-tisztítás lehetséges módszereit.

(Szponzor: Applera Magyarország Kft., Budapest)

TE-03 Applications and new developments of quantitative PCR

N. Zoric

TATAA Biocenter, Gothenburg, Sweden

The new technique of quantitative nucleic acids analysis by real-time PCR is a refinement of the original polymerase chain reaction (PCR). By PCR essentially any nucleic acid sequence present in a complex sample can be amplified in a cyclic process to generate a large number of identical copies that can readily be analyzed. This made it possible, for example, to manipulate DNA for cloning purposes, genetic engineering, and sequencing. But as an analytical technique the original PCR method had some serious limitations. By first amplifying the DNA sequence and then analyzing the product, quantification was exceedingly difficult since the PCR gave rise to essentially the same amount of product independently of the initial amount of DNA template molecules that were present. This limitation was resolved in 1992 by the development of real-time PCR, where the amount of product formed is monitored during the course of the reaction by monitoring the fluorescence of dyes or probes introduced into the reaction that is proportional to the amount of product formed, and the number of amplification cycles required to obtain a particular amount of DNA molecules is registered. Assuming a certain amplification efficiency, which typically is close to a doubling of the number of molecules per amplification cycle, it is possible to calculate the number of DNA molecules of the amplified sequence that were initially present in the sample. With the highly efficient detection chemistries, sensitive instrumentation,

and optimized assays that are available today, the number of DNA molecules of a particular sequence in a complex sample can be determined with unprecedented accuracy and sensitivity sufficient to detect a single molecule. Typical uses of real-time PCR include pathogen detection, gene

expression analysis, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, analysis of chromosome aberrations, and most recently also protein detection by real-time immuno PCR.
(Sponsor: Merck Kft., Budapest)

A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke

BCE: Budapesti Corvinus Egyetem
BME: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
DE: Debreceni Egyetem
ELTE: Eötvös Loránd Tudományegyetem
KÉKI: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
MBK: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
MTA: Magyar Tudományos Akadémia
MTA NKI: MTA Növényvédelmi Kutatóintézet
MTA SZBK: MTA Szegedi Biológiai Központ
OGYIK: Országos Gyógyintézeti Központ
PTE: Pécsi Tudományegyetem

SE: Semmelweis Egyetem
SZIE: Szent István Egyetem
SZTE: Szegedi Tudományegyetem

ÁOK: Általános Orvostudományi Kar
ÁOTK: Állatorvos-tudományi Kar
KeTK: Kertészettudományi Kar
OEC: Orvos- és Egészségtudományi Centrum
TEK: Tudományegyetemi Karok
TSK: Testnevelési és Sporttudományi Kar
TTK: Természettudományi Kar

Szerző szerinti mutató

A					
Adányi N.	P-62	Borbély S.	P-17	É	
Alexa A.	P-33	Borbíró I.	P-57	Édes I.	E7-05, E8-07
Angelo, B.	P-35	Boross P.	P-04, P-37	Élesné Tóth K.	E2-06
Aradi J.	P-07	Brázda P.	P-08	F	
Arányi T.	E4-06	Brunyánszki A.	P-09	Faragó A.	E8-02
Ayaydin, F.	P-18, P-41	Buday L.	E8-03, P-26	Faragó N.	P-16
Á		Bujnicki, J.	P-50	Farkas A.	P-17, P-29, P-41
Ábrahám E.	P-01	Bukovszkaja, O.	P-62	Farkas I.	P-01
Ádám Cs.	P-02	Burgyán J.	E6-01	Fehér L.	P-16, P-18, P-41, P-60
Ádám G.	P-29	Buzás K.	E2-03	Fehér T.	P-19
B		C		Fekete Cs. A.	P-20
Bacsó Zs.	E4-01	Campbell, J.	P-19	Felföldi G.	P-21
Bagossi P.	P-04, P-12, P-37, P-40, P-42, P-61	Czikora I.	P-10	Fésüs L.	E8-08, P-07, P-11, P-12, P-14, P-15, P-34, P-58, P-61
Bai P.	P-09	Cs		ffrench-Constant, R. H.	P-21
Bakó É.	P-30	Cseh É.	P-01	Fidy J.	P-59
Baksa A.	P-03	Cseh S.	P-60	Fodor J.	P-36
Balajthy Z.	P-11	Cserhádi M.	P-49	Friedrich P.	P-02, P-17, P-29, P-33
Balázs A.	E8-03	Csernoch L.	P-36	Frisch, D.	P-19
Balázs M.	E4-01	Csomós K.	P-11	Fuxreiter M.	E4-04, E4-05, E5-01
Balikó G.	P-19	Csont T.	E7-06	G	
Bander P.	P-04	Csorba T.	E6-01	Gadher, S. J.	CE-01
Barabás O.	E5-06, P-59	Csontos Cs.	P-10	Galajda Z.	E7-05, E8-07
Bardóczy V.	P-05	Csörgő B.	P-19	Gallyas F., ifj.	E7-03
Barna T.	E5-03	Csősz É.	P-12	Gausz J.	P-29
Barta E.	E4-02	Csutak A.	P-06	Gál P.	BSD-01
Batta Gy.	E5-03	D		Gáspári Z.	E5-02, E5-03, E5-05
Bácsi A.	E8-06	de Boussac, H.	E4-06	Geiszt M.	E7-01
Bálint B. L.	E4-01, P-44	Deák P.	E3-03, P-02	Gergely P.	P-09, P-13, P-28
Bánhegyi G.	E7-02, P-35	Dobó J.	BSD-01	Géczi V.	P-05
Bánóczy Z.	P-17	Dobrosi N.	P-57	Géczy T.	P-57
Beck Z.	P-07	Docsa T.	P-13	Glocker, M. O.	E8-08
Beinrohr L.	BSD-01	Dombrádi V.	E4-01, P-01, P-02, P-29, P-33	Gombos L.	P-22, P-46
Benkő I.	P-07	Donkó Á.	E7-01	Good, M. C.	E1-02
Benkő Sz.	P-06	Dormán Gy.	P-60	Goto, Y.	P-38, P-46
Berente Z.	E7-04	Doró Z.	P-14, P-15	Gráf L.	E5-05, P-22, P-38, P-46
Berényi E.	P-07	Dosztányi Zs.	E5-01, P-12	Guttman A.	E2-06
Berta A.	P-06	Döbrönte R.	P-13	Gy	
Békési A.	E5-06, P-31, P-50	Drahos L.	E2-04	Gyimesi M.	P-56
Bhattacharrya, R.	E1-02	Dudits D.	E3-01	Györgyey J.	P-49
Binder, U.	E5-03	E		Gyórfy Zs.	P-19
Birkó Zs.	E2-03	Eleftherianos, I.	P-21	Gyula P.	E4-02
Biró S.	E2-03	Erdei A.	E2-05	H	
Bíró T.	P-57	Erdei S.	P-14, P-15	Halasy K.	P-17
Blattner, F. R.	P-19	Erdődi F.	P-28	Hancock, W. S.	E2-06
Blohin, Sz.	P-62	Erdős D.	E6-03	Harangi J.	P-42
Bodor A.	E5-02			Harmat V.	BSD-01
Bognár E.	E7-03, E7-04				
Borbély A.	E7-05, E8-07				

Hegedűs Cs.	P-23	Krizbai I.	P-41	P	
Hegyi Z.	P-03	Kulhanek, P.	E4-05	Pantaleo V.	E6-01
Hempel, W.	E2-06	Kunos, G.	P-57	Papp K.	E2-05
Hertelendi Z.	E7-05, E8-07	Kuras, M.	E2-06	Papp Z.	E7-05, E8-07
Héja D.	P-24			Patonay T.	P-23
Hild G.	P-45	L		Patthy A.	E5-05, P-22
Homolya L.	E6-02	Lakatos L.	E6-01	Paus, R.	P-57
Hóbor F.	P-25	Leiter É.	E5-03	Pazurik I.	P-23
Hódi Zs.	P-26, P-51, P-54	Letif, M.	E4-05	Pál G.	E5-05, P-24
Hrabák A.	E6-03	Leveles I.	P-50	Pál M.	E6-04, P-02
Huber, A.	P-09	Lévay Gy.	E2-01	Pál-Gábor H.	P-46
Hudecz F.	P-17	Liliom K.	P-03, P-32, P-46	Pásztorné Tóth E.	E8-07
Hunyadi-Gulyás É.	P-49, P-50	Limv W. A.	E1-02	Peitl B.	P-13
Hunyady L.	E8-01	Lipinszki Z.	E6-04	Penyige A.	E2-03
Hüse Cs.	P-13	Lontay B.	P-28	Perczel A.	E5-02
I		Lőrincz Zs.	BSD-01, P-60	Pécsi I.	P-47
Izsvák, Zs.	E1-01	Lőrinczy D.	P-45	Plunkett III, G.	P-19
J		Ludányi K.	E2-04	Pohl G.	P-51
Jakus Z.	E8-04	Lukács N.	P-49	Pop F. S.	P-29
Janáky T.	E2-01	M		Pócsi I.	E5-03
Jaquet, K.	E8-07	Magyarics Z.	E8-06	Pólikas Sz.	P-48
Juhász G.	E2-01	Malderez, C.	E2-06	Pós V.	P-49
Juhász T.	P-27, P-36, P-55	Manninger S.-né	P-49	Pósfai Gy.	P-19
Julesz J.	P-53	Margittai É.	P-35	Prechl J.	E2-05
Jullien, A.	E2-06	Marx, F.	E5-03	Pukáncsik M.	P-31, P-50
K		Mathews, K.	E8-05	Puskás L.	P-16, P-18, P-41, P-60
Kádas J.	E2-06	Matta Cs.	P-27, P-36, P-55	R	
Kádas J.	P-06, P-40	Matúz K.	P-37, P-40	Radák Zs.	E7-07
Karcagi I.	P-19	Mádi A.	E8-08, P-52	Radnai L.	P-51
Kardos J.	P-22, P-25, P-26, P-38,	Májai Gy.	E8-08	Rajnavölgyi É.	E8-06, P-06
	P-46	Málnási-Csizmadia A.	E4-03, P-22, P-56	Rapali P.	P-26
Karger, B. L.	E2-06	Márk L.	E2-02	Rákossy Zs.	E4-01
Karip E.	E8-01	Márkász L.	P-28	Rásó E.	P-18
Kasza I.	P-03	McElhinney, H.	E8-05	Reményi A.	E1-02
Kele Z.	E2-03	Medveczky P.	P-22	Reynolds, S. E.	P-21
Kerényi Z.	E4-02	Medzihradzky F. K.	E2-03, P-49, P-50	Rühl, R.	E8-09, P-39
Keresztes G.	P-14, P-15	Mérai Zs.	E4-02	S	
Kertész S.	E4-02	Mészáros T.	P-05	Sarang Zs.	P-34, P-52
Kékesi K.	E2-01, E5-05	Micsonai A.	P-38, P-46	Sarkadi B.	E6-02
Kéri Gy.	E6-03	Mihály J.	P-39	Sarlós K.	E5-07
Kintses B.	P-56	Miklóssy G.	P-06, P-37, P-40	Sándor Sz.	E5-03
Király R.	P-61	Miskei M.	P-02	Schlett K.	P-26
Kirken, R. A.	P-44	Molnár E.	P-18, P-41	Schneider Gy.	P-53
Kiss A.	P-07, P-28	Molnár I.	P-29	Schreiber, V.	P-09
Kiss B. K.	P-09	Molnár T.	P-26, P-51	Sellers, J. R.	E5-07
Kiss B.	E8-09	Mócsai A.	E8-04, E8-07	Seres L.	E6-02
Kiss D. S.	P-17	Mótyán J. A.	P-42	Silhavy D.	E4-02
Kiss I.	E8-09	Muha V.	E5-06	Simon E.	E8-04
Kiss L.	P-20	N		Simon I.	E4-04, E4-05, E5-01,
Kiss P.	E6-04	N. Kiss Gy.	E7-03, E7-04		P-12
Klement É.	E6-04, P-50	Nagy F.	E4-02	Simona, P.	P-35
Knight, P. J.	E5-07	Nagy L.	E4-01, P-44	Sipeki Sz.	E8-02
Kolozsvári B.	P-30	Nagy N.	P-43	Sipiczki M.	E3-02
Koncz Cs.	P-01	Nagy O.	P-02	Sipos A.	P-09
Kopper P.	E3-04	Nagy Zs. S.	P-44	Solti Z.	E8-03
Korponay-Szabó I.	P-61	Németh J.	P-13	Somogyi B.	P-45
Kovács E.	P-32, P-46	Németh T.	E8-04	Somsák L.	P-13
Kovács I.	P-23	Németh-Pongrácz V.	E5-06	Sperka T.	P-33
Kovács J.	P-46	Nyitrai M.	P-45	Stafford W.F.	P-26
Kovács K.	E7-03, P-23	Nyitray L.	P-25, P-26, P-51, P-54	Stráner P.	P-51
Kovács L.	P-33	O		Sümegei B.	E2-02, E7-03, E7-04
Kovács M.	E4-03, E5-07, P-43,	Ohmacht R.	E2-02	Süpeki K.	E8-01
	P-56	Oláh É.	P-28	Süveges D.	P-25, P-51
Kovács P.	P-07	Oláh G.	P-10	Symmons O.	E4-06
Kovári J.	E5-06	Orbán J.	P-45	Sz	
Koy, C.	E8-08	Orbán T.	E6-02	Szabados L.	P-01
Kókai E.	E4-01, P-29	Orient A.	E7-01	Szabó A.	E7-03
Kónya E.	P-31, P-23	Ozohanics O.	E2-04	Szabó G.	E4-01
Köröskényi K.	P-34	Ő		Szabó K.	P-03
Kövér E. K.	E5-03	Órfi L.	E6-03	Szabó Z.	E2-01
Kremmer T.	E2-04			Szajli E.	E2-03
Krenyacz J.	E2-04			Szántó A.	E8-08

Szegő É.	E2-01	Tompa P.	E5-04, P-54	Vecsei Zs.	P-61
Szeliné Szomor J.	E2-01	Tóth A.	E7-05, E8-07	Venekei, I.	P-21
Szendrő I.	P-62	Tóth I. B.	P-57	Vereb Gy.	E4-01
Szenes Á.	P-54	Tóth I.	P-53	Verin, A. D.	P-10
Szenthe B.	E5-05	Tóth J.	E4-03, P-47, P-59	Veshtebey-Levkovets, I.	P-62
Szécsi M.	P-53	Tóth K. Á.	E8-09, P-58	Végh P.	E2-05
Székács A.	P-62	Tóth-Petróczy Á.	E4-04	Vékey K.	E2-04
Székvolgyi L.	E4-01	Tölgyesi F.	P-59	Vértessy G. B.	E4-03, E5-06, P-31, P-47, P-50, P-59
Szilágyi L.	P-22	Tózsér J.	P-04, P-06, P-33, P-37, P-40	Világi I.	P-17
Szilágyi Sz.	E8-07			Virág L.	P-09, P-23
Szilassy D.	CE-02	Turu G.	E8-01	Vizler Cs.	P-18
Szilvássy Z.	P-13	Tusnád E. G.	E5-01		
Szjgyártó Zs.	P-27, P-36, P-55				
Szondy Zs.	E8-09, P-34, P-52, P-58				
Szőőr B.	E8-05				
		U		W	
T		Udupa, R.	E8-03	Wilson, J.	E8-05
Taberneró, L.	E8-05	Udvardy A.	E6-04	Wölfling J.	P-53
Takács B.	P-56	Umenhoffer K.	P-19		
Takács E.	E5-06			Z	
Takács L.	E2-06	V		Zagyva I.	E5-06, P-50
Tardieu, N.	E2-06	Varga B.	E4-03, E5-06, P-59	Zahuczky G.	P-11
Tárkányi I.	P-07	Vass L.	P-60	Zákány R.	P-27, P-36, P-55
Telek A.	P-57	Vaszily M.	E7-05, E8-07	Závodszy P.	BSD-01, P-38
Thirumurugan, K.	E5-07	Vámosi Gy.	E8-08	Zoric, N.	CE-03
		Várad A.	E4-07	Zouboulis, C. C.	P-57



SZKARABEUSZ

Szkarabeusz Környezetvédelmi és Kereskedelmi Kft.; Pécs, Nagy Imre u.148.
Vegyszerbolt, 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

- SERVALYTE 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
- Protoplazt fúzió: Fancelase

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, Diklórmétán, 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.)



ÁLLÁSHIRDETÉS

Az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biokémiai Tanszéke munkatársakat keres legalább hároméves időtartamra az alábbi témában:

Jelátviteli pályák molekuláris logikája

Jelenleg két Wellcome Trust és egy EU által támogatott posztdoktori, illetve egy laborasszisztensi állás betöltésére van lehetőség mihamarabbi kezdéssel. Bármely, a természettudományokban jártas és dinamikus fiatal kutató, mérnök vagy orvos jelentkezését várjuk, beleértve a fenti témát érdekesnek találó, leendő PhD-hallgatókat is.

Jelentkezés önéletrajzzal és publikációs listával dr. Reményi Attilánál
(E-mail: attila.remenyi@ucsf.edu)



ÁLLÁSLEHETŐSÉG

Kezdő biológust (esetleg vegyészt) keresünk géntechnológiai munkára (elsősorban rekombináns fehérjék előállítása a feladat), maximum hároméves szerződéssel. A jelentkező tudományos segédmunkatársi státuszba kerül, fizetés a közalkalmazotti bércategória szerint. A hároméves időtartam alatt lehetőség nyílik doktori iskolába történő jelentkezésre is. Korábbi gyakorlat előnyt jelent, de ennek hiánya sem kizáró feltétel.

Érdeklődni lehet Dr. Nyitray Lászlónál, ELTE Biokémiai Tanszék
E-mail: nyitray@elte.hu, tel: (1) 381-2172



ÁLLÁSHIRDETÉS

„Hipertermofil szerin oligopeptidázok szerkezete és működése” című elnyert OTKA-pályázat keretében hároméves időtartamra alkalmaznánk nedves laborban dolgozó tudományos segédmunkatársat.

Munkahely:
MTA SZBK, Enzimológiai Intézet
1113 Budapest, Karolina út 29.

Érdeklődni lehet Dr. Polgár Lászlónál
Tel.: (1) 279-3110.
Jelentkezhetnek 2008-ban végző diplomamunkások is.

KÖRNYEZETVÉDELEM - VÍZANALITIKA

GYORSTESZTEK



UNIVERSAL DUÓTEST VIZUÁLIS TESZTKESZLETEK
1 - 1000 mg/l 0,01 - 100 mg/l



FOTOMETRIÁS TESZTKÉSZLET
0,001 - 1000 mg/l
MACHEREY-NAGEL

SZŰRŐPAPÍROK MEMBRÁNSZŰRŐK SZŰRŐKARTONOK

A tradicionális minőség
megbízhatóságot garانتolja!

KVALITATÍV TESZTPAPÍROK pH - PAPIROK KVALITATÍV TESZTPAPÍROK



MACHEREY-NAGEL (MN)

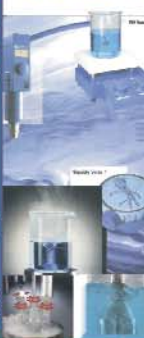
NAGYOBB TELJESÍTMÉNY KISEBB MÉRETBEN

az új koncepció: liquiTOC



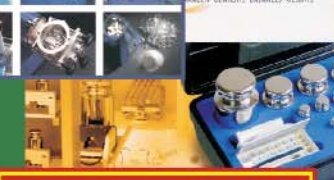
Magas hőmérsékletű TOC és TN
1 KESZÜLEKKEL
& PARAMÉTERT
TISZTA VÍZ * VÍZ * SZENNYVÍZ * ISZAP * SZILÁRD ANYAG
KOMPRIMÁLT TELJESÍTMÉNY, ÚJ TECHNOLOGIAVAL

IKA



VÍZANALITIKA

mobil, laboratóriumi és on-line kivitelben



ULTRA TISZTA VÍZ

CSAPVÍZBŐL KÖZVETLENŰ!

- Kompakt
 - Egyszerű
 - Hatékony
 - Képző ár
- EASypure[®] direct RoDi**
- TOC < 5 ppb
18,2 MegOhm.cm
ASTM Typ I.
minőségű víz

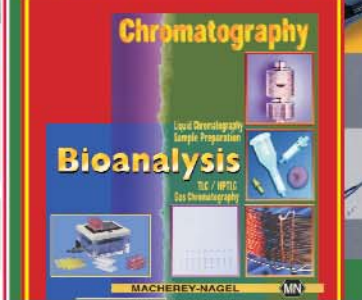


automess



RÁDIOAKTÍV SUGÁRZÁSMÉRŐ
MŰSZEREK ÉS MONITOROK

Desztilláció, extrakció, termoreakció bepöttes[®] univerzális analitikai rendszer "NEHÉZ" MÉRÉSEK KÖNNYEDÉN



NITROGÉN / PROTEIN tartalom mérése

Dumas módszer szerinti égetéssel,
automata analízatorokkal



A Dumas módszer előnyei:
* kedvező Igen kis helyigény
* nagy mintabemérés: 1 - 5 g
* pontos ismételhetőség

KERN



Waagen und
Prüfservice 2006

Elementar GmbH. elemanalizátorok

1 ppm...100% elemtartalomra



VARIO analízator család

C-H-N-O-S-CI



ELEMANALIZIS FELSZŐFOKON

AUTOMATA VÍZMINTAVEVŐK



AKTIVIT Kft.

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

MEGBÍZHATÓ EREDMÉNYEK A TEREPEEN CSÚCSMINŐSÉGŰ ESZKÖZKEL

WTW IQ SENSOR NET

MULTIPARAMÉTERES ELEKTRODÁS
MÉRŐLÁNC RENDSZEREK

SENSOR NET
paraméterek:
pH, OLDOTT OXIGÉN,
VEZETŐKÉPESÉG,
REDOX-POTENCIÁL,
HŐMÉRSÉLET,
ZAVAROSSÁG,
AMMONIA, NITRÁT,
SAK, LEBEGŐANYAG,
KOI, BOI, TOC,
H-TARTALOM

MULTI-PARAMÉTERES MULTI-MÉRŐHELYES

ES TELEPÍTETT
ATA VÍZMINTAVEVŐK
TOÁLLOMÁSOK

MULTIPARAMÉTERES
AUTOMATA ANALÍZÁTOROK

ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

MULTIPARAMÉTERES ELEKTRODÁS
MÉRŐLÁNC RENDSZEREK

SENSOR NET
paraméterek:
pH, OLDOTT OXIGÉN,
VEZETŐKÉPESÉG,
REDOX-POTENCIÁL,
HŐMÉRSÉLET,
ZAVAROSSÁG,
AMMONIA, NITRÁT,
SAK, LEBEGŐANYAG,
KOI, BOI, TOC,
H-TARTALOM

VÍZMINŐSÉG MONITOR SZENNYVÍZ-MINŐSÉG ELLENŐRZŐ

- csak 2-eres kábel
- hálózatos telepítés
- moduláris rendszer
- beépített adattároló
- automatikus szenzorfelcserélés
- digitális jelkimenet az ekvivalenpon
- beépített beavatkozó-vezérlő egység
- numerikus és diagram megjelenítés
- háttérvilágított grafikus LCD kijelző
- egyenlő igények szerint konfigurálható

PH, OLDOTT OXIGÉN, VEZETŐKÉPESÉG, REDOX-POTENCIÁL,
HŐMÉRSÉLET, ZAVAROSSÁG, AMMONIA, NITRÁT,
LEBEGŐANYAG-TARTALOM, KOI, BOI, TOC...

LABORTECHNIKA, ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

One Stop



For All Your Cell Culture Needs



bioprocess containers • media • buffers • reagents • serum-free media • FBS alternatives • sera

 **HyClone**[®]

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