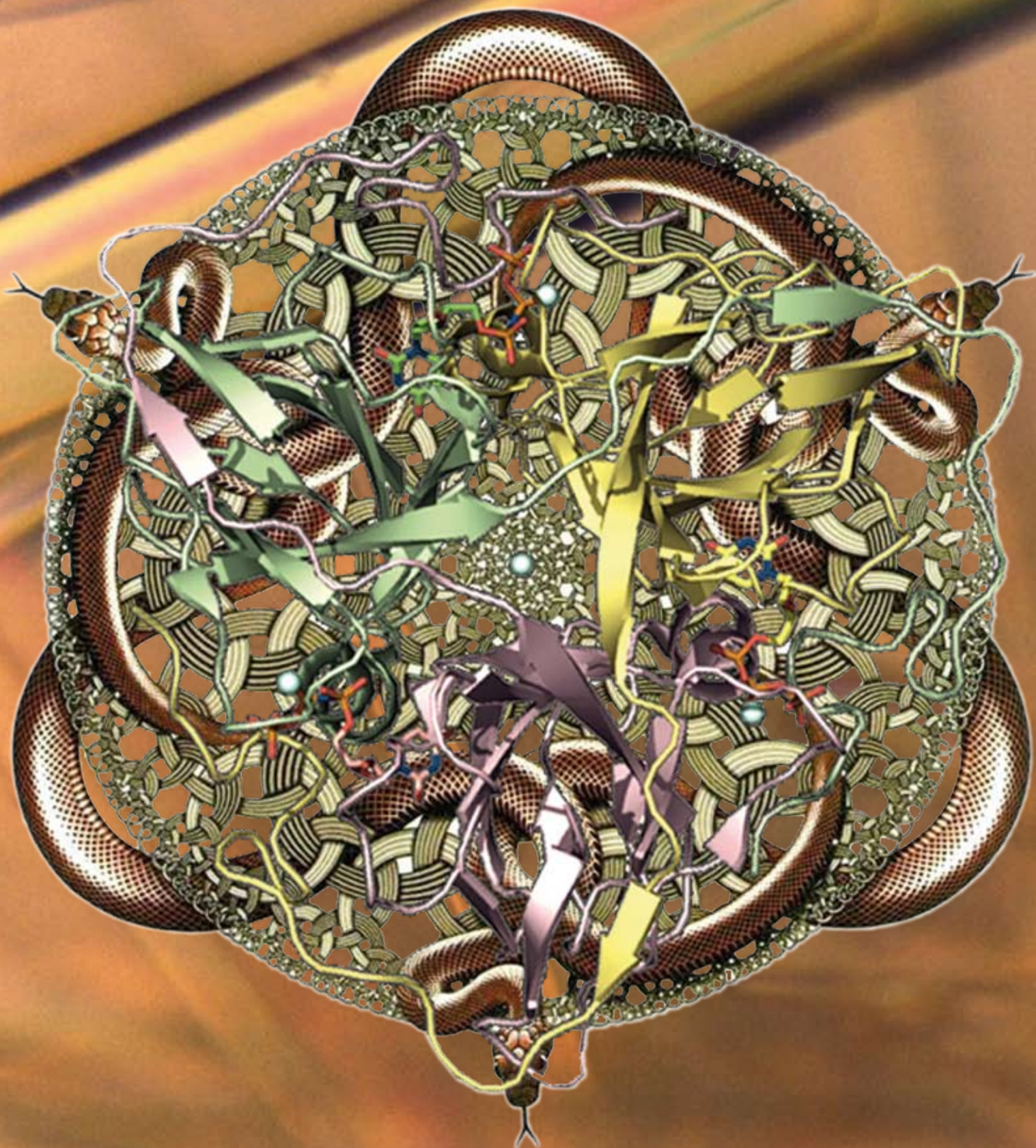


# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata  
XXXIII. ÉVFOLYAM 3. SZÁM 2009. augusztus





Válogatás a konferencia „**Szerkezeti biológia és képzőművészet – Structural Biology and Art**” (E5) szekciójára beérkezett művek/objektumok közül. A kiállító művészek: Bér Rudino, Boros Borbála, Mayer Berta, Zhenia Bozukova, Németh Andrea, Diane Sheehan, Vargay Zoltán, Végh András és Veszely Ferenc.



„A szerin proteázok aktivációs doménje”. Bér Rudino, akvarell, 2009.

**Bér Rudino** negyedik generációs festőművész, művészeti tanulmányait édesapja, Bér Rudolf műtermében kezdte. 1996-ban végzett a budapesti Képzőművészeti Főiskolán, mesterei Gerzson Pál és Dienes Gábor. Több hazai és külföldi kiállításon vett részt. Külföldi tanulmányokat Kanadában (Carleton Egyetem) is folytatott, emellett európai (Olaszország, Spanyolország, Franciaország) és észak-afrikai (Marokkó, Egyiptom) tanulmányutakat tett, illetve tanított a Philadelphiai Szépművészeti Egyetemen. Főbb kitüntetései, díjai: Domanowsky-díj (1991), Barcsay-díj (1993), „Per meriti culturali” (2005). Tájképeit olasz, spanyol és hazai (pl. Balatonfelvidék) tájak ihletik. Az alkotás mellett rajzpedagógusként működik, a Dési Huber István Rajziskola vezetője.



„Alfa-hélix, a proton-pumpa szerkezeti dinamikája”. Végh András, olaj-vászon, 2009.

**Végh András** 1967-ben végzett a Magyar Képzőművészeti Főiskolán, mesterei Kmetty János, Bernáth Aurél. Főbb ki kitüntetései, díjai: Derkovits-ösztöndíj (1975), Munkácsy-díj (1994). Rendkívül gazdag munkássága során a legkülönbözőbb technikákkal dolgozik, nagyméretű olajvászon és tusvászon képek mellett készít kollázsokat, újságpapír- és farost-installációkat, dolgozik. Absztraktra hajló festészetét a valósághű és az elvont párhuzamos megjelenítése jellemzi, mind forma- mind színvilága erőteljesen dinamikus és változatos. Wehner Tibor méltatása szerint: „<Végh András>... új művein a gesztusokat higgadt geometrikus alakzatok ellenpontozzák, másokon az erőteljes rácsszerkezet vagy finom vonalháló teremt fegyelmezett kompozíciót”.

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata  
a 2009. évi Vándorgyűlés (Budapest, 2009. augusztus 23–26.)  
előadás és poszter összefoglalóival

Szervezőbizottság:  
Nyitrai László Vértessy Beáta, Buday László

Főszerkesztő:  
Szűcs Mária

Társszerkesztő:  
Székács András

Technikai szerkesztő:  
Márki Árpád

XXXIII. ÉVFOLYAM 3. SZÁM

2009. augusztus

## TARTALOMJEGYZÉK

### Címlapkép: Összefonódás (készítette Gráf László és Simon Zoltán)

A homotrimer dUTPáz enzim szerkezete (Vértessy G. B.) átfedésben a „Kígyók” című grafikával (M. C. Escher). A humán **dUTPáz** háromdimenziós térszerkezetét  $\alpha, \beta$ -imino-dUTP-inhibitorral és  $Mg^{2+}$ -kofaktorral együtt kristályosított formájából határozták meg röntgen krisztallográfias úton (PDB ID 3EHW). A grafika Pymol programmal készült. A  $120^\circ$ -os forgási szimmetriát mutató kristály szerkezetben jól láthatók a monomerenként 8 százból álló antiparallel redők. A „Kígyók” (1969) Escher utolsó műve, amely szintén a  $120^\circ$ -os forgási szimmetriára épül. (A fametszeten a három kígyó valójában egyetlen nyomólap elforgatásával készült.)

[Az Escher-kép látványosan animált változatát lásd:

[http://www.etereaestudios.com/docs\\_html/snakes\\_htm/snakes\\_index.htm](http://www.etereaestudios.com/docs_html/snakes_htm/snakes_index.htm)]

**Belső borítók:** Válogatás a konferencia „ Szerkezeti biológia és képzőművészet – Structural Biology and Art ” (E5) szekciójához kapcsolódó kiállítás anyagából.

E0 - Plenáris előadások .....	2
DE - Díjazottak előadásai.....	3
E1 - Kémiai biológia .....	4
E2 – <b>In silico</b> biológia .....	6
E3 – Fehérjégek.....	8
E4 – Jelátviteli rendszerek .....	10
E5 – Szerkezeti biológia és képzőművészet – Structural Biology and Art.....	12
E6 – Makrokuláris kölcsönhatások .....	13
E7 – Humán betegségek molekuláris biológiája.....	15
P – Poszterek .....	17
P1 - Kémiai biológia .....	17
P2 – <b>In silico</b> biológia .....	19
P3 – Fehérjégek.....	21
P4 – Jelátviteli rendszerek .....	23
P6 – Makromolekuláris kölcsönhatások .....	31
P7 – Humán betegségek molekuláris biológiája.....	35
P8 – Egyéb témák .....	40
TE – Technológiásmertető előadások .....	42
A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke .....	43
Szerző szerinti mutató .....	43

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6, <http://www.mbkegy.hu/>

Felelős kiadó Dr. Fésűs László

Az engedély száma III/SZI/397/1977, HU ISSN 2060 8152 (Online)

HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)



## E0 - Plenáris előadások

### E0-01

#### Szerkezetkutatás röntgenlézerekkel

Hajdú J.

Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden; MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; Stanford Linear Accelerator Center, Stanford University, Palo Alto, CA, USA

Az első röntgenlézereket a csillagháború évtizede során fejlesztették ki, s azóta a berendezések jelentős átalakuláson mentek át. A röntgenlézerek új típusaiban lineáris gyorsító helyettesíti a korábbi nukleáris töltetet, amire a lézerhatás beindítására volt régebben szükség. Ezek a szabadelektron-lézerek kb. tízmilliárdszor nagyobb elérhető fényességmaximummal rendelkeznek, mint a legfejlettebb szinkrotron-sugárforrások. A különösen nagy csúcsintenzitású és rendkívül rövid röntgenimpulzusok (pl. femtoszekundumos lágy röntgenlézer) új kísérletekre adnak lehetőséget a fizika, kémia, biológia és csillagászat különféle területein. Az előadás kísérleti eredményeket ismerteti a szerkezeti kutatás különböző területeiről szabadelektron-lézerekkel és újfajta kompakt röntgenlézerekkel.

### E0-02

#### Kis szabályozó RNS-ek: mennyien vagytok?

Hutvagner Gy.

University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

Az első mikro-RNS felfedezése óta eltelt másfél évtized alatt bebizonyosodott, a génszabályozás ősi, alapvető formáját rövid (19-31 nukleotidhossznyi) RNS-molekulák végzik. Ez a szabályozási mechanizmus sokáig észrevétlen maradt, de az RNS-kimutatói technikák és a szekvenálási módszerek (deep sequencing) finomodása révén e szabályozó RNS-ek katalógizálása, funkcióinak vizsgálata rutinszerűvé vált. A kis RNS-eket kötő és a létrehozásukban résztvevő fehérjék előfutárai Archae és Prokaryota szervezetekben egyaránt fellelhetők. A kis szabályozó RNS-ek többsége hasonló módon keletkezik és hasonló fehérjekomplexekbe épül be, azonban fajtánként különböző génszabályozási folyamatokban vehetnek részt: transzkripció és poszt-transzkripció folyamatokat egyaránt szabályoznak, csendesítik a transzkripciót heterokromatikus környezetben, gátolják a transzpozonok aktivitását, szükségesek a DNS metilációjához, gátolják vagy serkentik a transzlációt. A legújabb szekvenálási eredmények azt mutatják, hogy a sejtek, élőlények szinte kimeríthetetlen mikro-RNS-arsenállal rendelkeznek. Abundáns nem kódoló RNS-ek – transzfer, riboszomális és kis nukleoláris RNS-ek – szintén generálhatnak kis RNS-eket, amelyek új funkciót nyerve vesznek részt a génszabályozásban.

### E0-03

#### Endokannabinoidok és a metabolikus szindróma

Kúnos Gy.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Az elhízás, prediabetes, diszlipidémia és magas vérnyomás tünetegyüttese az ún. metabolikus szindróma, melynek meghatározó kóroki tényezője az inzulinrezisztencia. A máj inzulinrezisztenciája különösen fontos, hiszen ez önmagában is okozhat diszlipidémiát és arterioszklerózist. Az inzulin a májban egymástól független jelátviteli utakon gátolja a glükóz szintézisét, és fokozza a *de novo* lipogenezist. Az inzulinrezisztencia gyakran kísért hipertrigliceridémiával és májelzsírosodással. Ez a jelátadás posztreceptor szintű gátlására utal, ami nem érinti az inzulin lipogénikus hatását. Az metabolikus szindrómában szenvedő betegekben CB1 kannabinoid-receptor-blokkolóval történő kezelés csökkenti a testsúlyt, valamint javítja a glükóztoleranciát és a plazmalipidprofilt, a fokozott endokannabinoid-aktivitás kóroki szerepére utalva. Egészséges emberekben és kontroll egerekben kannabinoidok akutan csökkentik a glükóztoleranciát és fokozzák a májbeli lipogenezist. Ezeket a hatásokat a májbeli CB1 receptorok közvetítik, amit a következő megfigyeléseink támasztanak alá: (1) Az inzulin glükózzintézist csökkentő hatását az AKT/protein kináz B szerin/treonin foszforilációján keresztül váltja ki, és ezt a hatást emberi illetve egérből izolált májsejtekben CB1 receptoragonisták gátolják. Kontroll egerekben magas zsírtartalmú étrend glükóztoleranciát és májelzsírosodást okoz, míg globális vagy májspecifikus CB1 génkiütött egerek erre rezisztensek. E hatások újra megjelennek olyan transzgenikus egerekben, melyekben CB1 receptorok csak a májsejtekben találhatóak. Ez azt bizonyítja, hogy a májbeli CB1 receptorok endokannabinoidok által történt aktiválása nemcsak szükséges, de elégséges a zsírgazdag étrenddel kiváltható inzulinrezisztencia és májelzsírosodás létrejöttéhez. Ennek alapján indokoltnak tartjuk a perifériás szervekben található CB1 receptorok szelektív célbavételét új stratégia érdekében a metabolikus szindróma gyógyszeres kezelésére.

### E0-04

#### Magreceptorok és citokinek által szabályozott génexpresszió immunsejtekben

Nagy L.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A peroxiszómaproliferátor-aktivált  $\gamma$ -receptor (PPAR $\gamma$ ) olyan lipidaktivált transzkripció faktor,

amely összekapcsolja a zsírsavanyagcserét a gyulladásszabályozással, és szerepet játszik a cukorbetegség és az érlelmeszesedés kialakulásában. A PPAR $\gamma$  transzkripciósan aktív makrofágokban és dendritikus sejtekben is. Az azonban nem ismert, hogy mi szabályozza a receptor aktivitását az egyes immunsejt-szubpopulációkban. Úgy tűnik, hogy citokinek jelentős hatással vannak a receptor aktivitására: proinflammatorikus molekulák gátolják, míg interleukin 4 (IL-4) aktiválja a PPAR $\gamma$ -aktivitást makrofágokban és dendritikus sejtekben. Globális génexpressziós vizsgálataink szerint e sejtekben a receptor azonos mértékig szolgál aktivátorként,

mint represszorként. Továbbá az IL-4 jelátviteli útvonal PPAR $\gamma$ -fokozó hatása egy eddig még nem ismert jelátvitelért és transzkripcióért felelős faktor (STAT6) és a PPAR $\gamma$  közötti, a szabályozott gének promóterén létrejövő kölcsönhatásnak köszönhető. Így tehát a STAT6 a PPAR $\gamma$  aktivitását elősegítő (*licensing*) faktornak tekinthető, ami által növekszik a szabályozott gének száma és az indukciók nagysága. Ez a citokin és magreceptor útvonalak közti kölcsönhatás a lipidanyagcsere egyedi, citokinek általi, szabályozási lehetőségét biztosítja, és lehetővé teszi a sejt-specifikus génexpresszió biztosítását.

## DE - Díjazottak előadásai

### A Bio-Science-díj nyertesének előadása

#### DE-01

**Egyet fizet, kettőt kap: humán embrionális őssejtek kardiomiocita irányú differenciációja egy kettős arcú promóterrel, *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbevitelt követően**

Orbán T.<sup>1</sup>, Apáti Á.<sup>1</sup>, Izsvák Zs.<sup>2</sup>, Ivics Z.<sup>2</sup>, Sarkadi B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SE, Membránbiológiai Kutatócsoport, Budapest; <sup>2</sup> Max-Delbrück Centrum, Berlin, Germany  
Az embrionális és a szöveti őssejtek alkalmazása nagy lehetőségeket rejt magában, elsősorban a helyreállító („regeneratív”) orvoslás területén. Az őssejtek ilyen irányú felhasználásának több problémája közül biológiai szempontból nagy kihívás a genetikailag módosított őssejtek adott irányú szöveti differenciáltatása. A szakirodalomban leírt módszerek általában kettős szelekción alapulnak: az első szelekció a génbevitel hatékonyságára, míg egy másik a differenciáció során keletkező, adott irányú sejtcsoport kiválogatására irányul. Munkánk során humán embrionális őssejtekbe *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer segítségével juttattunk be riportergéneket, majd kardiomiocita irányú differenciáció során vizsgáltuk a stabilan integrálódott transzgén expresszióját. A CAG promóter egyik változatát használva azt a meglepő felfedezést tettük, hogy ez a DNS-szekvencia „kettős arcú” promóterként működve egyszerre oldja meg a differenciáltatásra szánt őssejtekbe történő génbevitel két fontos problémáját: (1) hagyományosan konstitutív promóterként működve segítségével azonosíthatók a genetikailag módosított differenciálatlan őssejtek (vagyis választ kapunk a génbevitel hatékonyságára), (2) ugyanakkor a differenciáció során ez a minden szövetben megszólaló promóter nagyon erős transzkripciósi aktivitást mutat szívizomsejtekben, így megfelelő riportergénnel kombinálva ezek a típusú sejtek invazív beavatkozások (pl. antibiotikus szelekció) nélkül kiválogathatók. Igazoltuk, hogy a hatás független a génbeviteli eljárástól, a riportergén szekvenciájától, illetve a transzgén integrációs helyeitől és kópiaszámától, így valóban a promóter „kettős arcú” aktivitásához köthető. A kardiomiociták ilyen eljárással történő előállítása azért is előnyös, mert jelenleg nem ismertek (és így kereskedelmi forga-

lomban sem kaphatók) olyan szívizom-specifikus, sejtfelszíni fehérjék elleni antitestek, amelyek felhasználásával humán szívizomsejtek hasonló, nem invazív módon kinyerhetők lennének.

### Az MBKE-díj nyertesének előadása

#### DE-02

**A kalcitriol és az immunfunkcióhoz kapcsolható gének szabályozása dendritikus sejtekben**

Széles L.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A dendritikus sejtek nélkülözhetetlenek az adaptív immunválaszok és a tolerancia kialakításában, de a természetes immunitáshoz is hozzájárulnak. Az immunválaszt kiváltó folyamatokban elsősorban immunogén, míg azok csendesítésében tolerogén dendritikus sejtek vesznek részt. Kísérleteink során egy magreceptor, a D-vitamin-receptor (VDR) indukálta változásokat vizsgáltuk. Korábban igazolták, hogy a VDR agonistája, a kalcitriol számos, a dendritikus sejtekben bekövetkező változást gátol, és a kalcitriolkezelt dendritikus sejtek fenotípusuk és funkciójuk alapján tolerogén dendritikus sejteknek tekinthetők. Azt vizsgáltuk, hogy hogyan függ össze a differenciálódás és a kalcitriol-szabályozott transzkripció. *Microarray* és qPCR technikákkal vizsgálatokat végeztünk el humán monocitákból differenciálódó, illetve vérből izolált mieloid dendritikus sejteken. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a differenciálódás és a kalcitriol által szabályozott gének csoportjai átfednek ugyan, de nagyszámú olyan gén is van, amelyet vagy csak az egyik vagy csak a másik program szabályoz. Sok esetben akkor is függetlennek tekinthető a két program egymástól, amikor mindkettő képes szabályozni egy adott gén transzkripcióját. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az exogén (vagy a dendritikus sejtek által szintetizált) kalcitriol olyan programot szabályoz, amely nagymértékben független a dendritikus sejtek differenciálódási folyamatától. Ez arra is utalt, hogy a kalcitriol nem kizárólag immunogén programok gátlása által, hanem jelentős részben aktív folyamat révén szabályozza a dendritikus sejtek tolerogén fenotípusát.

## E1 - Kémiai biológia

### E1-01

#### Struktúrák és ultrasztruktúrák a konformációs betegségekben

Ovádi J.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A társadalom előregedésével a neurodegeneratív betegségek, s ezen belül az ún. konformációs betegségek (Parkinson-, Alzheimer- illetve Huntington-kór) mindinkább népbetegséggé válnak. Kialakulásuk többlépcsős folyamat, amelyeknek kiindulópontjai alapvetően szerkezetnélküli vagy hibásan hajtogatódott fehérjék ( $\alpha$ -szinuklein,  $\tau$ - és a mutáns huntingtin fehérje), melyek nem képesek élettani funkciójukat ellátni, mivel aberráns kölcsönhatásokhoz vezetnek, fokozott aggregációs aktivitást mutatnak, ami zárványtest-képződéshez, majd neuroncsoportok pusztulásához vezet. A patomechanizmusok megismerése a kutatások egyik jelentős célpontja, melynek fontos részét képezi új szereplők azonosítása, szerkezeti és funkcionális sajátosságai, kölcsönhatásai sejtszintű és molekuláris jellemzése. Szerkezeti biológiai technikák alkalmazásával, fehérjék fluoreszcens jelölésével, egyedi humán sejtekben nagyfelbontású mikroszkópos monitorozásával, valamint humán patológiás agyszöveti minták ultrastrukturális és rendszer szintű vizsgálatával sikerült azonosítani egy új, szerkezetnélküli fehérjét, a tubulin-polimerizáció-promóter proteint (TPPP/p25) [[http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=24164](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=24164)]. A 3D szerkezettel nem rendelkező, flexibilis fehérje célpontja a mikrotubuláris rendszer, melynek dinamikáját és stabilitását alapvetően meghatározza. Funkcióját specifikus protein kinázok által foszforilált szignálszekvencia, kifejeződését poszttranszkripció szinten a miR-206, fehérje szinten a proteozóma-rendszer szabályozza. Patológiás kifejeződése, toxikus fehérjeaggregátumokat eredményező, aberráns fehérje-kölcsönhatásai, jelentős szerepet játszanak konformációs betegségek kialakulásában, valamint a fehérje sejtciklust gátló hatása révén tumor-genezisben. A TPPP/p25 potenciális biomarker és gyógyszer-célpont konformációs betegségek korai diagnosztizálására vagy kezelésére.

### E1-02

#### Biokonjugátumok versus *Mycobacterium tuberculosis*

Bősze Sz.

ELTE, MTA Pepitdkémia Kutatócsoport, Budapest

A tuberkulózis (TB) világszerte fontos népbetegség, amely veszélyezteti a BCG-vakcinával oltott és nem oltott egyéneket is. A TB megállapítása mikroszkópos és mikrobiológiai vizsgálatokon alapszik; és a diagnózis legtöbbször előrehaladott stádiumban történik. A *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) baktériumos fertőzés kimutatása történhet immunreakción alapuló módszerekkel, melyek érzékenysége és specifitása a stimuláláshoz használt antigénektől függ. A MTB immundomináns

fehérjében T-sejt-epitópokat lokalizáltunk, bizonyítottuk, hogy szintetikus peptidok – a rekombináns fehérjékhez hasonlóan – alkalmasak *in vitro* T-sejtes immunválasz kiváltására. A fehérjékkel szemben a peptidok előnye, hogy eltarthatók és előállításuk olcsó, reprodukálható. A szintetikus T-sejt-epitóppeptidok antigenitása tovább növelhető hordozó molekulákhoz (elágazó láncú polimerek, oligopeptidok, pl. tufsinszármazékok) történő konjugálással. A MTB intracelluláris kórokozó, amely (bár más sejtet is képes megfertőzni) a tüdő alveoláris makrofágaiban él. A hatóanyagok többsége kismértékben hat az intracelluláris (és a dormans) baktériumokra, többségük elsősorban a gazdasejten kívül csökkenti a mikrobák számát. Új kemo-terápiás szerek keresése mellett fontos irányzat az antituberkulotikumok hatékonyságát sejt- és szövetspecifikus célbajuttatással növelni. A jelenleg alkalmazott antituberkulotikumok fertőzött makrofágokba történő szelektív célbajuttatására hatóanyag-konjugátumokat tervezünk és állítunk elő. Kutatásainkban igazoltuk, hogy a hordozó egységhez történő konjugáció nem befolyásolja az antituberkulotikum *in vitro* gátló hatását MTB H37Rv tenyészetben. A makrofágok szelektív hatóanyag-felvételének optimalizálásával kisebb napi dózisok alkalmazása és rövidebb terápia válhat elérhetővé, ami csökkentheti a mellékhatásokat és a kezelés költségét is.

### E1-03

#### Krisztallográfiai alkalmazások fehérje-ligandum kölcsönhatások vizsgálatában

Harmat V.

ELTE, MTA Fehérjemodellező Kutatócsoport, Budapest

Az utóbbi évtizedben a fehérjekrisztallográfia új módszereinek terjedése, automatizálási törekvések, a lépések nagy(obb) áteresztőképességűvé válása a szerkezetmegoldás egész folyamatát (fehérje-előállítás, -tisztítás, kristályosítás, adatgyűjtés, a fázisprobléma megoldása, modellépítés, -finomítás) érinti. Kiemelendő a módszernek még napjainkban is szűk keresztmetszetét jelentő fehérje-előállítás és -kristályosítás terén a robottechnika bevezetése, és a szinkrotron sugárforrások rutinszerű használata. Az újítások – amellett, hogy a makromolekulák egyre szélesebb körét teszik elérhetővé a szerkezetvizsgálat számára – egyre több esetben nyújtanak a térszerkezet kis torzulásairól és a szerkezet-stabilizáló másodlagos kölcsönhatásokról is igen pontos és részletes képet. A fehérje-ligandum kölcsönhatások feltérképezése komplexek kristályaiban a kötőhely azonosításán túl segítséget nyújt például enzimreakciók, -szabályozás, allosztérikus hatások mechanizmusfelderítésében is. A krisztallográfiai módszerek jobb automatizálása eredményeképpen a szerkezetmegoldás folyamata felgyorsult, és egyre több példa van hatóanyag-tervezés különböző fázisaiban való alkalmazásokra (a célfehérje kiválasztása, szűrés, a vezérmolekula azonosítása



és optimalizálása) is. A váratlan kötési módok gyakori előfordulása is aláhúzza a módszer jelentőségét. (OTKA NK67800, K72973, F67937, NI68466; ICGEB CRP/HUN09-03)

#### **E1-04 Protein–ligandum kölcsönhatások az oldószernek kitett kötőhelyeken: NMR-megközelítés**

Martinek T.

SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet, Szeged

Az oldószernek kitett, csak kis affinitású kötések kialakítására képes kötőhelyek (*non-druggable*) a hatóanyag-fejlesztésben nem kívánatosak. Azonban a biológiai jelátviteli rendszerekben gyakran előfordulnak, vagy éppen fontos patofiziológias célmolekulák mutatnak ilyen kölcsönhatásokat. Továbbá a gyógyszerkutatásban fontos a fragmens alapú megközelítés, ahol e gyenge kölcsönhatások kulcsszerephez jutnak. Emiatt a gyenge protein–ligandum kölcsönhatások kísérletes jellemzése egyre nagyobb érdeklődésre tart számot, és ennek egyik legfontosabb módszere a biomolekuláris NMR-spektroszkópia. Ilyen irányú vizsgálataink a galektin-1 (Gal-1) tumor-dajkafehérjére és az Alzheimer-kórra tipikus  $\beta$ -amiloid-aggregátumokra ( $A\beta$ ) terjednek ki. A Gal-1 esetében a natív ligandummal (laktóz) való kölcsönhatást térképeztük fel. A gyenge kötődés jelentős változást idézett elő a fehérje szerkezetében és dinamikájában a kötőhelytől távol is. A Gal-1 galaktozid-kötőhelyének dinamikus viselkedése magyarázatot adhat a fehérje pleiotróp viselkedésére. Az  $A\beta$  vonatkozásában számos peptid és peptidomimetikum gyenge kötődését mutattuk ki. Ezek az anyagok a gyenge kötődés ellenére olyan jelentős szerkezeti változásokat idéztek elő, amelyek felelőssé tehetőek e peptidok illetve peptidomimetikumok neuroprotektív hatásáért.

#### **E1-05 CCP modulok kölcsönhatásvizsgálata kísérletes és elméleti módszerrel**

Láng A.<sup>1</sup>, Szilágyi K.<sup>2</sup>, Major B.<sup>2</sup>, Gál P.<sup>2</sup>, Závodszy P.<sup>2</sup>, Perczel A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Kémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az emberi szervezet immunológiai védekezésében fontos szerepet játszó klasszikus komplement útvonal moduláris felépítésű C1r szerin proteázában található komplementkontroll fehérje (CCP) két, tandem elhelyezkedésű modulját vizsgáltuk NMR-spektroszkópia segítségével. A CCP-modulok <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N-korrelációs spektrumainak segítségével a gerincamid <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N kémiai eltolódásának változása-

it követtük a partner CCP fokozatos hozzáadására. A perturbációs vizsgálatok arra utalnak, hogy a két modul a vizsgált körülmények között (~1 mg/ml végkoncentráció; pH 7; 300 K) egymással kölcsönhat. Nagyobb változást a második modulban (Gly408–Val409, Glu425), míg kisebb hatást az első modulban (Gly330) észleltünk. A kísérletes adatok felhasználásával fehérje–fehérje-dokkolást végeztünk (HADDOCK): a két modul kölcsönhatása kiterjedt felszínnel jellemezhető, a részletes értékelés folyamatban van.

#### **E1-06 A nukleotidhidrolízis rendhagyó szabályozása kétértékű fémióonnal dUTPáz enzimben**

Takács E., Scheer I., Vértessy G. B., Tóth J.  
MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Számos nukleotid hidroláz igényel kétértékű kationt enzimaktivitásának optimális működéséhez. A fémió ion sok esetben nélkülözhetetlen az enzimaktivitáshoz (DNS polimerázok), a dUTPáz enzimek feltehetően fiziológias Mg<sup>2+</sup>-kofaktora azonban különös módon csak kétszeresére gyorsítja az enzim állandósult állapotú aktivitását. Optikai spektroszkópiai, tranziens kinetikai és kristályszerkezet-meghatározó módszerekkel azt vizsgáltuk, hogy a Mg<sup>2+</sup> miként befolyásolja a dUTPáz szerkezetét és kinetikai mechanizmusának lépéseit. Megállapítottuk, hogy a Mg<sup>2+</sup>-ionnak két szubsztrátfüggetlen szerkezeti kötőhelye van a dUTPáz trimeren, amelyből egyet nagyfelbontású kristályszerkezetben a központi csatornában vizualizálni is tudtunk. A másik, két nagyságrenddel eltérő affinitású kötőhely valószínűleg szintén a csatornában található. Az aktív helyen Mg<sup>2+</sup> valószínűleg csak szubsztráthoz kötött formában lehet jelen, ekkor koordinációs szférája szabályos oktaéder. Fém hiányában a szubsztrát  $\alpha$ -foszfátja transz és gauche térállást is felvehet, a Mg<sup>2+</sup> kedvező koordinációja azonban csak az utóbiban alakulhat ki, és szintén ez a hidrolízisben kompetens aktívhely-konformáció. Mg<sup>2+</sup> hiányában a szubsztrát transz konformációban diffúziólimitált sebességgel kötődik az aktív helyhez, majd izomerizálódik a gauche állapotba, s megtörténik a hidrolízis. Mg<sup>2+</sup> jelenlétében a kötés lassabban jön létre, és az izomerizáció csekélyebb mértékű. A kémiai lépés sebességét *quench-flow* és *stopped-flow* kísérletekben is harmadának mértük Mg<sup>2+</sup> hiányában, mint a kation jelenlétében, s a Mg<sup>2+</sup> a katalitikusan aktív konformációs állapot betöltöttségét, vagyis csak a hidrolízis valószínűségét növeli meg. Az enzim még a Mg<sup>2+</sup> pozitív elektrosztatikus hatását is képes mobilis arginin-oldalláncaival helyettesíteni, így a Mg<sup>2+</sup>-ionnak a katalízisben szinte kizárólag kinetikai egyenirányító szerepe van.

## E2 – *In silico* biológia

### E2-01

#### Fehérjehálózatok válságválaszai

Csermely P., Kovács, I., Mihalik Á., Nánási T., Palotai R., Szalay M.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

A sejtek működésének megértésében egyre nagyobb segítségünkre vannak a fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózatok (interaktomok), ahol a hálózat minden összeköttetési eleme a kapcsolatban álló két fehérje fizikai kölcsönhatását jelenti. Vizsgálataink során az élesztő interaktomjának 13 különféle stresszhelyzetben bekövetkező változásait elemeztük. Az élesztőinteraktom fehérjecsoportjait (moduljait) az általunk a közelmúltban kifejlesztett ModuLand eljáráscsalád segítségével határoztuk meg [http://www.linkgroup.hu/modules.php]. A 13 fajta stressz génexpresszióra gyakorolt átlagolt hatását a fehérjeszintekre modellezve azt az eredményt kaptuk, hogy adott fehérje interaktom-moduljainak átfedése csökken, azaz az élesztő-sejt szerkezete a stressz bevezető fázisa során dezintegrálódik. A szélsőségesen erős stressznek a sejt interaktomjára gyakorolt hatását a humán sejtek apoptózisa során elhasított, mintegy 420 különböző kaszpázszubsztrát hálózatromboló hatásának elemzésével vizsgáltuk. A kaszpáz enzim szubsztrátjainak elhasítása után az interaktom moduljainak mind egymáshoz való kapcsolatai, mind belső szerkezete szétesik. Ez a hatás olyan erős hogy még egy neurális hálózat alapú algoritmus által optimalizált hálózatszétverésnél is jelentősebb eredményt ad. A hálózatok moduljainak a válság utáni „összeszerelése” alkalmat adhat arra, hogy a modulok kicsit másként kapcsolódjanak egymáshoz, mint a válság előtt. Ez a mechanizmus az adaptív és evolúciós változások egyik fontos eleme lehet. Emiatt is számottevő eredménynek tartjuk, hogy az élesztő interaktomszerkezetének a válság (stressz) utáni visszaalakulása során azon fehérjék, amelyek az élesztőben ismert módon [Levy, Siegal (2008) *PLoS Biol.*, **6**: e264] az evolúciós változásokat elősegítő, kb. 300 „kapacitor” fehérjecsoport tagjai, a hálózatos szerkezet jellemzően centrális elemeivé válnak. Ez a viselkedés igen jó összhangban van azzal, amit a hálózatot a dezintegráció után újjászervező, általunk leírt „kreatív elemekről” [Csermely (2008) *TIBS*, **33**: 569-576] tudunk, melyek segíthetik az adott hálózatot a korábban nem tapasztalt krízisek utáni túlélésben, illetve az összetett rendszerek fejlődésének, túlélésének és evolúcióképességének irányításában.

### E2-02

#### Komplex hálózatok a molekuláris biológiai szabályozásban

Farkas I.

ELTE TTK, Biológiai Fizikai Tanszék, Budapest

Az előadás célja annak rövid bemutatása, hogy két szabályozási rendszerben az RNS-RNS-, illetve fehérje-fehérje-kölcsönhatások által felrajzolt hálózat szerkezete hogyan mutat rá az adott szabá-

lyozási rendszer eddig kevésbé vizsgált funkcióira, vagyis a – hálózati – szerkezetből hogyan következik a funkció. Az első hálózatban minden csúcspont egy emberi mikroRNS-t jelöl, és két csúcspont akkor áll összeköttetésben, ha a két mikroRNS közel ugyanazon mRNS-eket csendesíti. A hálózatos elemzés segítségével azt találtuk, hogy (1) a mikroRNS-ek jól elkülönülő csoportokban szabályoznak együtt; és (2) az együtt szabályozó csoportokon belül az egyes mikroRNS-ek a rájuk ható szabályozás alapján szétválaszthatóak esszenciálisnak és kevésbé esszenciálisnak („elbogarthatóbbnak”) jószolt mikroRNS-ekre. A második hálózat jelátviteli útvonalak fehérje-fehérje-kölcsönhatásait ábrázolja három szervezetben. A jelátviteli fehérjéket és kölcsönhatásaikat szakirodalmi kutatással gyűjtöttük részletesen dokumentált gyűjtési módszerrel. A kapott adatbázis a korábbiakhoz képest jóval pontosabban kezeli az útvonalak közötti átfedéseket és az útvonalakat összekötő (*cross-talk*) kölcsönhatásokat. A kapott pontosabb (hálózati) szerkezet a korábbiaknál pontosabb következtetéseket enged meg a funkcióról: gyógyszer-célpont fehérjék, valamint új *Notch*-útvonalfehérjék jóslását és kísérletes ellenőrzését.

### E2-03

#### A fehérjehálózatok vizsgálatának matematikai módszereiről

Grolmusz V., Iván G., Szabadka Z., Bánky D., Ördög R., Szabó V., Hubay T.

ELTE, Matematikai Intézet, Budapest; Uratim Kft., Budapest

Áttekintjük a fehérjehálózatok vizsgálatának néhány matematikai módszerét. A fehérjehálózatok gráfok, és a gráfok vizsgálatában a XX. században a magyar matematikusok élen jártak. A század végén a web-gráf és szociológiai gráfok mellett a fehérje-hálózatok felé irányult a figyelem. Ezek a nagy, konkrét, nem triviális struktúrát hordozó halmazok – több kihívás mellett – felvetnek kis méretben könnyen, nagy méretben viszont igen nehezen megválaszolható kérdéseket az előadásban olyan konkrét vonatkozásokra szorítkozunk, amelyek nem a hálózatok globális „filozófiai” tulajdonságait ragadják meg (pl. fokszámeloszlás, „kis világ”-jelenség), hanem konkrét biológiai kérdések megoldásában segíthetnek.

### E2-04

#### Rendszerbiológia és evolúció

Pál Cs.

MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A rendszerbiológia alapvető célkitűzése, hogy a meglévő adatok alapján a sejt egy funkcionálisan jól körülhatárolható genetikai alrendszerét (pl. anyagcsere vagy sejtciklus) megvizsgálva azonosítsa a résztvevő géneket és azok kapcsolatrendszerét, azaz hálózatát. A rekonstruált biológiai hálózat sajátosságait számítógépes modellek segítségével elemzi, majd az előrejelzéseket újabb kísérletek



révén teszteli. Hogyan hasznosíthatják az evolúciós kutatások a rendszerbiológia és genomika által kínált tudást és módszereket? Az evolúció iránya és sebessége különböző mutációk egyedi megjelenésétől és azok populációban való elterjedésétől egyaránt függ. Ezért alapvetően fontos képet kapnunk a lehetséges mutációk a hordozó élőlényre gyakorolt előnyös, hátrányos vagy éppen közömbös hatásairól. A probléma attól válik nehezzé, hogy a sejt biológiai hálózatai rendkívül összetettek, és így a legtöbb mutáció hatása függ mind a környezettől, mind más mutációk jelenlététől. A rendszerbiológiai modellek alapvető lehetőséget adnak arra, hogy ezt a kérdést úgy vizsgálhassuk, hogy figyelembe vesszük a molekuláris mechanizmusokat is, és akár meg is jósoljuk, milyen genetikai változások előnyösek egy adott új környezetben. Az előadás során a genomika egyik legérdekesebb problémáján (a kulcsfontosságú gének paradoxonának kérdésén) keresztül mutatjuk be a két tudományág összetett kapcsolatát.

#### **E2-05 Központi régiók szerepe a szegmentális duplikációk kialakulásában**

Symmons O., Váradi, A., Arányi T.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az utóbbi években a DNS-szekvenálási módszerek gyors fejlődésével egyre részletesebb betekintést nyerhettünk a humán genom szerkezetébe. Többek között nyilvánvalóvá vált, hogy DNS-állományunk közel 5-10%-át ún. szegmentális duplikációk (SD-k) teszik ki, melyek 1 kb hosszát meghaladó, >90% szekvenaciaazonosságot mutató régiók. E szakaszok hozzájárulhatnak kromoszómaátrendeződésekhez, illetve nem allélikus homológ rekombináció révén génkonverzióhoz és betegségekhez, azonban kialakulásukról kevés a rendelkezésünkre álló információ. A jelenleg elfogadott hipotézis szerint a SD-k megsokszorozódásában fontos szerepe van ún. központi (*core*) régióknak, amelyek inherensen instabilak. Ebből adódik duplikációs hajlamuk, ami a környező régiók duplikációját is előidézi. Munkánk során egy már ismert központi régió, az LCR16a, részletes analízisét végeztük el. Az LCR16a a humán 16-os kromoszóma szegmentális duplikációinak központi régiója, és két emberi betegséggén részleges duplikációjában is szerepet játszott. Vizsgálataink alapján LCR16a elemek valószínűleg már a majmok (*Anthropoidea*) közös őséiben is jelen voltak. A gibbon LCR16a elemek, valamint a velük társított duplikációk elemzése alapján pedig feltételezhető, hogy az LCR16a más fajban is elősegítette a környező régiók duplikációját, ott is betölti a központi

régió szerepét. Az emberi kópiák genom elrendeződése és filogenetikus rokonsága arra utal, hogy legalább két különböző duplikálódási mechanizmus játszott szerepet kialakulásukban. Ugyanakkor az ősi LCR16a elem rekonstrukciója azt mutatta, hogy az LCR16a nem osztható további funkcionális egységekre duplikáció szempontjából, hanem annak teljes hossza megkettőződött, azaz a duplikációra való hajlamot feltételezhetőleg az LCR16a teljes hossza biztosítja.

#### **E2-06 A *Mycobacterium tuberculosis* proteomjának bioinformatikai analízise**

Mészáros B., Tóth J., Vértessy G. B., Simon I., Dosztányi Zs.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A *Mycobacterium tuberculosis* baktérium (MTB) által okozott TBC mind a mai napig az egyik legtöbb, körülbelül évi 2 millió halálos áldozatot követelő fertőző betegség. Emellett a WHO jelentései szerint körülbelül a föld lakosságának egyharmada – 2 milliárd ember – fertőzött, bár ezen populáció 90%-a élete végéig tünetmentes marad. Az MTB az egyik legrégebbi humán patogén, így a humán sejttel való kölcsönhatása nagyon szoros és specializált. Erre utal azon képessége, hogy rendkívül hosszú ideig, akár évtizedekig is lappangó állapotban együtt él a humán tüdőmakrofággal, az aktív TBC-fertőzések 50%-os mortalitása mellett. Továbbá emellett szól az is, hogy az MTB a gazdasejt nélkül, táptalajon csak igen nehezen tenyészthető. Egyedi fehérje szintű vizsgálatok során többször is felmerült, hogy a szoros együttélés során az MTB több fehérjét, illetve fehérjedomént „lemásolt” a humán fehérjék közül, ezzel adaptálódva a gazdasejthez. Jelen munkánk során az MTB proteomját vizsgáltuk az általunk kifejlesztett különböző rendezetlen fehérjéket és azok kötőhelyeit kimutató predikciós, illetve egyéb bioinformatikai módszerekkel. Azonosítani tudtunk olyan, az MTB-ben lévő fehérjéket és fehérjecsaládokat, melyek nyilvánvaló eukarióta rokonságot mutatnak, és az MTB-t megkülönböztetik az egyéb prokariótáktól. Ilyen fehérjék alkotják az MTB-ben a 11-tagú pkn, illetve a 146-tagú PE és PPE fehérjecsaládokat, amelyek érdekes módon implikálhatók a gazda és patogén közötti kölcsönhatásokban. Emellett a bioinformatika segítségével megmutattuk azt is, hogy az MTB nemcsak egyszerűen fehérjéket „tanult el” az eukariótáktól, de sokat átvett a tipikusan eukariótákra jellemző szabályzási és egyéb molekuláris mechanizmusokból is.

## E3 – Fehérjégek

### E3-01

#### **Mentsük, ami menthető! DNS helikázok és polimerázok szerepe a DNS-hibánál elakadt replikáció folytatásában**

Haracska L., Blastyák A., Hajdú I., Unk I., Pintér L.  
MTA SzBK, Genetikai Intézet, Szeged

Környezetünkben jelenlévő és metabolikusan keletkező reaktív ágensek folyamatosan károsítják a DNS-t. DNS-hibákhoz érve a replikációs villa gyakran megakad, mivel a DNS-szintézist végző nagy pontosságú DNS polimeráz számos DNS-hibát nem képes átírni. Befejezetlen DNS-szintézis a sejt halálához vezetne, ezért az evolúció során különböző mechanizmusok fejlődtek ki, melyek biztosítják a replikáció folytatását a károsodott bázison keresztül. Egyrészt specializálódott DNS polimerázok képesek a sérült bázissal szemben is DNS-szintézisre, mely hibamentes vagy mutációkat okozó lehet, attól függően, hogy a megfelelő komplementer vagy hibás bázis kerül beépítésre a károsodott szakaszal szemben. Másik lehetőség, hogy a DNS-szintézis a legközelebbi replikációs origótól indul újra, így az újraszintetizálódott DNS-szálon rés alakul ki a sérült bázissal szemben. A rés később hibamentesen betöltődhet rekombinációs vagy nem rekombinációs utakon, melyekben számos DNS transzlokáz és helikáz is szerepet játszik. Egy genetikai eredetű fényérzékenység-betegség (*xeroderma pigmentosum*) variáns (XP-V) formájáért például a DNS polimeráz  $\epsilon$  enzimét érintő mutációk a felelősek. A polimeráz  $\epsilon$  az UV-fény károsította DNS hibamentes átírására specializálódott, és hiányában a mutációt generáló átírási mechanizmusok végső soron karcinogenezishez és bőrrák kialakulásához vezetnek. Kutatási projektjeink a károsított DNS replikációjában szerepet játszó speciális DNS polimeráz, transzlokáz, helikáz enzimekre és új szereplőkre azonosítására irányulnak. Számos közülük a genom stabilitásának biztosításában kulcsfontosságú, és tumorsuppresszorként funkcionál. Jellemzésükkel célunk, hogy közelebb kerüljünk a károsított DNS replikációjának, így a mutagenézis és karcinogenezis molekuláris folyamatainak megértéséhez.

### E3-02

#### **Az alloszterikus aktiváció szerepe a motorenzimek működésében**

Málnási-Csizmadia A.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A motorenzimek általános működési sémáját a Lymn-Taylor-modell írja le. Ez a modell egy négy-ütemű, szekvenciális működésű motorként jellemzi az aktomiozint, amelyben az ATP megkötődésekor az aktin leválik a miozinnal, az ATP hidrolízisekor felhúzódik a miozin erőkarja, majd az aktinhoz történő visszakötődés után megtörténik az erőkar lecsapása, a munkaütem. Valóban tud így működni egy molekuláris motor? Számos kérdés merül fel, ha a modellt összevetjük a kísérleti eredményekkel: Mi az oka, hogy az aktin visszakötődik a

miozinhoz a munkaütem előtt? Mi hajtja a ciklust? Mi az oka illetve a szerepe annak a szembetűnő jelenségnek, hogy az aktin több nagyságrenddel gyorsítja a miozin ATPáz aktivitását? Többek között ezekre az alapvető kérdésekre nem ad választ ez az általánosan elfogadott modell. Előadásomban bemutatom azokat a legújabb kísérleti eredményeket, amelyek kikényszerítenek egy olyan modellt, amely jól megvilágítja a különbséget a molekuláris illetve makroszkópikus méretű motorok működése között.

### E3-03

#### **Sejtláncok kialakulása: mechanikai kölcsönhatások által vezérelt sejtmozgás**

Czirók A.

ELTE TTK, Biológiai Fizika Tanszék, Budapest

A sejt-sejt-kapcsolatok mentén történő sejttáramlás számos fejlődésbiológiai és kóros folyamat során megfigyelhető. A jelenség egyik, általunk részletesen vizsgált példjaként az embrionális érhálózat kialakulása szolgál. A létrejövő sejtláncok vonzó migrációs célpontok, és a beáramló sejtek addig növelik a nyúlványok méretét, amíg az kapcsolódik más sejtcsoportokkal. Hipotézisünk szerint a mintázatképzés hátterében a sejtek mechanikai környezettől függő viselkedése áll, azaz a sejtmozgást a sejtláncok kifeszített sejt felszínének megváltozott mikromechanikai jellemzői irányítják. *In vitro* kísérletekkel megmutattuk, hogy a sejtláncok formálásában nélkülözhetetlen a miozin II, valamint bizonyos sejtek esetén a folyamat függ az aljzat merevségétől. A sejtláncokra jellemző mikromechanikai tulajdonságokat atomerő-mikroszkópiával (AFM) határoztuk meg, s a folyamat tanulmányozásához kidolgoztuk a polarizált, autonóm módon mozgó és kapcsolódó sejtek számítógépes modelljét. A többsejtes szimulációs modell révén próbáljuk megérteni, hogy a különféle sejtlevezérlő mechanizmusok (mechanotaxis, kemotaxis, valamint a környező extracelluláris mátrix átalakítása) hogyan járulnak hozzá a többsejtű mintázat molekuláris szintű kialakulásához.

### E3-04

#### **A humán Bloom-szindróma helikáz processzív transzlokációs mechanizmusa**

Gyimesi M., Sarlós, K., Kovács M.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A BLM humán RecQ-helikáz alapvető szerepet játszik a homológ rekombináción alapuló hibamentes DNS hibajavítási útvonalakban, melyekben transzlokációs és szálszétválasztási aktivitásai nélkülözhetetlenek. Annak ellenére, hogy a transzlokációs aktivitás elengedhetetlen az *in vivo* DNS-hibajavítási folyamatokban, és olyan komplex aktivitások alapjául szolgál, mint a szálszétválasztás és a nukleoprotein-szálak eltávolítása, mindmáig egyetlen humán DNS helikáz transzlokációs aktivitásának mechanizmusát sem írták le. Részletesen karakterizáltuk a BLM monomer formájának egyszálú

DNS mentén történő transzlokációs aktivitásának mechanizmusát. Kimutattuk, hogy a BLM alacsony ATP-kapcsoltsági aránnyal (1 ATP-fogyasztás/1 nukleotidnyi elmozdulás) és kötőpartnerek nélkül is rendkívül magas processzivitással ( $\geq 1000$  nukleotid elmozdulás a disszociációt megelőzően) halad az egyszálú DNS mentén. A transzlokáció során a BLM ATP-hidrolízis ciklusának sebesség-meghatározó lépése nem az ATP hidrolízise, hanem az ADP leválását megelőző izomerizációs lépés. Amennyiben a BLM a DNS 5'-végét eléri, onnan gyorsan disszociál, ezzel elkerülve az eredménytelen ATP-bontó ciklusok létrejöttét. Eredményeink tehát alátámasztanak egy egy irányban haladó, araszoló (*inchworm*) transzlokációs mechanizmust, mely alapvetően különbözik az eddig leírt helikázokétól.

### E3-05

#### A tropomiozin szerepe a kortikális aktinhálózatok szabályozásában

Bugyi B., M.-F. Carlier

Laboratory of Structural Enzymology and Biochemistry, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

A sejtmozgás során meghatározó szerepet játszanak a protrúziós és adheziós struktúrákat felépítő aktin-filamentum-rendszerek. A sejtmembrán közeli elágazó aktinhálózatot a gyors kicserélődési sebességgel (*turnover*) rendelkező lamellipodium alkotja, míg távolabb a lassabb folyamattal jellemezhető lamella található. Eddigi *in vivo* megfigyelések szerint a tropomiozin eltérő módon befolyásolja e két aktinhálózat sejtmozgásban betöltött szerepét, azonban a háttérben álló molekuláris mechanizmusok nem teljesen tisztázottak. Munkánk során a tropomiozin vázizom-izofорма hatásait vizsgáltuk a protrúziós aktin struktúrák kialakulására és tulajdonságaira. Ennek érdekében N-WASP proteinnel bevont gyöngyökön alapuló biomimetikus motilitástesztet alkalmaztunk. Vizsgálataink szerint a tropomiozin kompetitív módon gátolja az N-WASP-Arp2/3-komplex által létrehozott elágazások kialakítását, így módosul a gyöngyök mozgása. E hatás függött az N-WASP-molekulák gyöngyfelszíni távolságától. Kimutattuk továbbá, hogy a tropomiozin és az ADF antagonisztikus módon szabályozzák az elágazó aktinhálózat kiterjedését, és hogy a tropomiozin aktinhálózat való kötődését az elágazások disszociációja szabályozza. A tropomiozin hozzáadása az N-WASP-motilitástesztthez elegendő az *in vivo* megfigyelt, két, eltérő szerkezeti és dinamikai sajátságokkal

rendelkező filamentum-rendszer kialakításához.

### E3-06

#### A titin izoforma- és foszforilációs-változásai humán szívelégtelenségben

Borbély A.<sup>1</sup>, N. Hamdani<sup>2</sup>, J. van der Velden<sup>2</sup>, I. Falcao-Pires<sup>3</sup>, Édes I.<sup>1</sup>, Papp Z.<sup>1</sup>, G. J. M. Stienen<sup>2</sup>, W. J. Paulus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Kardiológiai Intézet, Debrecen;

<sup>2</sup> Laboratory for Physiology, ICaR-VU Amsterdam Netherlands; <sup>3</sup> Department of Physiology, University of Porto, Porto, Portugal

A szívelégtelenségben szenvedő betegek erősödő balkamrai falfeszüléséért az intersticiális fibrózis és a szívizomsejtek passzív feszülése okozza. Az óriás citoskeletális fehérje, a titin izoformaváltás és foszforiláció révén a szívizomsejt passzív feszülését megváltoztatja. Ismert, hogy a merevebb N2B titinizoforma emelkedő aránya, a titin és az N2B csökkenő foszforilációja növeli a szívizomsejtek passzív feszülését. Szívelégtelenségben (HF) és aortasztenózisban (AS) szenvedő betegek, és megőrzött szívfunkciójú egyének (CON) balkamrai biopsziáiból izolált szívizomsejteken erőméréseket hajtottunk végre, és a mintákban meghatároztuk a titin és izoformái expresszióját és foszforilációját. A biopsziákat szívkatéterezés során (44 HF, 3 CON), műtéti úton (25 AS, 4 CON) és explantált szívekből (4 HF, 8 CON) nyertük. A passzív feszülést izolált, permeabilizált szívizomsejteken 2,2  $\mu\text{m}$  szarkomerhosszon mértük. A titinizoformák expresszióját és foszforilációját gélelektroforézis, ProQ Diamond/SYPRO Ruby festési eljárásokkal vizsgáltuk, majd N2B/N2BA- és P-N2B/P-N2BA-arányként fejeztük ki. A HF-betegcsoportban mért szívizomsejt-feszülés ( $6,1 \pm 0,4 \text{ kN/m}^2$ ) magasabb volt, mint a CON ( $2,3 \pm 0,3 \text{ kN/m}^2$ ;  $p < 0,01$ ) vagy az AS ( $2,2 \pm 0,2 \text{ kN/m}^2$ ;  $p < 0,001$ ) csoportokban. Az izoformák összetétele eltérő volt a HF- (N2BA/ N2B= $0,73 \pm 0,06$ ) és a CON-csoport között (N2BA/ N2B= $0,39 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ), de nem különbözött a HF- és az AS-betegcsoportokban (N2BA/ N2B= $0,59 \pm 0,06$ ). A titin foszforilációja a HF- és AS-csoportban hasonló volt, de a merev N2B titinizoforma relatív foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb volt a HF- (P-N2BA/P-N2B= $0,77 \pm 0,05$ ), mint az AS-csoportban (P-N2BA/P-N2B= $0,54 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). A merev N2B izoforma hipofoszforilációja felelőssé tehető a szívelégtelen betegek szívizomsejtjeinek kórosan emelkedett passzív feszüléséért.



## E4 – Jelátviteli rendszerek

### E4-01 Jelátviteli folyamatok az autoimmun arthritis kialakulásában

Mócsai A.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A reumatoid arthritisz a népesség mintegy 1%-át érintő krónikus autoimmun ízületi gyulladásos megbetegedés. A betegség kialakulásában központi szerepet játszanak a különböző fagocitasejtek, köztük a neutrofil granulociták, a makrofágok és az oszteoklasztok. Ezen sejtek közös eredete elvileg feltételezhetően hasonló jelátviteli folyamatai elvi lehetőségét adják olyan fehérjék azonosításának, melyek egyszerre több sejtben vesznek részt az ízületi gyulladás létrejöttében. Génhiányos (*knockout*) egereken végzett kísérleteink célja ilyen, az autoimmun arthritisben központi szerepet játszó jelátviteli molekulák azonosítása volt. Különböző *knockout* egértörzsekben származó fagocitasejtekkel az elmúlt években kimutattuk, hogy az Src kinázok és a Syk tirozin kináz elengedhetetlen a neutrofil granulociták, a makrofágok és az oszteoklasztok számos *in vitro* funkciójához. Sikerteljesen kimutattunk, hogy az Src kinázok és a Syk közti molekuláris kapcsolatot két, a nyiroksejtek antigénreceptorainak jelátvivő oldalláncához hasonló molekula, a DAP12 és az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc közvetíti. Kimutattuk továbbá, hogy a fenti jelpálya aktiválódását a foszfolipáz C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) enzim továbbítja a sejt belseje felé. Ezen kísérleteink alapján egy új, számos fagocitasejtben egyidejűleg szerepet játszó jelpályát sikerült azonosítanunk. További kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a fenti jelpálya milyen mértékben játszik szerepet az autoimmun gyulladásos folyamatok kialakulásában *in vivo*. Megvizsgáltuk a reumatoid arthritisz egy transzgenikus egérmodelljének (a K/BxN szérumtranszfer arthritisnek) a lefolyását különböző egértörzsekben. Az Src kinázok, a Syk és a PLC $\gamma$ 2 elengedhetetlen az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásához és a kiváltott ízületi funkcióvesztéshez. Kísérleteink az autoimmun ízületi gyulladás új molekuláris mechanizmusait tárták fel, melyek a jövőben új terápiás beavatkozás támadáspontjai lehetnek.

### E4-02 Egy új Fas-indukált sejthalálforma jellemzése

Koncz G.<sup>1</sup>, Hancz A.<sup>1</sup>, A. O. Hueber<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Immunológiai Tanszék, Budapest;

<sup>2</sup> Institute of Signalling, Developmental Biology and Cancer Research, CNRS, Nice, France

Az elmúlt néhány évben számos programozott, szabályozottan végbemenő, de nem apoptotikus sejthalálforma vált ismertté. Többek közt a sejthalálreceptorokról (köztük a Fas receptorról) is bizonyították, hogy képesek nekrozist indukálni, amennyiben az apoptotikus útvonalak gátoltak. A citotoxikus T-sejtek aktiváció hatására FasL-ot tartalmazó vezikulumokat szekretálnak. Ezen vezikulumok, az apoptotikus jelátvitel mesterséges gátlása nélkül is programozott nekro-

zist okoznak, szemben a klasszikus anti-Fas vagy rekombináns FasL által kiváltott apoptotikus sejthalállal. Deficiens sejtvonalak használatával bizonyítottuk, hogy ez a sejthalál útvonal a receptorral kölcsönható kinázoktól függő, és részlegesen független a Fas fehérjéhez kötődő haláldoméntől (FADD). A vezikulumindukált sejthalállal pusztuló sejteket fagocitáló makrofágok és dendritikus sejtek gyulladásos citokintermelése fokozódik, míg az apoptózis mint immunszuppresszív sejthalálforma ismert. Eredményeink alapján egy eddig még nem ismert Fas-indukált sejthalálútvonalat tudtunk azonosítani. Morfológiai, funkcionális és genetikai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a vezikulum indukálta stimulus nem apoptotikus sejthalált okoz, míg a Fas-jelátvitel apoptózist eredményez. A Fas-receptor közvetítette nekrozis számos gyulladásos autoimmun megbetegedésben szerepet játszhat, valamint további terápiás hasznát ígér az apoptózisrezisztens tumorok esetében is.

### E4-03 Terhesség és edzettség: izomvátozások a terhesség során az SMTNL1 szabályozásával

Lontay B.<sup>1</sup>, T. A. Haystead<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen;

<sup>2</sup> Duke University, Pharmacology and Cancer Biology, Durham, NC, USA

A smoothelin-szerű fehérje-1 (SMTNL1) a smoothelin fehérjékkel szekvenciahomológ, de – a fehérjecsalád többi tagjával ellentétben – nem rendelkezik aktinkötő sajátsággal. Az SMTNL1 sima-, szív- és vázizomban is expresszálódik, ahol a 2a típusú oxidatív izomrostok markere. Az *smtnl1*<sup>-/-</sup> egértörzsen végzett vizsgálatok alapján az SMTNL1 a vaszkuláris simaizomban és vázizomban az edzéshez való adaptációt közvetíti a miozin foszfatáz (MP) szabályozásán keresztül. A nőstény *smtnl1*<sup>-/-</sup> egerek a hímekhez képest nagyobb edzettséget mutatnak, és a nőstény egerekben az SMTNL1-expresszió ~50%-kal kisebb volt. A nemtől függő különbségek vizsgálatára az SMTNL1-expresszióját tanulmányoztuk a terhesség során *wt* és *smtnl1*<sup>-/-</sup> egerekben. Az SMTNL1 expressziója a terhesség középső trimeszterében négyszeres növekedést mutatott a vázizomban, ami az SMTNL1 illetve a terhességet szabályozó szexhormonok kapcsolatára utalt. Terhesség során az ösztrogén- és progeszteronreceptorok expressziója valamint a 2b glikolitikus rostok száma és glikogéntartalma szignifikánsan megnőtt. A váz- és simaizom proteomvizsgálata is jelentős eltérést mutatott a glikolitikus enzimek javára. Ezen hatások minden esetben kifejezettebbek voltak az *smtnl1*<sup>-/-</sup> egerekben. Az SMTNL1 és PR kölcsönhatnak egymással és az SMTNL1 koncentrációfüggő módon gátolja a PR transzkripció aktivitását. Hipotézisünk szerint az SMTNL1 a citoszkeletonban a MP aktivitását szabályozza, de ha PKA/PKG vagy  $\beta$ -adrenerg agonisták által kiváltott jelátviteli folyamatok során foszforilálódik (Ser301), a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagban a szteroidreceptorok,

a miozinnelzáró-izofomák és a glikolitikus enzimek átíródását kofaktorként szabályozhatja. Az SMTNL1 tehát a sima- és vázizom terheességhez való adaptációját szabályozó fehérje.

#### E4-04

##### **A miofibroblasztok új extracelluláris-mátrix-képző mechanizmusa**

Péterfi Z.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A fejlett országokban az összhálózás körülbelül 45%-át valamilyen fibrotikus szervváltozás okozza. A gyakori előfordulás, valamint a specifikus antifibrotikus terápiák hiánya miatt a terület jelenleg intenzív kutatások középpontjában áll. Ismert, hogy a fibrogenézis kulcsszereplői a miofibroblasztok, melyek kontraktilitásuk és extracelluláris-mátrix-képzésük által vesznek részt a folyamatban. Sejtkultúra-modellünkben tüdő- és bőrfibroblasztokból TGF- $\beta$ 1-kezeléssel indukáltuk kialakulásukat. Az átalakulás során NOX4-dependens H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-termelést tapasztaltunk, mely összhangban áll más fibroblasztokból származó adatokkal. Kísérleti modellünkben először jellemeztük az eddig ismeretlen funkciójú humán peroxidáz, a peroxidázint. A peroxidáz a peroxidázok családjába tartozik, melynek legkevésbé tanulmányozott tagja. A peroxidázok működésük során hidrogénperoxidot használnak fel, fontos szerepet játszva például a pajzsmirigy hormonszintézisében és az antimikrobiális védekezésben. A peroxidázról bizonyítottuk, hogy peroxidázdoménje enzimatikusan aktív. Számos szervben detektáltuk ezt az extracelluláris mátrixra jellemző motívumokkal is rendelkező molekulát. Expressziója jelentősen fokozódik TGF- $\beta$ 1 indukálta fibroblaszt-miofibroblaszt-átalakulás során. Intracellulárisan a protein az endoplazmás retikulumban helyezkedik el, azonban a miofibroblasztok szekretálják is a peroxidázint, amely az extracelluláris mátrixban hálózatos struktúrát alkotva kolokalizálódik más extracelluláris-mátrix-fehérjékkel. A fehérje peroxidázaktivitására nincs szükség ahhoz, hogy szekrécióra kerüljön. Egerekben, egyoldali ureterobstrukcióval kiváltott vesefibrózis során nő a protein expressziója. A fibrotikus vesében peritubulárisan detektáltuk a peroxidázint. Eredményeink szerint a peroxidázszekréció az extracelluláris mátrix képződésének eddig fel nem ismert módja, ami ezáltal jelentős szerepet tölthet be a különböző fibrogenézissel járó folyamatokban.

#### E4-05

##### **ERK1/2 cascade is a major regulator of the expression of human ABCC6 gene**

H. de Boussac, Koblos G., Buday L., Váradai A., Arányi T.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Mutations in the ABCC6 gene, a member of the ABC gene family, are responsible for the heritable connective tissue calcification disorder *Pseudoxanthoma elasticum*

(PXE). ABCC6 is highly expressed in the liver and at a lower level in the kidneys and the intestine. Interestingly, clinical symptoms of the disease appear in tissues where ABCC6 is not expressed, and PXE is, therefore, considered as a metabolic disorder. We are currently investigating the transcriptional regulation of this gene in the human hepatoma HepG2 cell line by quantitative RT-PCR. We demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF), which regulates various pathways, inhibits the expression of ABCC6. Next we deciphered which pathways are involved in ABCC6 regulation. Therefore, we used different activators (insulin, phorbol myristate acetate (PMA) and EGF) and inhibitors (LY294002, bisindolylmaleimide (BIM) and UO126) of the pathways downstream of HGF. Co-treatments with insulin and LY294002 did not show any involvement of PI 3-kinase in the regulation of ABCC6. Interestingly activation of PKC by PMA inhibits ABCC6 while BIM did not abolish this effect, suggesting that the PKC is involved in the regulation of ABCC6 via the activation of Raf. This hypothesis was experimentally confirmed by the complete abolishment of both HGF and EGF effect by UO126, emphasizing the involvement of the ERK1/2 pathway in the regulation of ABCC6. Similar results were obtained with URG7 a truncated transcript of ABCC6 (sharing the same promoter), suggesting that the effects act at the transcriptional level. These data represent the first account to describe a physiological regulator of the ABCC6 expression.

#### E4-06

##### **A kalmodulin effektor komplexeinek kölcsönhatása szfingolipidmicellákkal: a Ca<sup>2+</sup>-jelátvitel új aspektusai**

Tóth J., Kovács E., Vértessy G. B., Liliom K  
MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A kalmodulin fontos és univerzális jelátviteli szabályozó, amely számos célfehérjével alkot nem kovalens komplexet. A Ca<sup>2+</sup> kötésére bekövetkező nagy konformációs változás a kalmodulin egyéb fehérjékkel való kölcsönhatásait jelentősen befolyásolja, ez Ca<sup>2+</sup>-függő szabályozásának alapja. A Ca<sup>2+</sup>-ionokon kívül eddig nem volt ismert olyan másodlagos hírvivő, amely közvetlenül szabályozni képes a kalmodulin működését. Korábban kimutattuk, hogy a szfingozilfoszforilkolin (SPC) specifikusan kötődik a kalmodulinhoz, és *in vitro* gátolja annak aktivitását, így a Ca<sup>2+</sup>-szenzor szabályozására kínálunk egy lipidmediátoron keresztül ható új mechanizmust. Jelen esetben az SPC-kalmodulin és egy célfehérjéből származó peptid-kalmodulin-komplex asszociációjának és disszociációjának mechanizmusát vizsgáltuk egyensúlyi és tranzienst kinetikai kísérletekkel telítési Ca<sup>2+</sup>-koncentrációnál. Az SPC-micella a kalmodulinon azonos kötőhelyért verseng a kalmodulin fehérje kötőpartnerével, és azokat képes leszorítani a kalmodulinról. Mind a lipid, mind pedig a célfehérje peptidjének kalmodulin-kötésekor megfigyeltünk egy gyors, másodrendű folyamatot, amelyet egy lassabb konformációs változás követ. Utóbbi valószínűleg a kalmodulin két doménjének bezáródását jellemzi

a peptiddel képzett komplex esetén, a micellával való kölcsönhatásra azonban többféle elrendezés is elképzelhető. A vizsgált koncentrációtartományban a kalmodulin–lipidmicella és a kalmodulin–peptid 1:1 sztöchiometriájú komplexet képez, amelyek nM-os disszociációs állandóval jellemezhetők. *In vitro* eredményeink alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, miszerint SPC hatására intracelluláris  $Ca^{2+}$  szabadul fel. Mindez arra utal, hogy az SPC a  $Ca^{2+}$  jelátvitelében gátló szerepet játszó kalmodulinkomplexek felbontásával lehet képes a  $Ca^{2+}$  mobilizálására.

#### E4-07

**Humán transzformált sejt vonal érzékenyítése timidilát metabolizmusban a dUTPáz enzim RNS-interferenciával történő géncsendesítése révén stabil sejt vonalakban: a sejt választ a timidilát metabolizmus enzimeinek kommunikációs hálózata határozza meg**

Merényi G.<sup>1</sup>, Kovari J.<sup>1</sup>, Erdei A.<sup>2</sup>, Tóth J.<sup>1</sup>, Takács E.<sup>1</sup>, Vértessy G. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> ELTE TTK, Immunológiai Tanszék, Budapest

A dUTPáz kardinális szerepe a timidilát metabolizmusban abban rejlik, hogy a deoxipirimidinszintézis során keletkező dUTP-t specifikus módon bontja, és a keletkező dUMP terméket szolgáltatja a timidilát metabolizmus központi enzime, a timidilát szintáz számára. Így a dUTPáz nélkülözhetetlen enzime a dTTP *de novo* bioszintézisének. A dUTPáz második, nem kevésbé fontos fiziológiai szerepe, hogy aktivitása révén csökkenti az intracelluláris

dUTP-készletet, kialakítva egy stabilan alacsony intracelluláris dUTP/dTTP-arányt. Ezen funkciójával preventív módon megakadályozza a dUTP hibás beépülését a szintetizálódó DNS-molekulába. A dUTPáz enzim *in vivo* RNS-interferenciával történő csendesítése részleteiben eddig még nem ismert apoptotikus útvonalon keresztül, az ún. timidilát sejt halál következtében sejt halált okozhat. Munkánk során egy regulálható RNS-interferenciás rendszert alkalmazva, hatékony módon csendesítettük az endogén dUTPáz génkifejeződést HeLa sejtekben. Az enzim csendesítése révén létrejött dUTPáz-metabolikus funkcióhiány egyértelmű génexpressziós változásokat indukált a timidilát metabolizmusban lényegi szerepet betöltő enzimek esetében. Kvantitatív mRNS-szint meghatározással kimutattuk, hogy az érintett sejt vonalakban a timidilát kináz expressziója majd három és félszeresére, míg a timidin kinázé kétszeresére emelkedett. A géncsendesített sejt vonalnak a timidilát- és a nukleinsav-metabolizmust károsító fluoropirimidines (5-FU, 5-FdUR) kezelésre adott növekedési válasza jelentős mértékben eltért a kontrolltól. Ennek oka a dUTPáz szerepének kiesése, illetve a fluoropirimidinek aktív metabolitjának, az FdUTP-nek jelentősebb mértékű beépülése lehet a DNS-be. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a dUTPáz szubsztrátjaként kezeli a DNS-molekulákat károsító FdUTP metabolitot. Így a sejtek fluoropirimidinre mutatott toleranciaszintje egyértelműen összefügg az endogén dUTPáz enzim kifejeződésének mértékével.

## E5 – Szerkezeti biológia és képzőművészet – Structural Biology and Art (session held in English)

**Organizer:** László Gráf

**Participants:**

John. Markley (*University of Wisconsin, USA*)  
**Son et lumière from protein NMR spectroscopy**

Bob Lazarus (*Genentech Inc., USA*)  
**The art of biotechnology**

Gergely Katona (*University of Göteborg, Sweden*)  
**Movies of the nanoworld through the X-ray camera**

Diane Sheehan (*University of Wisconsin, USA*)  
**Structure, information, and intuition: the art and science of weaving**

László Gráf (*Eötvös Loránd University, Hungary*):  
**Protein dynamics by F. Hundertwasser and M. C. Escher**



## E6 – Makrolekuláris kölcsönhatások

### E6-01

#### **ANCHOR: a rendezetlen fehérjék fehérjekötő szegmenseit becsülő módszer**

Dosztányi Zs., Mészáros B., Simon I.  
MTA SzBK Enzimológiai Intézet, Budapest

A rendezetlen fehérjék fiziológiás körülmények között nem rendelkeznek időben állandó tényszerkezettel. Ennek ellenére nagyon fontos funkciókat ellátására képesek, elsősorban jelátviteli és szabályozási folyamatokban vesznek részt. Működésükhöz általában más makromolekulákhoz kötődnek, amelynek során részben vagy egészében rendeződhetnek. Speciális funkcionális képességük a nagymértékű flexibilitásból ered, amely lehetővé teszi, hogy viszonylag gyorsan, kis affinitással, de nagy specificitással kötődjenek, plaszticitásuk révén pedig képesek több partnerhez is kötődni. Ugyanakkor a rendezetlen fehérjék és kötőrégiók kísérletes vizsgálata sok nehézségbe ütközik, ezért tanulmányozásukban különleges fontos szerep jut az elméleti-bioinformatikai módszereknek. Olyan hiánypótló predikciós eljárást dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi rendezetlen fehérjékben lévő kötőhelyek azonosítását a szekvenciából. Ehhez a kötőrégiók alapvető tulajdonságát modelleztük egyszerű fizikai kép alapján. A módszer energiabecslő eljárás alapján olyan szakaszokat keres, amelyek önmagukban rendezetlenek, de globuláris fehérjéhez kötődve képessé válnak jól meghatározott szerkezet kialakítására. A programmal, melyet a világhálón is elérhetővé tettük [<http://anchor.enzim.hu>], tanulmányoztuk az aminosav-összetétel és a kialakított másodlagos szerkezet hatását a hatékonyságra, illetve összehasonlítottuk a rövid és hosszabb régiók kötődési mechanizmusát. A kidolgozott eljárás felhasználásával kimutattuk, hogy teljes genom szinten a szervezet fehérjei nagy számban tartalmaznak rendezetlen kötőrégiókat, és ezek száma a szervezet komplexitásával növekszik. Arányuk a rendezetlen régiókhoz képest is számottevően megemelkedik, ami új kötőrégiók kialakítására utal. Néhány biológiailag érdekes fehérje (pl. p53, p27, WASP) amellett, hogy rávilágít a rendezetlen kötőrégiók speciális tulajdonságaira, alátámasztja az ANCHOR módszer hatékonyságát is.

### E6-02

#### **Protein-protein kölcsönhatás gátlása a jeltovábbítási terápiában**

Kéri Gy.<sup>1</sup>, Órfi L.<sup>1</sup>, Waczek F.<sup>1</sup>, Németh G.<sup>1</sup>, Varga Z.<sup>1</sup>, Szokol B.<sup>1</sup>, Kurkó I.<sup>2</sup>, Péntes K.<sup>2</sup>, Borbély G.<sup>2</sup>, Vántus T.<sup>2</sup>, Peták I.<sup>2</sup>, A. Ullrich<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Vichem Chemie Kutató Kft.; <sup>2</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>3</sup> Department Molecular Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

A jeltovábbítási terápia a gyógyszerkutató egyik legfontosabb területe. A patológiás állapotok hátterében döntően jelátviteli rendellenességek állnak és napjainkban a gyógyszerkutatóban azonosí-

tott validált célmolekulák legnagyobb része jelátvitelben szerepet játszó enzim, elsősorban kináz. A racionális hatóanyagtervezés célja a különböző patológiás folyamatokért felelős jelátviteli enzimek vagy receptorok és kapcsolódó fehérjék gátlása. Az elmúlt évek során a racionális hatóanyagtervezés komplex eljárássá vált, amely a szerkezeti biológiát, patomechanizmus alapú célmolekula-kiválasztást és -validálást, molekula-modellezést, szerkezet-hatás összefüggés-elemzést, farmakofór alapú vegyületkiválasztást és a farmakológiai optimalizációt foglalja magában. Az általunk kifejlesztett *Nested Chemical Library*<sup>TM</sup> (NCL) technológia ligandum alapú tervezési eljárás, melynek során ismert vezérmolekulák köré fókuszált vegyülettárakat alakítunk ki, és ezeket különböző kináz enzimeken illetve protein-protein-kölcsönhatást vizsgáló rendszerekben teszteljük és farmakofór modellt generálunk. A kapott NCL molekulakönyvtár >12,000 molekulát tartalmaz, több száz alapváz köré épül, valamint egy ún. allosztérikus molekulakönyvtárra is kiterjed. A molekulakönyvtárat biokémiai kináztesztekben, protein-protein-kölcsönhatás gátlásokra vizsgáljuk, majd farmakodiagnosztikai jelölőkkel alátámasztott sejtes rendszerekben teszteljük sejtosztódásgátlásra és a programozott sejthalál indukciójára különböző tumorsejtvonalakon. Kinázinhibitor-alapú affinitás-kromatográfiás módszerünk (*KinaTor*<sup>TM</sup>) segítségével képet kaphatunk bizonyos érdekes inhibitoroknál a kölcsönható proteinmintázatról. A *KinaTor*<sup>TM</sup> technológia kivitelezése során kismolekulájú kinázinhibitor vegyületet speciális kapcsológensen (*linker*) keresztül mátrixhoz kötünk affinitáskromatográfia megvalósítása céljából, amelynek kiértékelése tandem tömegspektrometriai vizsgálatokra épülő proteomikai technológia segítségével történik.

### E6-03

#### **Komplementrendszer-gátlók kifejlesztése irányított evolúcióval**

Pál G.<sup>1</sup>, Kocsis A.<sup>2</sup>, Závodszy P.<sup>2</sup>, Gál P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest;

<sup>2</sup> MTA SzBK Enzimológiai Intézet, Budapest

A komplementrendszer szabályozatlan aktiválódása komoly betegségek (pl. Alzheimer-kór, szélütés, iszkémia-reperfüziós károsodás, reumatoid arthritisz) kialakulásához vagy súlyosbodásához vezethet. A komplement három aktivációs útvonala (klasszikus, alternatív és lektinút) eltérő mértékben vehet részt egy-egy kóros folyamatban, így diagnosztikus és terápia szempontból egyaránt nagy szükség lenne útvonalszelektív inhibitorokra. Mivel ilyenek nem ismertek, elhatároztuk, hogy létrehozzuk ezek első prototípusát. A mannózkötő lektinasszociált szerin proteaáz 2 (MASP-2) a lektinút kulcsenzime. Amint a szervezetbe jutó patogén jellegzetes felszíni glikánmintázatát egyes lektinek felismerik, az ezekhez kapcsolódó MASP-2 autoaktiválódik, és beindítja a komplementrendszert. Feltételeztük, hogy a MASP-2-szelektív gátlásával a lektinút

specifikusan és tökéletesen gátolható. MASP-2-inhibitorok tervezését nehezíti, hogy a szérumban számos hasonló szerin proteáz működik (lásd pl. komplement, véralvadás, fibrinolízis), így irányított evolúciós megközelítést, fágbemutatósi módszert alkalmaztunk. Ehhez a napraforgóból származó, legkisebb természetes tripszinhinhibitorból, a 14-aminosavas SFTI molekulából indultunk ki. Hat pozíció teljes randomizálásával tízmilliárd variánst tartalmazó könyvtárat hoztunk létre, és ezt MASP-1 és MASP-2 enzimeken szelektáltuk. A szelektált klónok konszenzusszekvenciái alapján két peptidet állítottunk elő. Ezek gátló hatását megmértük MASP-1 és MASP-2 enzimeken, a komplementaktiválódás három útján, és a véralvadás rendszerén. Az egyik peptid mind a MASP-1, mind a MASP-2 enzimet gátolja, szelektíven gátolja a lektinut, de a véralvadásra is hat. A másik peptid szelektív MASP-2-inhibitor, a lektinut szelektíven gátolja, és alig hat a véralvadásra. Kifejlesztettük tehát az első lektinútra szelektív inhibitorokat, amelyek mind alapvetési, mind diagnosztikai és terápiás szempontból ígéretesek. (G.P. és P.G. hozzájárulása egyenértékű volt.)

#### **E6-04 Transzkripció faktorok aktivációjának és kölcsönhatásainak modern mikroszkópiás vizsgálata**

Vámosi Gy.<sup>1</sup>, Brázda P.<sup>2</sup>, Szekeres T.<sup>2</sup>, Horváth A.<sup>1</sup>, Bravics B.<sup>2</sup>, Molnár G.<sup>1</sup>, Tóth K.<sup>3</sup>, Damjanovich S.<sup>1</sup>, Nagy L.<sup>2</sup>

*DE OEC<sup>1</sup> MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport; <sup>2</sup> Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; <sup>3</sup> Division of Biophysics of Macromolecules, DKFZ – German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*

A magreceptorok olyan transzkripció faktorok, amelyek ligandumfüggő módon képesek szabályozni célgénjeik átíródását. A molekuláris kapcsoló modell szerint a receptorok agonista hiányában a korepresszor komplex részeként kötődnek a DNS-hez. Agonista jelenlétében a korepresszor disszociál, helyére koaktivátor kötődik, megindítva a transzkripció eseménysorozatát a szabályozott génszakaszon. Célunk a receptorműködés kezdeti lépéseinek és dinamikájának vizsgálata biofizikai módszerekkel. A fluoreszcenciakorrelációs spektroszkópia (FCS) lehetővé teszi az egyedi élő sejtek szintjén a fluoreszcensen jelölt molekulák mobilitásának, így a szabad/kötött állapot vizsgálatát egyedi molekula érzékenységgel. A módszer alkalmazásával zöld fluoreszcens fehérjével jelölt reténsavreceptor (GFP-RAR), illetve heterodimerizációs partnere, a retinoid-X-receptor (GFP-RXR) diffúzióját mértük HeLa sejtekben. Az FCS technikával nyert diffúziós autokorrelációs függvényeket jól tudtuk illeszteni egy olyan modellel, amely egy gyorsan és egy lassan diffundáló komponens feltételez. A kezeltlen sejtekben az RAR-molekulák 70%-a gyorsan diffundál (RXR esetén ez a hányad mintegy 80%). A molekuláris kapcsoló modellel ellentétben tehát stimulálatlan sejtekben a receptoroknak csak ki-

sebb hányada van valamely lassan mozgó, nagy komplexben (mint például DNS-hez kötött regulátor komplex), nagyobb része szabadon mozog a sejtben. Agonista hatására a lassú komponens aránya ~15%-kal megnő, és ez az eltolódás még 24 óra elteltével is fennáll. A komponensek azonosítására elkészítettük az RAR kofaktorkötő és DNS-kötő mutánsait. FCS-méréseink arra utalnak, hogy a lassú komponens arányának megnövekedése elsősorban a koaktivátorkötő képességgel áll összefüggésben. A továbbiakban a receptor kölcsönhatásait a heterodimerizációs partnerrel és a kofaktorokkal kotranszfekciós fluoreszcencia-rezonancia-energia-transzfer (FRET) kísérletekben vizsgáljuk.

#### **E6-05 Az LC8 dinein-könnyűlánc foszforiláció általi szabályozásának három mechanizmusa**

Molnár T., Rapali P., Radnai L., Süveges D., Nyitrai L.

*ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest*

Az LC8 dinein könnyű lánc (DYNLL) konzervatív, homodimer szerkezetű eukarióta csomópontfehérje (*hub*), melynek kötődése révén sok (>60) különböző funkciójú fehérjét képes szabályozni. A partnerek a két alegység interakciós felszínénél található két, szimmetrikus árokba kötődnek hetáminosavas, laza konszenzusszekvenciájú motívumokkal. A DYNLL regulációjának ismert, korábban általunk is tanulmányozott módja a Ser88 oldallánc foszforilációja, mely a monomer-dimer egyensúly eltolódását okozza, ezáltal megszüntetve a kötőárkokat. Gyomorráksejtek proteomikai vizsgálatából kiderült, hogy a DYNLL Tyr65-oldallancán *in vivo* foszforilálódik. A Tyr65 a fehérje kötőárkának közepén található, H-hidak kialakítása révén fontos szerepet játszhat a DYNLL dimer szerkezetének stabilizálásában és egyes célfehérjék kötésében. A foszforilációért felelős kinázt nem ismerjük, ezért molekuláris mimikri (Tyr→Glu cseré) segítségével modelleztük a módosított fehérjét. CD-spektroszkópia és analitikai gélszűrés segítségével igazoltuk, hogy a mutáns fehérje szerkezetében nem következett be lényegi változás. A partnerek kötődését fluoreszcencia-anizotrópia és megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk. Eredményeink szerint a Tyr→Glu cseré nem változtatta meg jelentős mértékben a DYNLL monomer-dimer egyensúlyát, viszont a kötőárkokat érintő lokális szerkezeti és töltésbeli változások jelentősen gátolták a partnerek kötődését. A DYNLL-partner-interakció partner oldali foszforilációs szabályozását az p53-kötő protein-1 példáján vizsgáltuk, melyről ismert, hogy a DYNLL-kötő motívumában található Thr1171 *in vivo* foszforilálódhat. A kötőmotívumnak megfelelő szintetikus peptiddel ellentétben a foszfo-treonintartalmú peptid nem kötődött a DYNLL-hez. Összegzésként a DYNLL-partner-kölcsönhatások foszforilációs szabályozásának mindhárom ismert útvonala (Ser88, Tyr65, partner) az interakció gátolásához vezet. (OTKA NI68466 és K61784)

## E6-06

### Neurotranszmitter receptor-ioncsatornák gátlási és aktivációs mechanizmusa

Maksay G.<sup>1</sup>, B. Laube<sup>2</sup>, Kegl T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA KK, Biomolekuláris Kémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> Department of Neurobiochemistry, Max Planck Institute for Brain Research, Frankfurt, Germany

A neurotranszmitterek pentamer szerkezetű receptorcsaládjába tartozó receptorok a nikotinos acetilkolin-, 5-HT<sub>3</sub> szerotonin-, GABA-A- és glicinreceptor (GlyR). Pontmutációik és az alegységek között homológiamodellezés kötő üregeket tártak fel. Agonisták és antagonisták kötődésmódja eltérő [Maksay (2005) *Neurochem. Int.*, 46: 281-291], agonisták a kötő üreget bezárják. Konformációs hullám vezet az ioncsatorna kinyílásához. Az allosztérikus modulátorok – másik üregben kötődve – a neurális ingerületátvitel farmakológiai finomszabályozására alkalmasak. A glicin a gerincvelő legfontosabb gátló neuro-transzmittere. A GlyR pozitív allosztérikus modulációja fájdalomcsillapító és izomrelaxáns szerepet játszhatna, de ilyen gyógyszer nincs [Laube *et al.* (2002) *Trends*

*Pharmacol. Sci.*, 23: 519-527]. Lehetőséget kínál erre a tropeinek nagy affinitású, alegységszelektív kötődése a GlyR-okhoz [Maksay *et al.* (1999) *Neurochem.*, 73: 802-806; Maksay *et al.* (2004) *J. Med. Chem.*, 47: 6384-6391]. Békapetében transziensen expresszált humán  $\alpha 1$ -homopentamer GlyR-ok és egy tropein-szerkezetű modulátor, 3 $\alpha$ -(3'-metoxi-benzoiloxi)-nortropán (MBN) kölcsönhatását vizsgáltuk a glicin kiváltotta kloridáramokra [Maksay *et al.* (2009) *J. Neurochem.*, 109: 1725-1732]. Az agonista kötőüreg körül öt kötőhurok számos pontmutációja (N46C, F63A, N102A, R119K, R131A, E157C, K200A, Y202L és F207A) felszámolta az MBN gátló hatását a glicinaktivációra. Mások viszont (Q67A, R119A és S129A) mérsékeltek az MBN fokozó hatását a parciális agonista taurin kiváltotta aktivációra. Tehát az agonisták kötőüregében az MBN különböző kötődésmóddal gátolja és fokozza a GlyR ioncsatorna funkcióját. Az  $\alpha 1$  GlyR-homológiamodellezése és molekuláris dinamikai szimulációja azt tárta fel, hogy az MBN kétféle kötődésmóddal fejt ki hatását, a gátlás és potenciózás kísérleti adataival összhangban. (OTKA K62203)

## E7 – Humán betegségek molekuláris biológiája

### E7-01

#### A molekuláris szintű változások összekapcsolása kórképekkel - ABC transzporterek és öröklődő betegségek

Váradai A.<sup>1</sup>, Pomozi V.<sup>1</sup>, Fülöp K.<sup>1</sup>, Arányi T.<sup>1</sup>, Szabó P.<sup>2</sup>, J. Uitto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> MTA KKK, Budapest; <sup>3</sup> Department of Dermatology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA

Az emberi genomban található 48 ABC-fehérjét kódoló gén közül számos olyat ismerünk, amelyek mutációi öröklődő betegséget okoznak. A legtöbb ABC-fehérje a citoszolból vagy az extracelluláris térbe vagy valamelyik sejtorganellumba való transzportot végez, a betegség(ek) molekuláris alapja általában valamely metabolit transzportjának a hiánya. Az *ABCC6* gén mutációi a *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) nevű ritka, recesszív kötőszöveti betegséget okozzák, amely a bőrben, a szemben és az artériák falában lévő elasztikus rostok fragmentálódásával és meszesedésével jellemezhető. A PXE betegség molekuláris biológiai háttere, valamint az *ABCC6* fehérje fiziológiás szubsztrátja nem ismert. Elsőként klónoztuk és rovarsejtekben expresszáltuk az *ABCC6* fehérjét, valamint megállapítottuk, hogy képes organikus anionok ATP-függő transzportjára, és hogy az *ABCC6* gén egy nullalléja a koszorúér-betegség jelentős kockázati tényezője. A kutatás a  $\gamma$ -glutamil-karboxiláz (GGCX) kofaktorául szolgáló K-vitamin-metabolitokra irányult (az GGCX enzim Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjék poszt-szintetikus módosítását végzi, mely fehérjék közül néhány fontos szerepet játszik a lágyszövetek kalcifikálódásának szabályozásában). Hipotézisünk szerint az *ABCC6*

valamelyik K-vitamininformát a májból a keringésbe transzportálva biztosítja, hogy e fontos kofaktor a periférián rendelkezésre álljon. Kutatásunk célja, hogy azonosítsuk ezeket a vitaminmetabolitokat. Transzportbiokémiai, vad típusú és *Abcc6*<sup>-/-</sup> egereken elvégzett májperfúziós technikákat dolgoztunk ki, amelyeket HPLC-MS-analitikai módszerekkel kapcsoltunk. Eredményeink arra utalnak, a K3-vitamin májban keletkező glutationkonjugátuma szubsztrátja az *ABCC6* transzporternek, de ez a transzport magas K<sub>m</sub>-értékkel jellemezhető, kizárva annak fiziológiai jelentőségét. Számos további K-vitaminmetabolitot is vizsgálunk.

### E7-02

#### Hematológiai betegségek molekuláris diagnosztikája

Tordai A., Bors A., Meggyesi N., Andrikovics H. Országos Vérellátó Szolgálat, Budapest

A nukleinsav alapú diagnosztika a laboratóriumi diagnosztika egyik legdinamikusabban fejlődő területe két fő csoportra osztható: (1) örökletes és (2) szerzett nukleinsav-eltérések kimutatása. Az örökletes eltérések diagnosztikai célú kimutatásával lehetőség nyílt prenatális diagnosztikára (pl. haemophilák, RhD-vércsoport-inkompatibilitás) preszimptomatikus (predikciós) diagnosztikára (pl. hemokromatózis), illetve megelőző kezelésre (pl. mélyvénás trombózis). A szerzett nukleinsav-eltérések jelentősége az onkohematológia szakterületén kiemelkedő. A daganatos sejtklonra jellemző nukleinsav-eltérések nagy érzékenységgel kimutatása (1) hozzájárulhat a diagnózis megállapításához/pontosításához (pl. BCR-ABL krónikus mieloid leukémia (CML) kórképben, FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fúziós



gén krónikus eozinofil leukémiában, JAK2 V617F *polycythemia vera* kórképben); (2) befolyásolhatja a prognózist (FLT3/NPM mutációk akut mieloid leukémia (AML) esetén); vagy (3) módosíthatják az alkalmazott terápiát (PML-RARA fúziós gén AML-ben). A molekuláris módszerek más eljárásoknál nagyságrendekkel jobb érzékenysége lehetővé teszi a kezelés hatékonyságának nyomon követését, a minimális reziduális betegség kimutatását (BCR-ABL, PML-RARA fúziós gének mennyiségi kimutatása), ami a rezisztens betegek korai kiszűrését és terápiaváltást tesz lehetővé. Hematopoetikus őssejt-transzplantációt követően szintén molekuláris technikával (öröklődő polimorf markerek kimutatásával) végzik a vérképzésre jellemző donor-recipiens-arány meghatározását a beadott őssejtek megtapadását követően. A molekuláris diagnosztika sajátossága a technológiák gyors fejlődése, ami a módszerek folyamatos megújítását teszi szükségessé. Ennek egyik példája a nagyfelbontású olvadásponti (HRM) fluoreszcenciás mutációsűrésési mód, mely a referenciamódszerhez (Sanger-szekvenálás) képest gyorsabbá és érzékenyebbé teheti az újonnan megjelenő, imatinibrezisztenciát okozó mutációk kimutatását CML-ben.

#### E7-03

##### Nagykapacitású szekvenálással a daganatok okozó mutációk nyomában

Peták I.

SE, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A második generációs szekvenálási technológiák segítségével a DNS-szekvenálás költségei és időigénye töredékére csökkent. Nemzetközi erőfeszítések arra irányulnak, hogy legalább 1000 emberi daganatmintát teljes genom-szekvenálása történjen meg, és ezáltal teljes képet kapjunk a daganatokban előforduló összes mutációról. Az eddigi eredmények alapján már most elmondható, pár domináns génhiba (pl. *P53*, *KRAS*, *PIK3CA*) mellett több száz gén alacsony frekvenciájú mutációjának előfordulásával számolhatunk egy daganattípuson belül. A komplexitást azonban csökkenti, hogy ezek mutációk többségében mindig ugyanahhoz a 10-15 jelátviteli úthoz köthetők, és az egy jelátviteli úton elhelyezkedő gének mutációi egy daganaton belül kölcsönösen kizárják egymást. A kutatási célú felhasználás mellett a második generációs szekvenálás nagy valószínűség szerint a daganatok molekuláris patológiai diagnosztikájában is fontos szerephez jut, hiszen a molekulárisan célzott, jelátviteli utakra ható gyógyszerek prediktív farmakodiagnosztikájához egyre több beteg és egyre több génszakasz párhuzamos vizsgálatára lesz szükség. A technológia másik előnye, hogy ugyanazon génszakasz nagyszámú (több ezer) párhuzamos szekvenálása (az – egyebek között ritka mutációk detektálására alkalmazott – ún. „*ultra-deep*” szekvenálás) információt szolgáltat a daganat szöveten belül mutatkozó genetikai heterogenitásáról is.

#### E7-04

##### A kóros immunválasz molekuláris szintű feltérképezése

Rajnavölgyei É., Gogolák P., Szabó A., Gregus A.  
DE OEC, Immunológiai Intézet, Debrecen

A különböző szöveti sejtek és az egész szervezet behálózó immunrendszer folyamatosan elhaló és újraképződő sejtjei közötti molekuláris szintű kommunikáció alapvető fontosságú a szervezet egyensúlyának fenntartásában. A szöveti- és immunsejtek közötti közvetlen és oldott faktorok által biztosított sokrétű és különböző kimenetelű kölcsönhatásokat a környezeti ingerek hatására differenciálódó és aktiválódó sejtek irányított vándorlása és toborzása biztosítja. Ebben a folyamatban kiemelt szerepe van a szöveti környezetben bekövetkező változások molekuláris szintű érzékelésének, az együttesen ható jelek feldolgozásának és a megfelelő sejtválasz kiváltásának. E folyamatok koordinálásában jelentős szerepet játszanak a kis számban, de stratégiaileg fontos helyeken halmozódó dendritikus sejtek (DS), melyek a környezetükben megjelenő részecskék és oldott anyagok folyamatos felvételével, valamint a membránokban és a citoplazmában kifejeződő speciális érzékelő receptoraik segítségével gyűjtik és továbbítják az információt az immunrendszer végrehajtó sejtjei számára. Így ezek a ritka, funkcionálisan sokféle és rugalmas sejtek a természetes és a szerzett immunitás fontos szabályozói, és szerepük kiemelt az immunválasz összehangolásában, a kóros immunfolyamatok megelőzésében, de bizonyos immunológiai kórképek kialakulásában is. Az előadás célja a DS-ekben működő érzékelő rendszerek elvének, molekuláris szintű együttműködésének és a kiváltott reakciók sokféleségének összehasonlító bemutatása a kórokozók elleni immunválasz és egyes immunológiai kórképekben zajló folyamatok során. Példaként a hatékony vírusellenes immunválasz és a tumorokkal szemben kialakult tolerancia kiváltásában résztvevő mechanizmusok, valamint egyes autoimmun betegségek során kisiklott immunológiai folyamatok összehasonlító elemzését mutatjuk be.

#### E7-05

##### A normális és daganatos őssejtek aszimmetrikus osztódásának molekuláris szabályozása

Uher F.

Országos Vérellátó Szolgálat, Budapest

Őssejtek nevezünk minden olyan klonogén sejtet, amely önfenntartásra és egy vagy több differenciálódott sejt típus, illetve sejtfejlődési sor létrehozására képes. Az őssejtek – legalábbis populációs szinten – változatlan formában történő fenntartását és egyidejű differenciálódását aszimmetrikus sejtosztódás(ok) biztosítják. Az aszimmetrikus sejtosztódás(ok) szabályozásában – azaz a szöveti homeosztázis fenntartásában – meghatározó szerepet játszanak az őssejtek speciális mikro környezetéből, az ún. őssejt „*niche*”-ből érkező jel-

zések. A „niche”-t alkotó sejtek részben közvetlen, elsősorban a Notch rendszer által közvetített sejt-sejt-kölcsönhatások, részben az általuk termelt szolubilis és/vagy az extracelluláris mátrixhoz kötött morfogének (Wnt, Hedgehog, BMP-család), differenciálódási és növekedési faktorok (EGF, FGF, HGF, IGF), valamint egyéb szolubilis mediátorok segítségével befolyásolják – vagy inkább irányítják – az őssejtek sorsát. Ezeknek a jelzőanyagok rendszereknek a hibái súlyos zavarokat okozhatnak az őssejt-kompartiment(ek) működésében, ami különböző –elsősorban sejtpusztulással járó, degeneratív – betegségek kialakulásához (szklerózis multiplex, diabétesz?), fokozott öregedéshez (progeria?), illetve különféle daganattípusok képződéséhez vezethet. Előadásomban azt szeretném – példákmal is illusztrálva – bemutatni, hogy milyen összefüggés található egyes, ma már viszonylag jól ismert, „rendszerhibák” és a daganatok keletkezése között.

#### E7-06

##### **Cisztás fibrózist okozó mutáció hatásai a doménfeltekeredésre és domén-domén-kölcsönhatásokra a CFTR fehérjében**

Hegedűs T.<sup>1,2,3</sup>, A. W. R. Serohijos<sup>2,4</sup>, L. He<sup>2,3</sup>, A. Aleksandrov<sup>3,5</sup>, L. Cui<sup>2,3</sup>, N. V. Dokholyan<sup>2</sup>, J. R. Riordan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTA SE, Membránbiológiai Kutatócsoport, Budapest; <sup>2</sup> Department of Biochemistry and Biophysics, <sup>3</sup> Cystic Fibrosis Center, <sup>4</sup> Physics and Astronomy, <sup>5</sup> Department of Biomedical Engineering, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

A cisztás fibrózist, a kaukázusi populációban a leggyakoribb halálos öröklődő betegséget, a cisz-

tás fibrózis transzmembrán konduktanciaregulátor (CFTR) ABC fehérje génhibája okozza. A CFTR két transzmembrán doménből, két nukleotidkötő doménből és egy rendezetlen régióból épül fel. A kloridcsatornaként működő fehérje mutációi károsan befolyásolják a fehérje expresszióját és működését, aminek következtében a hámszövetek víz- és sóháztartása felborul. A betegek többségében jelenlevő, az N-terminális nukleotid-kötő doménben (NBD1) található delF508 mutáció az NBD1 hibás hajtogatódása és a megváltozott domén-domén-kölcsönhatások miatt a CFTR gyors lebontását okozza. Az NBD1 feltekeredésének tanulmányozása kísérletes módszerekkel nehéz, ezért diszkrét molekuláris dinamikát alkalmazva hajtogatódásszimulációkat hajtottunk végre annak érdekében, hogy a folyamatban felderítsük a delF508 mutáció által okozott változásokat. Olyan aminosavakat azonosítottunk, amelyek között a hajtogatódás során a kölcsönhatások a mutáns doménben a vad típusúhoz képest eltérőek. Ezek felismerése lehetővé teszi, hogy a feltekeredés helyreállítására specifikus aminosavakat célozzunk meg. Annak érdekében, hogy az F508 aminosavnak a domén-domén-kölcsönhatásokban betöltött szerepét vizsgálhassuk, elkészítettük a teljes hosszúságú CFTR fehérje homológiamodelljét, s segítségével megjósoltuk az F508 kölcsönhatásait más doménekben elhelyezkedő aminosavakkal. E kölcsönhatásokat cisztein nélküli CFTR-konstrukciót használva kereszt-kötéssel ellenőriztük. A feltárt domén-doménkapcsolódási felületek segítenek magyarázni a delF508 mutáció hatását a fehérje-összeszerelésére és -működésére. (NIH és North American Cystic Fibrosis Foundation)

## P – Poszterek

### P1 - Kémiai biológia

#### P1-01

##### **DNS-beli uracil tartalom detektálása kvantitatív PCR segítségével**

Horváth A., Vértessy G. B.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A DNS-ben kétféle úton jelenhet meg uracil: a DNS citozinjainak dezaminációjával, illetve a dTTP szintézis köztes terméke, a dUMP beépülésével. Előbbi eltávolításáért az uracil DNS glikozilázok felelősek, utóbbi megakadályozásáért a dUTPáz. Az élővilágban azonban előfordulnak olyan speciális esetek, amikor ezen enzimek működése gátolt, vagy a citozindezamináció enzimatikusan serkentődik, s a genom uraciltartalma emelkedik. Rákellenes kemoterápia hasonló hatást okozhat. A DNS-beli uraciltartalom kvantitatív mérése így több biológiai folyamat értelmezéséhez járul hozzá, és terápiás indikátor is lehet. A DNS uraciltartalmának kvantitatív elemzésére a leginkább elterjedt a tömegspektrometriás analízis, amely nem szolgáltat szekvenspecifikus információt. Az általunk kidolgozott kvantitatív PCR-teszt által azonban

az uracil aránya a használt primerpártól függően tetszőleges genomszakaszban is meghatározható. A legtöbb DNS polimeráz nem tesz különbséget a DNS uracil- és timinbázisai között. Az *Archea* DNS polimerázok azonban a templátban előforduló uracillal találkozáskor a szintézist nem folytatják, és a DNS-szálon kötődve maradnak, így felhasználhatók lehetnek uracil kimutatására PCR segítségével. Az uracilérzékeny kvantitatív PCR reakciókhoz a DNS-technológiákhoz gyakran használt *Pyrococcus furiosus* DNS polimeráza (pfu) használható. A vad típusú pfu enzimmel végzett reakció azon a templáton hatékony, amelyben a felszaporítandó szakaszra nem esik uracil. A kísérletekben a bevitt összes templátmennyiség meghatározható egy olyan pontmutáns pfu enzimmel, amely nem érzékeny a DNS uraciltartalmára. A vad típusú pfu enzimmel a reakció során az amplifikációs görbe eltolódik az uracilmentes templáthoz képest az uraciltartalomtól függő mértékben. Az eltolódásból kiszámítható a DNS uraciltartalma, amely eredmények az ismert uraciltartalmú minták esetében jó közelítéssel adták a várt értékeket.

## P1-02

### A dUTPáz, mint TBC gyógyszercélpont fajspecifikus szerkezeti elemeinek szerepe az enzimkatalízisben

Lopata A., Vértessy G. B., Tóth J.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz enzim a dUTP hidrolízisét katalizálja dUMP-vé és pirofoszfáttá, ezzel meghatározza a sejtbeli dUTP/dTTP-arányt. A tuberkulózis okozó *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) életben maradásához valószínűleg elengedhetetlen a dUTPáz működése, mivel a baktérium csak a dUTPáz aktivitását igénylő metabolikus útvonalon képes timint szintetizálni. Az enzim hiányában ún. timinmentes sejthalál lép fel, ezért a dUTPáz ígéretes gyógyszercélpont lehet a TBC ellen. Az MTB dUTPázának a katalízisben fontos szerepet játszó aminosavak feltérképezéséhez az enzim C-terminális karján több mutációt hoztunk létre. Az enzimek aktivitását radioaktív dUTP hidrolízissel és a reakcióban felszabaduló protonok pH-indikátoros követésével spektrofotométerben mértük meg. Az enzim-szubsztrát-komplex disszociációs állandóját cirkuláris dikroizmus és fluorimetriás titrálás segítségével határoztuk meg, utóbbit az enzimbe beépített triptofán aminosav tette lehetővé. A különböző mutánsoknál 3–3000-szeres aktivitáscsökkenést detektáltunk a vad típushoz képest. Érdekes módon a szubsztrát koordinálásáért felelős egy-egy H-kötés lehetőségének elvesztése már jelentős hatással volt a hidrolízis sebességére. A mutánsok enzim-szubsztrát-disszociációs állandói legfeljebb egy nagyságrendbeli növekedést mutattak a vad típushoz képest, tehát az enzim-szubsztrát-kötéserősség csökkenése nem olyan jelentős, mint a kinetikai változások. Az eredmények azt mutatják, hogy a dUTPáz enzim C-terminális karja alapvető szerepet játszik a dUTP hidrolízisében, illetve az itt elhelyezkedő, csak a mikobaktériumokra jellemző felszíni hurok szintén befolyásolja az enzimaktivitást. Mivel a hurok fajspecifikus és könnyen hozzáférhető szerkezeti elem, szelektíven gátlható lehet az egyébként szerkezeti homogén dUTPáz-családban. Ha gyógyszerjelölt kismolekula szelektíven kötődik az MTB C-terminális karjához, hatékony gyógyszert sikerül előállítanunk.

## P1-03

### A különböző alegységekhez tartozó konzervált motívumok kapcsolódása közreműködik a dUTPáz enzimek optimális katalitikus hatékonyságának kialakításában

Nagy G. N.<sup>1</sup>, Takács E.<sup>1</sup>, Lopata A.<sup>1</sup>, Leveles I.<sup>1</sup>, Harmat V.<sup>2</sup>, Tóth J.<sup>1</sup>, Vértessy G. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

<sup>2</sup>ELTE, MTA Fehérjemodellező Kutatócsoport, Budapest

A dUTPáz enzimcsalád mechanizmusa jórészt ismert, azonban a fémion kofaktor katalízisben betöltött szerepe még nem tisztázott. Saját és más csoportok által publikált korábbi kristályszerkezeti eredmények szerint a fiziológiának tekintett

Mg<sup>2+</sup>-kofaktor koordinálásában a szubsztrát dUTP három foszfátcsoportjának egy-egy oxigénatomja és három vízmolekula vesz részt. A vízmolekulák közül kettőt az enzim egyik szigorúan konzervált aszparaginsav-oldalláncának karboxilátcsoportja koordinálja. Munkánk során vad típusú és olyan pontmutált humán és mikobakteriális dUTPázokat hasonlítottunk össze, melyekben a fémion kötésben szerepet játszó vízmolekulákat koordináló Asp-oldalláncot Asn-re cseréltük, arra számítva, hogy a fémion kötése perturbálódik. A mutánsokat krisztallográfiai, kinetikai és ligandumkötési vizsgálatoknak vetettük alá. Az eredmények nem várt módon nem erősítették meg az Asp-oldallánc döntő hatását a fémion kötődésére. A mutáns fehérje 3D szerkezetében (PDB kód: 3H6D) a fémiont koordináló három vízmolekula nincs jelen magas betöltöttséggel. A szubsztrátanalóg ligandum három foszfátcsoportja ugyanolyan konformációjú, mint a vad típus esetén, és azonos módon koordinálja a Mg<sup>2+</sup>-iont. Így a Mg<sup>2+</sup> a szokásos aktívcentrumbeli pozícióban marad a mutáns fehérjében is. Ugyanakkor az Asp/Asn-mutáció a katalitikus sebességi állandó több nagyságrendű csökkenését okozta, és megnövelte a ligandum kötődésében jelentős szerepet játszó oldalláncok flexibilitását. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a homotrimer aktív centrumának kinetikailag kompetens konformációja alapvetően függ az alegységeken belüli és azok közötti, a szubsztrátot közvetlenül nem érintő kölcsönhatásoktól.

## P1-04

### Fényaktíválható azidovegyületek tervezése és szintézise gyógyszervegyületek interaktom-profiljának *in vitro* vizsgálatához

Pásztiné Gere E., Képiró M., Málnási-Csizmadia A.  
ELTE, Biokémiai Tanszék, Budapest

A gyógyszer-molekulák célfehérjékkel történő, különböző erősségű interakciója jelentős mértékben meghatározza a hatóanyagok hatás-mellékhatás-profilját. Gyógyszervegyületek kölcsönható fehérjepartnereinek azonosítása a vegyületek bioaktív-tási spektrumának feltérképezésében megbízható, a preklinikai gyógyszerfejlesztés korai stádiumában elvégezhető eszköz lehet, melynek segítségével lehetővé válik a potenciális mellékhatások prediktálása, a forgalomban lévő generikumok kevéssé kiaknázott biológiai hatásainak és nem ismert célpontjainak felismerése („*second medical use patent*”). Pszichofarmakonok *in silico* módszer alapján kiválasztott csoportját azidovegyületekkel módosítva a farmakofór régiók megtartásával a kismolekula fehérjeinteraktom-profilját vizsgáljuk, miközben a szerkezeti változásból eredő farmakológiai hatáseltérést multikorreálalt gyógyszerprofil-adatbázis (MCDP) alkalmazásával minimalizáljuk. Célkitűzéseink között szerepel a fenotiazin és a butirofenonvázas antipszichotikumok aromás gyűrűhöz kapcsolódó klorid szerkezeti egységének azidocsoporttal történő szubsztitúciója réz- és palládiumkatalizátor jelenlétében, illetve a primer hidroxilcsoportot tartalmazó neuroleptikumok

azidobenzoosavas észterezése a gyógyszer eredeti bioaktivitási spektrumának megőrzése mellett. Halogénezett aromás vegyületek réz(I)-katalizátor jelenlétében mikrohullámú reaktorban, redukív közegben végzett azidálása jód- és brómszármazékok esetében teljes mértékben végbement. A fotoaktív termékeket extrahálás és folyadékkromatográfiás elválasztást követően vizsgáltuk, az azidocsoport beépülését FTIR-mérésekkel ellenőriztük.

### P1-05

#### Racionális hatóanyag tervezés: GLP-1-receptor ligandumainak atomi szintű vizsgálata

Stráner P., Perczel A., Farkas V.  
ELTE TTK, Kémiai Intézet, Budapest

A glukagonszerű peptid-1 receptora (GLP-1R), mely a G-fehérje-receptorok B1-es családjába tartozik, N-terminális extracelluláris doménjéhez a GLP-1 és az exendin-4 peptid is képes kapcsolódni. Míg a GLP-1 a receptor természetes agonistája, addig az exendin-4 a *Heloderma suspectum* nyálából származó, nem természetes ligandum. Utóbbi erősebb kötődésre képes, feltételezhetően a C-terminálisán elhelyezkedő ún. Trp-kalitrát alkotó 9 aminosavnak köszönhetően, s az exendin-4 e motívumának szekvenciája alapján megalkották a Tc5b nevű minifehérjét. Kutatócsoportunk e fehérje D9E variánsának konformációanalízise során úgy találta, az ellenállóbb a hőmérséklet destabilizáló hatásának. Mindkét minifehérje helikális részében megvan 4 a receptorhoz való kötődésben fontos szerepet játszó 9 aminosavból. Jelen kutatásunk során az általunk tervezett TC5b\_D9E minifehérje N-terminálisát hosszabbítottuk meg a kötődésben szerepet játszó további 5 aminosavval. Célunk az volt, hogy ezen fehérjék konformációs tulajdonságainak feltérképezésével megértsük az agonista és antagonisták hatás konformációs hátterét. További célunk a GLP-1R és ligandumainak génexpressziós rendszer segítségével történő <sup>15</sup>N-jelölt mintáinak

előállítása, továbbá a kötődés atomi szintű vizsgálata. Ezen exendin-4-szerű peptidok és a GLP-1R extracelluláris doménjének kölcsönhatás-vizsgálata a receptor működésének mélyebb megértését segíti elő.

### P1-06

#### Foszfodiészteráz-fókuszált molekulakönyvtárak: tervezés, szelekció, biológiai értékelés

Tömöri T.<sup>1</sup>, Lőrincz Zs.<sup>1,2</sup>, Hajdú, I.<sup>1,2</sup>, Barna L.<sup>2</sup>, Dormán Gy.<sup>1</sup>, Cseh S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> TargetEx Kft., Budapest, Dunakeszi; <sup>2</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A ciklikus nukleotidok (cAMP és cGMP) szintjét a foszfodiészteráz enzimek (PDE) is szabályozzák. A PDE gátlása számos terápiás területen (pulmonáris, kardiovaszkuláris, CNS-betegségek) kedvező hatást eredményez, s ennek jelentőségét felismerve többszintű kutatási programot indítottunk el a PDE4B, PDE5A és PDE10A enzimekre fókuszálva. Közepes és nagy áteresztőképességű tesztet fejlesztettünk ki 96- és 384-lyukú tálca formátumban az említett altípusokra, majd a módszert ismert inhibitorokkal validáltuk, továbbá egyes PDE-specifikus fókuszált könyvtárak tervezését és szelekcióját hajtottuk végre kemoinformatikai módszerek (CADD) segítségével. A PDE célfehérjékre fókuszált könyvtárakat kétféle szelekciós módszerrel alakítottuk ki: először, ligandum alapú 2D hasonlósági keresést (JChem, ChemAxon) hajtottunk végre a rendelkezésre álló kereskedelmi adatbázisokban (megközelítőleg 107 vegyületen), ami előzetes gyűjteményt eredményez, majd a válogatást megfelelő szűrőkkel szűkítjük tovább gyógyszer és vezérmolekula jellegű csoportokra. A különböző 2D szelekciókat (1000-10000 molekula) tovább finomítjuk 3D dokkolási modellekkel (Gold, Cambridge CDC, UK) célvegyületre fókuszált könyvtárakat létrehozva, melyekből 100-200 vegyület megvásároltunk, és gátló hatásukat teszteljük a kifejlesztett *in vitro* szűrési eljárásokkal. (NFÜ KMOP 1.1.1.-07/1-2008-0029)

## P2 – In silico biológia

### P2-01

#### A foszfoprotein foszfatázok evolúciója *Drosophila*-fajokban

Ádám Cs.<sup>1</sup>, Miskei M.<sup>2</sup>, Dombrádi V.<sup>1</sup>  
DE <sup>1</sup> OEC Orvosi Vegytani Intézet; <sup>2</sup> AMTC-MTK, Kertészettudományi és Növényi Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A foszfoprotein foszfatázok (PPP) minden eukarióta szervezetben megtalálható, ősi és létfontosságú szabályozó enzimek. A *Drosophila melanogaster* genomjában 19 PPP katalitikus alegységet kódoló gént azonosítottak. 2007-ben 12 *Drosophilidae*-családba tartozó faj teljes genom-szekvenciáját közzétették, ami lehetőséget adott a PPP katalitikus alegységek evolúciójának vizsgálatára. *Drosophila melanogaster* fajban azonosítottunk hat intronmentes, hímspecifikus, új típusú foszfatázt (PpY, PpN, PpD5, PpD6, PP1-Y1, PP1-Y2), s adatbázis-kutatással igazoltuk, hogy mind a 12

*Drosophilidae*-fajban jelen vannak, más rovarfajban azonban nem. Ennek alapján a hímspecifikus enzimek körülbelül 40 millió évvel ezelőtt jöttek létre. Szekvenálási eredmények elemzése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a retrogének az ősi PP1-szerű katalitikus alegységekből származnak. Kivételt jelent a CG11597 gén terméke, ami a PP2A katalitikus alegységhez hasonló, csak a *melanogaster*-csoport fajaiban fordul elő, s ennek alapján megjelenése körülbelül 10 millió évvel ezelőttre tehető. Ráadásul öt olyan új foszfatázt kódoló gént is azonosítottunk (PPY-szerű, PpD5-szerű, PpD6-szerű, PP4-szerű és Pp6-szerű) melyek csak a nagyon ősi *Drosophila*-fajokban találhatóak meg. A PPP gének kromoszómális lokalizációjának elemzése során azt találtuk, hogy az ősi PpD6, PpD6-szerű, PP1-Y1, PP1-Y2 géncsoport szétesése előtt többször átrendeződött, majd a *melanogaster*-alcsoportban a PP1-Y1 és a PP1-Y2 az Y kromoszó-

mára transzlokálódott. *D. ananassae* fajan a *PpD6* gén az Y kromoszómára került, míg más fajokban a II. kromoszóma másik karjára helyeződött, amit a gének GC-tartalmának lecsökkenése követett. A *Drosophila*-fajok evolúciója során a PPP génkészlet génduplikációval, delécióval és retrovirális transzpozícióval dinamikusan változott. (OTKA 68754)

## P2-02

### Kismolekulás kombinatorikus molekula-könyvtárak dokkolása és kiértékelése kötési profil segítségével

Ángyán A

*ELTE, Számítógép-tudományi Tanszék, Budapest*

Az originális gyógyszerkutatásban az *in silico* módszerek egyre nagyobb teret kapnak a gyógyszerjelölt molekulák kiválasztásában és optimalizálásában. Amennyiben egy kismolekuláról bebizonyosodik, hogy kötődik adott célfehérjéhez, elkezdődhet a molekula szerkezeti optimalizálása hatékonyabb kötődés eléréséhez: ilyen eljárásokat és a kiértékelés megkönnyítésére kidolgozott kötési profilokat mutatunk be. *In silico* módszerekkel az alapvázhoz különböző funkciós csoportok kombinatorikus kapcsolásával több tízezer különböző szerves molekulát modelleztünk, a kötési helyeket saját dokkolóprogrammal meghatározva. Az így létrehozott kombinatorikus molekulakönyvtárak tagjai között található a kiindulási kismolekulánál jobb inhibitor vagy aktivátort. Az ilyen módon meghatározott fehérje-ligandum-komplexek tér szerkezeteiből kiszámoltuk az adott komplex részletes kötési profilját. A kötési profil azon aminosavak összessége, amelyeknek legalább egy atomja a ligandum atomjaival van der Waals távolságon belül helyezkednek el. Továbbá a szerkezet-hatás-összefüggéseket a kötési profilok különbözőségét számszerűsítő, egyszerű és specifikus távolságfüggvénytél térképeztük fel. A bemutatott eljárás többek között a gyógyszerjelölt molekulák optimalizálásában hatékonyan felhasználható, a molekulakönyvtárak elemeinek kötési tulajdonságai jellemezhetőek, így módon széles körű szerkezet-hatás-összefüggések vizsgálatára nyílik lehetőség.

## P2-03

### A Rho/Rac GTPáz-aktiváló fehérjék szöveti expressziós mintázatának *in silico* vizsgálata

Csépányi-Kömi R., Sáfár D., Ligeti E.

*SE, Élettani Intézet, Budapest*

A monomer (kis) G-fehérjék számos sejtfunkcióban résztvevő, fontos szabályozó proteinek. GTP-kötött formájuk aktív, GDP-t kötve inaktívvá válnak. Ezen két állapot közötti átmenet egyik szabályozója a GTPáz-aktiváló protein (GAP), mely serkenti a kis G-fehérjék GTP-hidrolízisét, ezáltal inaktíválja őket. Jelenleg mintegy hetven olyan GAP-domént tartalmazó fehérjét ismerünk, melyek a Rho-család kis G-fehérjéit (Rho, Rac, Cdc42) szabályozhatják. Ezek szöveti expressziójáról, működéséről, jelát-

viteli utakban betöltött helyéről/szerepéről kevés az ismeretünk. *In silico* módszerekkel vizsgáljuk a GAP-ok szöveti megoszlását és RNS-szinten jellemezzük a fehérvérsejtek, elsősorban a neutrofil granulociták (PMN) GAP-készletét. Irodalmi adatok alapján negyvenkét Rho/RacGAP-ot sikerült azonosítanunk. Az ezekre vonatkozó *microarray*-adatokat a GEODataSets adatbázisból nyertük [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>], a kísérleteket az *Affymetrix Human Genome U133A Array* felhasználásával értékeltük ki. Tizennégy különböző szövettípust, valamint PMN-t, makrofágot, B- és NK-sejteket vizsgáltunk meg. Ezekben az említett negyvenkét GAP RNS-expressziós szintje jelentős különbségeket mutatott. A legtöbb szövet- és sejt-típusról elmondható, hogy csak néhány (1-10) GAP mutatott magas expressziót. PMN-ben a GRAF, az OPHN1 és a KIAA0053 GAP-ok esetében találtunk kiemelkedő értékeket. Ezek mellett még hét GAP expressziós szintje volt jelentős. A szövetekben/sejtekben más-más GAP-ok végzik a kis G-fehérjék szabályozását, az egyes GAP-ok expressziós mintázatában vannak átfedések, de találunk szövet-, illetve sejtspecifikus GAP-okat is. További terveink között szerepel ezen szövet-/sejtspecifikus GAP-ok vizsgálata saját *microarray*-kísérletekben és RT-PCR segítségével.

## P2-04

### A SwissProt adatbázis sűrűség alapú klaszterezése

Iván G., Grolmusz V.

*ELTE Számítógéptudományi Tanszék, Budapest; Uratim Kft., Budapest*

A *SwissProt* aminosavszekvencia-adatbázis klaszterezésében alkalmazott módszerek többsége heurisztikákat használ a szekvenciaillesztésnél és/vagy egyedi kötési (*single-linkage*) típusú, illetve ún. mohó klaszterezőalgoritmusokat. Poszterünkön jelentősen eltérő megoldást mutatunk be: (1) pontos szekvenciaillesztést (a Smith-Waterman-algoritmus optimalizált változatával); és (2) klaszterezést a sűrűség alapú OPTICS klaszterezőalgoritmussal. Javasolunk továbbá egy eljárást, mellyel a szekvenciákhoz színek rendelhetők azok NCBI-taxonómiában elfoglalt helye alapján; a színek segítségével a kapott klaszterek fajokénti összetétele jól áttekinthető. A *SwissProt* 55.5 verziójában megtalálható 389046 szekvencia klaszterezése során kialakítottunk egy, a klaszterezés minőségének mérésére alkalmas mérőszámot, melynek segítségével az OPTICS által nyert klaszterezés minősége összevethető valamely referenciaklaszterezéssel. A meglévő, többnyire mohó megközelítésen és heurisztikákat tartalmazó szekvenciaillesztésen alapuló megoldásokkal összehasonlítva az általunk javasolt eljárás – a futási időt praktikus korlátokon belül tartva – precízebb alternatívát jelenthet nagy szekvenciaadatbázisok klaszterezésére.



## P2-05

### $\alpha$ -Aamiláz enzimek szubsztrátkötő zsebének elhelytérképezése molekuláris modellezéssel

Mótyán J. A.<sup>1</sup>, Gyémánt Gy.<sup>1</sup>, Bagossi P.<sup>2</sup>,  
Harangi J.<sup>1</sup>

DE<sup>1</sup> TEK TTK, Biokémiai Tanszék; <sup>2</sup> OEC,  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet,  
Debrecen

Az  $\alpha$ -amilázok vizsgálatát széles körű ipari alkalmazásuk és a humán eredetű enzimek diagnosztikai szerepe indokolja. Röntgendiffrakciós mérésekkel meghatározott 3D szerkezetek és kísérletes enzimkinetikai és termékmintázat-elemzési adatok lehetőséget biztosítanak a szerkezet-funkció-összefüggések vizsgálatására. Olyan számítógépes eljárás kidolgozását tűztük ki célul, amely segítségével vad típusú és mutáns  $\alpha$ -amiláz enzimek hasítási preferenciáját tudjuk magyarázni és jósolni. A számítógépes eljárás röntgenkristallográfiai vagy homológ modellezésű 3D szerkezeteken alapul, az egyes szubsztrátkötő helyeken az enzim-szubsztrát-kölcsönhatási energiát molekulamechanikai módszerrel számítva. A módszert olyan  $\alpha$ -amiláz (humán nyál, árpa) enzimeken kalibráltuk, melyeknek elhelytérképeit és hasítási frekvenciáit korábban a DE Biokémiai Tanszéken meghatározták. A modell tesztelésére további  $\alpha$ -amiláz enzimek elhelytérképeinek jóslását végeztük el. Árpa amiláz enzime esetében korábban még nem tanulmányozott aminosavak (V47, S48) mutációinak hatását kívántuk jósolni, meghatároztuk ezen enzimek kísérletes hasítási frekvenciáit, s kiszámítottuk az elhelytérképeket. A hasítási frekvenciák meghatározása 2-klór-4-nitrofenil-csoportot tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátsorozat segítségével történt, az elhelytérképek kötési energiáit a DE Biokémiai Tanszéken kifejlesztett SUMA (*SUBsite Mapping of  $\alpha$ -Amylases*) számítógépes programmal megállapítottuk. A röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetek vagy homológ modellek ismeretében a kidolgozott számítógépes eljárás felhasználható lehet a különböző  $\alpha$ -amilázok működésének gyors jóslására anélkül, hogy hosszadalmas és költséges

kísérletes folyamatban határoznánk meg a bontási képet és a szubsztrátkötő zseb alhelyeinek kötési energiáit.

## P2-06

### Decomp – PDB felbontás megbízhatóan

Ördög R., Iván G., Szabadka Z., Grolmusz V.  
ELTE, Matematikai Intézet, Budapest; Uratim Kft.,  
Budapest

A Decomp [<http://decomp.pitgroup.org>] protein adatbázisok (PDB) strukturális felbontására szolgáló eszköz, mely megbízhatóan választja szét a PDB-ben található különböző molekulákat, és megkísérli egyes hibatípusok javítását is. A *Protein Data Bank* elsődleges célja kezdetben a kristallográfiai cikkekhez tartozó adatállományok tárolása volt. A kísérleti adatokból származtatott PDB-adatfájlok tehát a cikkekkel egy időben kerültek megosztásra a különböző PDB-gyűjtő oldalakon [pl. <http://www.wwpdb.org>]. A letétbe helyezett struktúrák hiányosságai (például hiányzó atomok) többnyire csak a "megjegyzés" részben, sőt esetenként csak a cikkben szerepelnek. Tekintettel arra, hogy ezeknek nincsen kötött formátuma, ezért a PDB-k automatikus nagy áteresztő képességű feldolgozása nehézkes. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy a HET atomnak jelölt elemek sem feltétlenül jelentenek a fehérjéhez nem tartozó atomokat. Így például a fémes ionok és nem standard – módosult – aminosavak atomjai is HET atomként lehetnek jelölve, tehát egy HETATM bejegyzéseket tartalmazó PDB fájl sem feltétlenül tekinthető fehérje-ligandum-komplexnek. A Decomp segítségével a fehérje-ligandum-komplexek könnyen és megbízhatóan azonosíthatóak, majd annak részei külön PDB fájlba csoportosíthatóak. A hiányzó atomokat, aminosavakat és láncokat a program megjelöli, és hiányzó részláncok esetén is egy láncként azonosítja az összetartozó láncszakaszokat. A hiányzó atomoknál a megbízhatóbb szekvencia-információt használjuk – így nem okoznak hibát a láncbőve hiányzó atomok, melyek ugyan jelen vannak, de a nem sikerült pontosan meghatározni helyüket.

## P3 – Fehérjégek

### P3-01

#### Alfavírus proteázok specifitásának vizsgálata

Bozóki B., Bander P., Matúz K., Bagossi P.,  
Boross P. Tózsér J.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet,  
Debrecen

Az alfavírusok nem szerkezeti fehérjéi poliprotein formában transzlálódnak a vírusgenomról. A poliproteinen három alfavírus proteáz (nsP2pro) hasítási hely biztosítja a nem szerkezeti fehérjék létrejöttét, melyek alapvető szerepet töltenek be a vírus replikációs ciklusában. Ennek alapján az alfavírus proteázok potenciális antivirális célpontoknak tekinthetők, valamint rekombináns fúziós fehérjék processzáálásának eszközeként is szolgálhatnak. Kísérleteinkben ez utóbbit szem előtt tartva vizs-

gáltuk a Sindbis-vírus (SINV), a Semliki Forest vírus (SFV) és a venezuelai lóagyvelő-gyulladás-vírus (VEEV) nsP2 proteázainak (PR) tulajdonságait. Vizsgálataink során az egyes vírus-poliproteinek hasítási helyei alapján tervezett oligopeptid szerkezetű szubsztrátokat alkalmazva felmértük a proteázok szubsztrátspecifitását, beleértve a nem ugyanabból a vírusból származtatott enzimek és a hasítási helyeket modellező oligopeptidek közti keresztreakciókat, és összehasonlítottuk a hasítási reakciók hatékonyságát. A hasítás mértéke a VEEV PR esetén a SFV-1, a SFV PR esetén pedig a SFV-1 és a SFV-3 oligopeptideknél volt megfelelő az enzimkinetikai meghatározáshoz. A specifitási eredményeket molekuláris modellezés segítségével értelmeztük. A kinetikai eredményeket felhasználva összehasonlítottuk az alfavírus proteázok

katalitikus hatékonyságát a rekombináns fúziós fehérjék processzálására gyakorlatban alkalmazott potyvírus proteázok kinetikai paramétereivel is. Azt tapasztaltuk, hogy csak a VEEV PR mutatott számottevő keresztreakciós aktivitást, de az SFV PR saját szubsztrátjain aktívabbnak bizonyult. A proteázok gyengébb katalizátoroknak mutatkoztak a potyvírus proteázoknál, ezért valószínűleg nem nyújtanak előnyt a rekombináns fúziós fehérjék processzálására használt enzimekkel szemben, ám antivirális terápiák ígéretes célpontjai lehetnek.

### **P3-02** **A DNS-függő enzimaktiváció szerepe a RecQ helikáz működésében**

Sarlós K., Gyimesi M., Kovács M.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

Az élővilágban mindenütt előforduló RecQ-család helikázok esszenciális szerepet töltenek be a DNS kettős száltörések homológ rekombináció alapuló javításában. Az *Escherichia coli* RecQ helikáz a homológ rekombináció beindításában, az illegitim rekombináció megakadályozásában, valamint az elakadt replikációs villák stabilizálásában tölt be fontos szerepet. A RecQ helikáz funkciója számos szempontból részletesen kutatott, működési mechanizmusa viszont – a család más enzimeihez hasonlóan – jórészt ismeretlen. Munkánk során géntechnológiai, állandósult állapotú és transziens kinetikai, valamint fluoreszcenciaspektroszkópiai vizsgálatok során fényt derítettünk az *E. coli* RecQ helikáz DNS-függő ATPáz mechanizmusának alapvető sajátosságaira, és létrehoztuk az enzimciklus kvantitatív modelljét. A DNS-kötés nem befolyásolja a gyors és reverzibilis nukleotid- (ATP-, ADP-) kötést. A DNS-nek az enzimre gyakorolt allosztérikus hatása viszont döntő fontosságú az ATP-hidrolízisben, amely DNS-mentes állapotban csak rendkívül lassan megy végbe. Az enzimtermék (ADP és foszfát) komplex magas DNS-affinitása arra utal, hogy a hidrolízislépés a DNS-en való elmozduláshoz kapcsolt. A DNS-aktívált működési ciklus sebességmeghatározó lépése a foszfátfelszabadulás után, ADP-kötött állapotban végbemenő konformációváltozás. Az ATPáz aktivitását növeli az egyszálú DNS mentén történő transzlokáció. Méréseink alapján a RecQ helikáz az egyszálú DNS megkötését követően processzív transzlokációt végez a DNS-szál 5'-végéig, ahonnan gyorsan disszociál, elkerülve ezzel a „főlősleges” (transzlokációhoz nem kapcsolt) ATPáz ciklusokat. A munkánk során kirajzolódó részletes mechanikai és kinetikai modell közelebb visz minket a 2-es szupercsaládba tartozó helikáz enzimek genom-karbantartásban és -evolúcióban játszott szerepének megértéséhez.

### **P3-03** **A blebbistatin stabilizálja a miozin erőgenerálási lépésének kezdőállapotát**

Takács B.<sup>1</sup>, N Billington<sup>2</sup>, Gyimesi M.<sup>1</sup>, Kintsés B.<sup>1</sup>, Málnási-Csizmadia A.<sup>1</sup>, P. J. Knigjt<sup>2</sup>, Kovács M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest;

<sup>2</sup> Astbury Centre, University of Leeds, Leeds, UK

A sejtosztódás, az izomműködés és sok más biológiai mozgás alapja a miozin erőfejlesztő lépése, amely az aktinfilamentum mentén történő elmozduláshoz vezet. Az erőfejlesztés során a miozin erőkarja lecsapódik, és a miozin disztális része elcsúszik az aktinfilamentumhoz képest. A motorműködés vizsgálatát rendkívül megnehezíti, hogy az erőgenerálási lépés közti állapotai rövid életűek miatt nem hozzáférhetőek. Egytriptofános miozinmutánsok segítségével kimutattuk, hogy ADP és blebbistatin inhibitor jelenlétében a miozin olyan konformációt vesz fel, amely az erőfejlesztő lépés kezdőállapotára emlékeztet: felhúzott erőkarú, de erős aktinkötő állapotot. E konformációt elektronmikroszkópos felvételekkel is megerősítettük. Biokémiai és szerkezeti sajátosságai alapján ez az állapot nagyon hasonlít a normál (nem gátolt) erőgenerálási lépés kezdőállapotához, amely blebbistatin távollétében rövid élettartama miatt nem vizsgálható. Adataink alapján a blebbistatin – sejtbiológiai alkalmazásai mellett – az aktomiozin erőgeneráló működésének megértésében is rendkívül hasznosnak mutatkozik.

### **P3-04** **A Hsp27 neuroprotektív szerepe akut és krónikus etanoladalogolás után**

Tóth E. M., Gonda Sz., Sántha M.

MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A Hsp27 a kis móltömegű hősokkfehérjék családjába tartozó, ATP-független *chaperon*fehérje. Legfontosabb feladata, hogy a hibás szerkezetű fehérjékhez kapcsolódva megakadályozza, hogy azok rendellenes fehérjeaggregátumokat képezzenek. Ezen kívül részt vesz az apoptózis gátlásában, a citoskeleton szervezésében, valamint megvédi a sejteket az oxidatív stresszrel szemben. Csoportunk célja a Hsp27 neuroprotektív szerepének vizsgálata volt Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egerekben. A transzgenikus egér vonalakat pronukleusz mikroinjekciós technikával állítottuk elő. A bejuttatott humán *Hsp27* gén kifejeződését *western blot* módszerrel mutattuk ki. A Hsp27 fehérje eloszlását a különböző agyrégiókban immunhisztokémiai úton vizsgáltuk. A transzgen a kéregben és a hippocampusban is kifejeződött, de a legerőteljesebb kifejeződését a kisagyban kaptuk. A Hsp27 neuroprotektív szerepét akut és krónikus etanolkezelés után vizsgáltuk. Az akut kezelések során az állatok 2 g/ttkg etanolinjekciót kaptak, ezután különböző viselkedési teszteket végeztünk el ataxia, izomerő és mozgáskoordinációs képesség vizsgálatára. A fordított rács (*inverted screen*) tesztet egyik vad típusú állat sem teljesítette, míg a transzgenikus egerek 43%-a sikeresen teljesítette azt ( $p=2,92593 \cdot 10^{-4}$ ). A rúdon történő haladási (*beam walking*) tesztben a vad típusú állatok 86%-a leesett a rúdról, míg a transzgenikus állatoknál ez az arány 53% ( $p=0,03139$ ) volt. Ezen kívül a vad típusú állatoknak több időbe telt végighaladni a rúdon, mint a transzgenikusoknak ( $p=2,30296 \cdot 10^{-4}$ ). A lábnyomi (*footprint*) analízisben különbséget találtunk a transzgenikus és vad típusú egerek

lépéshossza között (első láb:  $p=0,00224$ , hátsó láb:  $5,6036 \cdot 10^{-6}$ ). A krónikus etanolkezelés során az állatok ivóvizét 20% etanololdattal helyettesítettük 5 hétig, majd agymetszeteken *Fluoro-Jade-C*-festéssel vizsgáltuk az neurodegenerációt. A transzgenikus egerek agyában jóval kevesebb elhalt neuron volt látható, mint a vad típusú állatokéban.

### **P3-05 Uracilszenzor fehérjék röntgenkristallográfiai jellemzése**

Leveles I.<sup>1</sup>, Békési A.<sup>1</sup>, Kónya E.<sup>1</sup>, Harmat V.<sup>2</sup>, Vértessy G. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest, <sup>2</sup>ELTE, MTA Fehérjemodellező Kutatócsoport, Budapest

A genetikai integritás szempontjából eszenciális dUTPáz enzimcsalád már számos, csoportunk által meghatározott kristályszerkezettel rendelkezik a PDB (*Protein Data Bank*) adatbázisban, további – az alkalmazhatóság szempontjából jelentős – mutánsok szerkezetmegoldása folyamatban van, molekuláris helyettesítés módszerrel. Legutóbb

annak a MTBDUT H145W mutánsnak atomi felbontású szerkezetmegoldása történt meg, mely a beillesztett triptofán segítségével lehetővé teszi a fehérje fluoreszcenciás mérésorozatát, anélkül, hogy szerkezete és aktivitása jelentősen sérült volna a mutáció által. A *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz fajspecifikusan tervezett inhibitorok által a gyógyszerkutatás érdekes témája. A másik, feltételezett genomi uracilszenzor fehérjéről (UDE) még nincsenek röntgenkristallográfiai adatok, ennek kristályosítása és szerkezetmegoldása igazi kihívás. A fehérje, szekvenciája alapján, egy új fehérjecsalád első tagja, nincs olyan hozzá jelentősen hasonló fehérje, amelynek 3D szerkezete ismert volna. Jelenleg az UDE fehérje funkcionális jellemzésével párhuzamosan dolgozunk a kristályosítás sikerésége érdekében. Először sikerült olyan kristályokat előállítani, melyek hamarosan tesztelésre kerülnek a grenoble-i ESRF szinkrotron röntgensugárforrásnál. Sikeres mérés esetén többszörös és egyszeres hullámhosszú anomáliás diffrakció (MAD/SAD) segítségével lehetővé válhat az UDE szerkezetmegoldása.

## **P4 – Jelátviteli rendszerek**

### **P4-01 Állványfehérjék szerepe a MAPK jelátviteli utakban**

Alexa A., Gógl G., Lukács M., Reményi A.  
ELTE TTK, Biokémia Tanszék, Budapest

A mitogénaktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli pályák középpontjában egy háromszintű fehérje kinázokból álló kaszkád található: MAPKKK → MAPKK → MAPK. A MAPK fajtája szerint megkülönböztetünk ERK, JNK és a p38 MAPK útvonalakat. Az utóbbi évek kutatásainak fontos felfedezése, hogy jelátviteli utak sokszor állványfehérjék segítségével szerveződnek funkcionális modulokba [Zeke *et al.* (2009) *TiCB*, in press]. Célunk annak felderítése, hogy állványfehérjék miként járulnak hozzá a jelátviteli hálózatok szerveződéséhez és működéséhez. Jelenlegi kísérleteinkben arra vagyunk kíváncsiak, hogy humán MAPK állványfehérjék (pl. Ksr1, Jip1 és Jip2) hogyan befolyásolják a három egymást követő kinázból álló MAPK-modulok jelátviteli sajátosságait. Megközelítésünk újszerű vonása, hogy vizsgálataink során rekombináns, tisztított fehérjék segítségével *in vitro* rekonstruáljuk a megfelelő humán MAPK jelátviteli modul. Az általunk előállított és tisztított kinázok aktívak, a különböző MAPK-elemek aktivitását mind radioaktív kináz teszt, mind western blot alapján követni tudjuk. Jelenleg a modulokon belüli fehérje–fehérje-kölcsönhatások feltérképezése zajlik GST-pull down kísérletekkel. A továbbiakban feltérképezzük azokat a kölcsönhatásokat, amelyek a szupramolekuláris szerveződésért felelősek, és mennyiségileg jellemezzük az egyes kölcsönhatások hozzájárulását a MAPK-modul teljes aktivitásához.

### **P4-02 A protein foszfatáz 2A (PP2A) autofágia szabályozásában betöltött szerepe *Drosophila melanogaster*ben**

Bánréti Á.<sup>1</sup>, Sass M.<sup>1</sup>, T. Lukácsovich<sup>2</sup>, Csikós Gy.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> ELTE TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA, USA

Az autofágia az eukarióta élőlényekben általánosan jelenlévő sejtteni folyamat, mely nélkülözhetetlen a hibás, funkciójukat veszített makromolekulák, organellumok eliminációjához, a sejtek, szövetek átépüléséhez, szélsőséges esetekben akár a pusztulásához is. Számos sejtvesztéssel járó betegség hátterében az autofágia diszfunkciója áll. A holometabola rovarok metamorfózisa idején az autofagocitózis extrém módon felerősödik a lárvális szövetekben, így az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) kitűnő modellként szolgál az autofágia genetikai, illetve biokémiai módszerekkel történő szabályozásának vizsgálatára. Más rendszerekben leírták, hogy a protein foszfatáz 2A katalitikus alegység (PP2A/C), PP2A/A *scaffold* proteinnel illetve egy eddig azonosítatlan PP2A/B regulátor alegységgel alkotott heterotrimerként serkenti az autofágiát. Ismert továbbá, hogy a PP2A trimer komplex szerveződését a TOR kináz (*target of rapamycin*) szabályozza. Kísérleteinkben éheztetéssel illetve rapamycinnel (TOR-inhibitor) indukáltuk az autofágiát lárvális zsírtestekben. Okadánsavval (a PP2A/C specifikus gátlószerével) kezelt állatoknál a *LysoTracker* próbával jelölt autolizoszómák számának szignifikáns csökkenését kaptuk. A PP2A/B' génre nézve négy P-elemes mu-

táns vonalat vizsgáltunk, melyekben az egyedek eltérő hányada mutatott autofágiadefektust. Többlépéses keresztezéssel revertáns vonalakat hoztunk létre, melyek az eredeti (vad) fenotípust mutatták. A PP2A/B' regulátor alegységének expresszióját konstitutív RNS-interferenciával csendesítve a LysoTracker-pozitív granulomok szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. PP2A/B'-GFP riportergént tartalmazó konstrukciót hoztunk létre, majd petékbe injektáltuk. A transzgenikus vonal lárváiban, hősokkmediált, illetve szövetspecifikus expressziót követően, a fúziós fehérje az autolizozómák membránjához asszociáltan jelent meg.

#### **P4-03 MAP kinázok specificitása – a dokkoló peptidek szerepe a jeltovábbításban**

Bárkai T., Garai Á., Reményi, A.  
ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; MTA KK, Budapest

A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) a sejtmembrántól a sejtmagig tartó jelterjedésben számos kölcsönhatást hoznak létre más fehérje kinázokkal, foszfatázokkal, állványfehérjékkel és célfehérjékkel (pl. transzkripciós faktorokkal a sejtmagban). A MAPK-ok fehérje-fehérje-kölcsönhatásai révén jelpályákba szerveződnek és ezeknek a kölcsönhatásoknak egyik széles körben alkalmazott formája dokkoló peptideken keresztül zajlik [Reményi *et al.* (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**: 676-685]. Dokkoló kölcsönhatás során a kináz egy aktív helytől független felszíne – az ún. dokkoló árok – lép kölcsönhatásba az interakciós partnerből származó rövid kb. 10-15 aminosav-hosszúságú peptidszakasszal. Humán MAPK-ok dokkoló kölcsönhatásainak feltérképezésére irányuló kísérleteink során eddig karakterizáltunk kb. 30 különböző dokkoló peptid interakcióját négy MAPK enzimmel (ERK2, JNK1, p38a és p38b). Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy ezek a rövid kb. 10-12 aminosav-hosszúságú peptidek specifikus módon képesek a különböző MAPK enzimekhez kötődni. A peptideket MAPK-interakciós profiljaik alapján három csoportra osztottuk: (a) promiszkus, mindegyik vizsgált MAPK enzimmel kölcsönhatásra lép; (b) specifikus, csak egy MAPK enzimmel lép kölcsönhatásba; (c) szelektív, legalább egy MAPK enzimmel nem lép kölcsönhatásba. Céluink, hogy röntgendiffrakciós módszerekkel feltérképezzük a MAPK-peptid-komplexek kölcsönhatásainak nagyfokú specificitását eredményező szerkezeti okokat. Eddig tucatnyi MAPK-peptid-komplex kristályosítását kezdtük meg, melyeket úgy választottunk ki, hogy azok jól reprezentálják a különböző, fent ismertett fehérje-peptid-kölcsönhatási profilokat.

#### **P4-04 Lenni vagy nem lenni? A hipotetikus $\delta$ -opioid receptor altípusok vizsgálata *in vivo* és *in vitro***

Birkás E.<sup>1</sup>, Kertész I.<sup>2</sup>, Tóth G.<sup>1</sup>, T. Wen<sup>3</sup>, J. Pintar<sup>3</sup>, Szűcs M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged;

<sup>2</sup> MTA Atommagkutató Intézet, Debrecen;

<sup>3</sup> University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Piscataway, NJ, US

Korábban meghatároztuk az új, proteolitikusan stabil, potens  $\delta$ -opioid antagonistá Tyr-Tic-(2S,3R)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH receptoriális paramétereit patkány agyban [Birkás *et al.* (2008) *Neuropeptides*, **42**: 57-67]. Jelen munkánkban azt vizsgáltuk, hogy az új ligandum alkalmas-e a  $\delta$ -opioid-receptorok mai napig hipotetikus altípus-szelektivitásának vizsgálatára. *Intrathekálisan* adott Tyr-Tic-(2S,3R)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH szignifikánsan blokkolta a  $\delta_1$ -szelektív agonista DPDPE analgetikus hatását, míg hatástalan volt a  $\delta_2$ -szelektív Ile<sup>5,6</sup>-deltorphin II és a  $\mu$ -opioid-agonista DAMGO-val szemben egér farkok elrántási tesztben, ami az új ligandum *in vivo*  $\delta_1$ -szelektivitására utal. Humán  $\mu$ - vagy  $\delta$ -opioid-receptorokkal stabilan transzfektált CHO sejtmembránokban végzett ligandum-stimulált [35S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben az új antagonistá hatékonyan blokkolta mind a DPDPE, mind az Ile<sup>5,6</sup>-deltorphin II által kiváltott stimulálásokat, és szignifikánsan nem befolyásolta  $\mu$ -agonisták hatását. A TIPP és új származékának antagonistá potenciálját ismert specificitású antagonisták hatásával összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy mind a DPDPE-, mind az Ile<sup>5,6</sup>-deltorphin II-stimulálás gátlása esetén a hatássorrend: naltriben ( $\delta_2$ -specifikus antagonistá) >> Tyr-Tic-(2S,3R)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH ~ TIPP > BNTX ( $\delta_1$ -antagonistá) DOR-CHO membránban. Ezen eredmények arra utalnak, hogy *in vitro* kísérleteinkben nem mutatható ki  $\delta$ -opioid receptor altípusok létezése. Feltételezzük, hogy az *in vivo* észlelt  $\delta$ -opioid receptor altípusok hetero-oligimerizáció révén jönnek létre. Funkcionális kísérleteinkben azt találtuk, hogy az új ligandumnak nemcsak  $\delta$ -opioid antagonistá, hanem  $\mu$ -agonistá hatásai is vannak. Az ilyen ligandumokról ismert, hogy nem alakul ki velük szemben analgetikus dependencia, ezért klinikailag ígéretesek. (NKTH DNT 08/2004, OTKA TS-049817).

#### **P4-05 A TIMAP és az ERM fehérjék szerepe a tüdőendotélium gátfunkciójának szabályozásában**

Czikora I., Bécsi B., Erdódi F., Gergely P., Csontos Cs.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A citoszkeletonhoz kötődő fehérjék foszforilációja és defoszforilációja kulcsszerepet tölt be az endotheliumban a gátfunkció szabályozásában. A TIMAP (TGF-inhibited membrane-associated protein) fehérje szerkezetéből adódóan a MYPT-család tagja, így feltételezhető, hogy a protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) célirányító, regulátor alegysége. Más sejttípusokhoz viszonyítva a TIMAP expressziós szintje az endotél sejtekben igen magas. Korábbi munkánkban TIMAP depletált és kontroll humán tüdőartériasejtekben (HPAEC) a TIMAP gátfunkcióját mutattuk ki. Jelenlegi mun-

kánkban a TIMAP és a PP1c fehérjék közötti kölcsönhatást mutattunk ki immunoprecipitációval, valamint rekombináns, tisztított fehérjékkel felületplazmon-rezonancia készülékkel (Biacore). A TIMAP plazmamembránhoz asszociálódó fehérje, immunfluoreszcenciás kísérletekben elsősorban a sejtmembránban, a sejtmagban és a mag körüli citoszólban detektáltuk. Immunfluoreszcenciás úton kolokalizációt mutattunk ki a TIMAP és a moezin között, s e kölcsönhatást immunoprecipitációval is meg tudtuk erősíteni, így feltételezzük, hogy a TIMAP az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásán keresztül fejtheti ki gátfunkcióját. Az ERM fehérjék akkor aktiválódnak, ha a C-terminális treonin-oldalláncukat a PKC- $\theta$  vagy a Rho kináz foszforilálja, így dimerjeik, oligomereik monomerekké alakulnak, ezáltal képesek lesznek az aktinfilamentumokat a plazmamembránhoz kötni. Rekombináns moezint (vad típus és trunkált mutáns) Rho kináz enzimmel foszforiláltunk, melyet *in vitro* foszfatázteszt kísérletekben szubsztrátként használtunk. A PP1c aktivitása TIMAP hozzáadását követően csökkent. Feltételezzük, hogy a TIMAP szerepet játszhat a membránbeli PP1c-aktivitás szabályozásában, ERM fehérjék defoszforilálásában és az ERM-szabályozott membránfolyamatokban, gátfunkcióban. (OTKA K60620, K68416)

#### P4-06

##### **Rizsből származó protein foszfatáz 2A B'' regulátor alegység szerepének vizsgálata rizsben és dohányban**

Farkas I.<sup>1</sup>, F. Ayaydin<sup>2</sup>, Kókai E.<sup>1</sup>, Ábrahám E.<sup>2</sup>, P. Yu<sup>2</sup>, Dombrádi V.<sup>1</sup>, Dudits D.<sup>2</sup>, Horváth V. G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen;

<sup>2</sup> MTA SzBK Növénybiológiai Intézet, Szeged

A protein foszfatáz 2A (PP2A) enzim fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, amelyben a retinoblasztómászerű fehérjék foszforilációs állapota kiemelkedő jelentőségű. A PP2A holoenzim egy katalitikus alegységből és egy állandó A regulátor alegységből álló dimerből épül fel, amelyhez változatos B regulátor alegységek egyike kapcsolódhat. A változó B alegységek határozzák meg a PP2A szubsztrátspecifitását és sejten belüli lokalizációját. A növények sejtciklusának szabályozását és ebben a PP2A szerepét rizs modellnövény segítségével tanulmányozzuk. Korábbi eredmények szerint a *Medicago sativa* PP2A B'' regulátor alegysége élesztőkéhibrid-rendszerben erősen és szelektíven kölcsönhatott a lucerna MsRBR és a rizs OsRBR1 retinoblasztómahomológ fehérjével [Lendvai *et al.* (2007) *J. Exp. Bot.*, **58**: 1663-1675]. Indokoltnak látszott, hogy tovább vizsgáljuk a PP2A B'' domén szerepét a sejtciklus-szabályozásban. A rizs B'' alegységet hexahisztidinfüziós fehérjeként expresszáltuk *E. coli* baktériumban, és Ni<sup>2+</sup>-agaróz-kromatográfiával tisztítottuk. A rekombináns fehérje ellenanyagot termeltettünk nyúlban. Az antiszérumot NHS-aktivált Sepharose és rekombináns rizs B'' fehérje felhasználásával affinitáskromatográfiával tisztítottuk, majd *dot blot* és

*western blot* kísérletekben ellenőriztük. Az ellenanyag alkalmas a B'' fehérjének megfelelő molekulatömegű protein detektálására rizs szuszpenziós sejtek és levelek kivonatában. Az antitest rizs szuszpenziós sejtekben citoplazmás és sejtmagi lokalizációt is mutató fehérjét ismer fel, melynek szintje a sejtciklus fázisaitól független. Az ellenanyag alkalmas expressziószint-megállapításra rizs eredetű B'' fehérjét termelő transzgenikus dohány-növényekben. (OTKA NK-69227)

#### P4-07

##### **A retinoidok hozzájárulhatnak a szöveti transzglutamináz keletkezéséhez az elhaló timocitákban**

Garabuczi É., Somlai G., Fésüs L., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A timociták csontvelői őssejtekből származó sejtek. Érésük és differenciálódásuk a tímuszban történik meg, melynek során a timociták több mint 90%-a elhal. Az intézetben folyt korábbi kutatások kimutatták, hogy az apoptózis kiváltásakor (pl. glükokortikoid oltását követően) nagy mennyiségű szöveti transzglutamináz (TG2) termelődik a timocitákban. A timociták elhalását glükokortikoid-kezeléssel *in vitro* is előidézhetjük, de ezzel egyidejű TG2-indukálódást nem tudtuk kimutatni. Arra keresünk választ, mely – a timociták szöveti környezetében megtalálható és a TG2 *in vivo* termeléséhez szükséges – anyagok működhetnek közre a timociták *in vivo* apoptózisa során. Korábbi adataink azt mutatták, hogy a timociták elhalását a tímuszban retinoidok és az apoptotikus sejteket eltakarító makrofágok által termelt transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) keletkezése kíséri. Mind retinsav-, mind TGF- $\beta$ -kötőhely létezését leírták a TG2 promóterében. Kísérleteinkben a retinsav és TGF- $\beta$  hatását vizsgáljuk a TG2 mRNS-ének megjelenésére, a timociták glükokortikoid kiváltotta *in vitro* apoptózisa során. Adataink azt mutatják, hogy a TGF- $\beta$  és a retinsav, valamint az apoptózist kiváltó glükokortikoid együttes hatása szükséges a TG2 mRNS hatásos indukciójához. *In vivo* apoptózisindukció során a TGF- $\beta$  hatásának közömbösítése vagy a retinsavsintézis gátlása megakadályozza a TG2 indukcióját, tehát a retinsav és a TGF- $\beta$  is közrejátszik az apoptotikus timocitákban keletkező TG2 indukciójában. (OTKA 77587, Sanofi Aventis doktori ösztöndíj)

#### P4-08

##### **Éhezéssel indukált génexpressziós változások autofágiahiányos *Drosophila*-mutánokban**

Juhász G., Érdi B.

ELTE TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

Az autofágia (sejtes önmérsztés) során a sejt saját anyagait a lizoszómák segítségével lebontja. A folyamat evolúciósan rendkívül konzervált, morfológiája is roppant hasonló az összes eddig vizs-



gált eukarióta élőlényben. Ezzel összhangban az eredetileg az élesztőben leírt autofág (*Atg*) gének homológjai többsejtűekben is megtalálhatóak. Az autofágia a szükségtelen és hibás sejtalkotók folyamatos eltávolítása révén alapvető fontosságú a szervezet túlélése, illetve a folyamatos megújulás szempontjából, de bizonyos külső (pl. éhezés) és belső ingerek (pl. hormonális hatások) nyomán gyakran tömeges méreteket ölt. Az autofágia nem csak a hátrányos környezeti körülmények (stressz) elleni védekezésben játszik igen fontos szerepet, hanem számos patológiás folyamat során is fellép az autofágia deregulációja. Az autofág lebontás mértéke szintén egyre csökken az öregedés során, hozzájárulva az elöregedett és hibás sejtalkotók felszaporodásához, melynek következtében a sejtek feladatukat nem tudják már normálisan ellátni. A kalorikus restrikción (csökkent kalóriabevitel) köztudottan megnöveli az élethosszot, valószínűleg többek között az autofágia serkentése révén. Az autofágia szabályozásának megértése döntő jelentőségű nemcsak alapkutatói szempontból, de a fenti patológiás folyamatokban betöltött potenciális gyógyító szerepe miatt is. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) genomjában az emberi betegségeket okozó gének mintegy kétharmada jelen van, s emellett a rovar gyors életciklusa, valamint a rendelkezésre álló genetikai és sejtbiológiai vizsgálómódszerek széles tárháza különösen alkalmassá teszik ezt az élőlényt alapkutatói célokra. Összehasonlító teljes genomi *microarray* vizsgálatokat végeztünk az éheztetés hatására bekövetkező génexpressziós változásokról kontroll és különféle autofágiadeficit (*Atg1*, *Atg7*) mutáns lárvákon, s a nyert adatok elemzése és bioinformatikai analízise kerül bemutatásra.

#### P4-09

##### **A sejtmagban lokalizálódó p30 fehérje gén-szintű expresszióját több sejtmagi receptor szabályozza**

Kajdi R., Gyöngyösi A.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Kutatócsoportunk célja egy transzkripció faktor, a PPAR $\gamma$  (peroxiszómapiroliferátor-aktivált receptor  $\gamma$ ) sejtmagi receptor célgénjeinek azonosítása humán perifériás vérből izolált monocitákban, illetve monocitából differenciáltatott dendritikus sejtekben *microarray* kísérlettel. Ennek során számos új, potenciális célgén indukcióját figyeltük meg, melyekből több gént választottunk ki validálásra. Az egyik potenciális, PPAR $\gamma$  által szabályozott gén a sejtmagban lokalizálódó *p30* (más néven: *PRR6*, *CENP-V*). Legfontosabb szerepeit a centromer-organizációban, a kromoszómarendezésben és a citokinezisben tölti be. Sejtosztódás során az egyes fázisokban eltérő szintű kifejeződése figyelhető meg, melynek során a belső centromerhez és a nukleáris perifériához is kötődik. Hiányában a mitotikus kromoszómaszerkezetben abnormalitás lép fel, emellett az interfázis nukleoplazmában megváltozik a hiszton H3 9. aminosavának (lizin)

trimetilációja (H3K9me3), ami promóterrepressziót indukáló hatással járna. Magas szintű kifejeződése heterokromatikus pericentromer-hiperkondenzációt okoz. Ezen gén expresszióját vizsgáltuk RNS szinten idő és dózis (RXR, illetve PPAR $\gamma$ -agonisták és PPAR $\gamma$ -antagonisták) függvényében, monocita-makrofág eredetű sejtvonalakban (MM6, HL-60). Igazoltuk, hogy a *p30* gén valamilyen szinten szabályozott a PPAR $\gamma$ -magreceptor által, de egy szélesebb körű kísérlettel retinoidútvonali általi szabályozást is megfigyeltünk (RXR, LXR, RAR magreceptorok általi indukció) a gén szintű szabályozásban. A *p30* gén PPAR $\gamma$ -receptor-függő szabályozását PPAR $\gamma$  siRNS alkalmazásával is sikerült kimutatni. Ennek ismeretében valószínűsíthető, hogy a *p30* gén szabályozása RXR magreceptorral való heterodimerizáción (PPAR:RXR, RAR:RXR, LXR:RXR) keresztül történik, vagyis több RXR heterodimer játszik kulcsfontosságú szerepet a *p30* gén expressziós szintű szabályozásában. További célunk a *p30* fehérje funkciójának vizsgálata a mieloid eredetű sejtekben, mind a PPAR $\gamma$ -, mind a retinoidútvonaliak szerint.

#### P4-10

##### **A PP2AB regulátor alegységek szerepe tüdőartéria-endotél sejtek citoszkeleton-szerkezetének szabályozásában**

Kása A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Az endotél sejtek között az adherens kapcsolatok és a sejtek citoszkeletonjának szerkezete egyaránt fontosak. A sejtkapcsolatokban az egymással kölcsönható fehérjék foszforilációjáról és az abban résztvevő kinázokról már vannak adatok. Az adherens kapcsolatokban a cadherin Ser/Thr foszforilációja szükséges a  $\beta$ -catenin kötődéséhez. A foszfatázokat és azok szabályozását viszont még nem vizsgálták endotél sejtekben. Munkánkban kimutattuk, hogy a protein foszfatáz 2A katalitikus és regulátor alegységeinek túlzott kifejeződésével az endotél sejtekben a PP2A részt vesz a gátfunkció szabályozásában, valamint emellett a citoszkeleton újrendeződésében. A PP2A vázát egy 36 kDa méretű katalitikus alegység (PP2Ac) és egy 65 kDa méretű regulátor alegység (PP2Aa) alkotja. Ehhez a dimerhez egy harmadik alegység is csatlakozik, melyet B alegységnek nevezünk (PP2Ab), és több egymástól eltérő formáját ismerjük. A B alegységek az enzim szubsztrátspecifitását és a sejten belüli lokalizációját határozzák meg. A B alegység szerepét vizsgáltuk a citoszkeleton-szabályozásban és a sejtkapcsolatokban résztvevő fehérjék defoszforilációjának szabályozásában. Úgy találtuk, az endogén PP2Ab és PP2Ab' alegységek a citoplazmában, illetve a citoplazmában és a sejtmagban találhatóak. Trombinkezelés hatására azonban a B alegység jelentős része a plazmamembránba transzlokálódik, míg a B' alegység a sejtmagban dúsul fel. Marhatüdő-artéria endotél sejteket (BPAEC) PP2Ab- és PP2Ab'-konstruktokkal transzfektáltunk. A kísérletekben azt mutattuk ki, hogy a B és B' regulátor alegységek túlkifejeződése a sejtekben megfigyelhető morfológiai változást

okoz. Specifikus siRNS segítségével elvégeztük a PP2AB $\alpha$  géncsendesítését, illetve az adherens sejt-kapcsolatban fontos szerepet betöltő  $\beta$ -catenin lehetséges kapcsolatát vizsgáltuk a B alegységgel. PP2AB $\alpha$  siRNS-kezelt sejteken a  $\beta$ -catenin szintje lecsökkent a sejtmembránban, s emellett trombinkezelés hatására további csökkenést tapasztaltunk. (OTKA K60620)

#### P4-11

##### **Fehérjefoszforilációs és -defoszforilációs folyamatok szerepe a tüdőendotél sejtek citoszkeletonjának szabályozásában**

Kolozsvári B.<sup>1</sup>, Kiss A.<sup>2</sup>, Erdődi F.<sup>1</sup>, Gergely P.<sup>1</sup>, Bakó É.<sup>1</sup>

DE OEC,<sup>1</sup> Orvosi Vegytani Intézet<sup>2</sup> MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen

Endotél sejtekben a citoszkeleton elemeinek átrendeződése, az aktin-miozin-kölcsönhatás változásai meghatározzák a vaszkuláris gát integritását. Gyulladásos folyamatokban bioaktív ágensek hatására kontrakció figyelhető meg, ezáltal a sejtek között hézagok jönnek létre, a gátfunkció sérül. A miozin könnyű láncának (MLC) foszforilációját a miozin-könnyűlánc kinázok (MLCK), míg a defoszforilációt a proteín foszfatáz-1 (PP1) típusú miozin foszfatáz (MP) katalizálja. A MP holoenzim regulátor alegysége egy 130/133 kDa méretű fehérje (MYPT1), melynek foszforilációja a Thr695 és Thr850 oldalláncokon gátolja a PP1c aktivitást. Kevészet tudunk azonban, különösen endotél sejtekben a foszfo-MYPT defoszforilációjára vonatkozóan. A kalcineurin (PP2B) Ca<sup>2+</sup>-CaM-függő foszfo-Ser/Thr-specifikus proteín foszfatáz, mely katalitikus (CnA) és regulátor (CnB) alegységből áll. A katalitikus alegység mindhárom izoformája ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) kimutatható endotél sejtekben. A kalcineurin szerepét tanulmányoztuk az emlős endotél sejt vonal citoszkeletonszerkezetének szabályozásában. A kalcineurin gátlószerei (CsA, FK506) jelenlétében, illetve a sejtek CnA/pEGFP-konstrukttal történő transzfekciója után Texas Red phalloidin segítségével vizsgáltuk az aktinfilamentumokat. Eredményeink arra mutatnak, hogy a kalcineurin fontos szerepet tölthet be a gátfunkció helyreállításában, a diszfunkció megszüntetésében, feltehetően a PP1 szabályozásának révén. Kimutattuk, hogy kalcineuringátló (CsA) kezelés után növekszik a MYPT1 foszforilációja a Thr695 és Thr850 oldalláncokon. Továbbá CsA jelenlétében a Thr695 és Thr850 trombinkezelés hatására megnövekedett szintje fenntartott marad. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a miozin foszfatáz szabályozásában a kalcineurin fontos szerepet játszhat, és ez a mechanizmus részben magyarázhatja azt a megfigyelésünket, hogy a trombin hatására kialakuló stresszkábelek CsA jelenlétében számottevően hosszabb ideig megmaradnak.

#### P4-12

##### **Drosophila-fajban az extracelluláris szignálregulált kináz szabályozza a kalpain B-t**

Kovács L.<sup>1</sup>, Alexa A.<sup>2</sup>, Klement É.<sup>3</sup>, Kókai E.<sup>1</sup>, Tantos Á.<sup>2</sup>, Gógl G.<sup>2</sup>, Sperka T.<sup>4</sup>, Medzihradský F. K.<sup>3</sup>, Tózsér J.<sup>4</sup>, Dombrádi V.<sup>1</sup>, Friedrich P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen;

<sup>2</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>3</sup> MTA SzBK, Proteomikai Kutatócsoport, Szeged;

<sup>4</sup> DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A kalpain Ca<sup>2+</sup>-aktivált neutrális, citoplazmatikus Cys-proteáz, amely szubsztrátfehérjéin limitált proteolízist hajt végre. Munkánk során a *Drosophila melanogaster* kalpain B enzimét vizsgáltuk. Mivel az elsődleges szerkezet elemzése számos potenciális foszforilációs hely jelenlétét mutatta, *in vitro* kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a rekombináns kalpain B foszforilálható proteín kináz A (PKA) katalitikus alegységgel, továbbá extracelluláris szignálregulált kináz 1 és kináz 2 izoenzimekkel (ERK1 és ERK2) hatása nyomán. Tömegspektrometriás módszerekkel azonosítottuk a foszforilációs helyeket: a PKA a Ser<sup>240</sup>- és Ser<sup>845</sup>-oldalláncot foszforilálja, előbbi az I. doménben található közel az autokatalitikus aktivációs helyhez, míg utóbbi a IV. domén második EF-kéz motívumának a Ca<sup>2+</sup>-kötő régiójában helyezkedik el. Az ERK1/ERK2 enzimek ugyanazon Thr<sup>747</sup>-oldalláncot foszforilálják, ami a III. és IV. domén közötti átvivő régióban foglal helyet. Ezt követően három különböző módszerrel – fluoreszcens dipeptid szubsztráttal (LY-AMC) fluorimetriás mérés, fehérjeszubsztráttal (MAP2c) SDS-PAGE, valamint autolízis alapján – megvizsgáltuk a foszforiláció hatását az enzim aktivitására és aktiválódására. Megállapítottuk, hogy kinázkezelés hatására nő az enzim aktivitása és autoproteolitikus aktiválódási sebessége. Minden esetben az ERK2 hatása bizonyult a legnagyobbnak. A foszforiláció a proteáz Ca<sup>2+</sup>-érzékenységét is fokozta. Irányított mutagenézissel foszforilációs helyen módosított mutánsokat (Thr<sup>747</sup>Glu, Ser<sup>845</sup>Glu) hoztunk létre, melyeknek kinetikai elemzése megerősítette korábbi eredményeinket. *In vivo* foszforilációs kísérletben sikerült igazolnunk a Thr<sup>747</sup>-oldallánc foszforilációját epidermális növekesi faktor (EGF) stimulálta *Drosophila* S2 sejteken. Eredményeink azt sugallják, hogy az extracelluláris jel hatására aktiválódó ERK útvonal az *ecetmuslica* kalpain B foszforilációját és ebből következő aktiválódását eredményezi. Kísérleteinkben továbbá azt is kimutattuk, hogy EGF-kezelés hatására a Ser<sup>240</sup> is foszforilálódik *in vivo* körülmények között, ami feltehetően nem a PKA, hanem a kalcium-/kalmódulinfüggő proteín kináz II (CaMKII) enzim hatására magyarázható. (OTKA 60723, 68754, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj; az első két szerző azonos mértékben járult hozzá az eredményekhez.)

#### P4-13

##### **Az ubiquitin–proteaszóma rendszer szerepe az autofágiában**

Lőw P., Varga Á., Kocsis Zs., Sass M.  
ELTE TTK, Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológia  
Tanszék, Budapest

Az eukarióta sejtekben két fő degradációs útvonal létezik, az ubiquitin–proteaszóma rendszer (UPR), és az autofagoszóma–lizoszóma rendszer. Míg az UPR elsősorban a rövid féléletidejű és/vagy hibás fehérjék, addig az autofágia a fehérjekomplexek és előregedett sejtorganellumok bontását, anyagaiknak reciklizációját végzi. Kísérleteink célja, hogy feltárjuk és jellemezzük az UPR autofágiát irányító szerepét. Vad típusú ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális zsírtestében fiziológias körülmények között a harmadik lárvastádiumban (L3) mutatkozik tömeges autofágia. Ha a lárvákat e stádium előtt mesterségesen éhezettjük, az autofágia korábban beindul (stressz indukálta autofágia). Hibás proteaszómát hordozó éhezettett egyedek zsírtestének morfológiája fény- és elektronmikroszkópos szinten is különbségeket mutat a vad típusúakkal szemben. Ennek alapján úgy tűnik, van kapcsolat a két lebontó rendszer között. További kísérleteinkben az autofágia azon lépéseinek felderítése a célunk, amelyekben a proteaszóma, mint fehérjebontó enzim játszik szabályozó szerepet. Feltételezhető, hogy a proteaszóma normális körülmények között a sejtekben az autofágia beindulását gátló fehérjé(ke)t bont. A proteaszóma kimotripszinszerű enzimaktivitásának  $\beta$ -alegység-RNAi által történő csökkentése olyan jelentős funkciócsökkenést okoz, hogy a feltételezett gátló fehérjék koncentrációja elég magas marad ahhoz, hogy megakadályozza az autofágia beindulását. A tripszinszerű aktivitás  $\beta$ 3-alegység RNAi segítségével történő csökkentése már nem elégséges az autofágia teljes gátlásához, csakúgy, mint az enzimaktivitást közvetlenül nem befolyásoló  $\alpha$ -alegységek esetében. Az UPR autofágia szabályozásban betöltött szerepének tanulmányozása nemcsak a sejtbiológiai alap kutatás szempontjából hozhat érdekes eredményeket, hanem az autofágia szabályozási hibáival összefüggő emberi betegségek kezelésében is új terápiás megközelítésekhez vezethet.

#### P4-14

##### **A MASP-1 komplement proteáz aktiválja a humán endotél sejteket: egy újonnan felderített kapcsolat a komplementrendszer és a proteáz-aktivált receptor 4 (PAR4) funkciója között**

Megyeri M.<sup>1</sup>, Makó V.<sup>2</sup>, Beinrohr L.<sup>1</sup>, Doleschall Z.<sup>3</sup>, Prohászka Z.<sup>2</sup>, Cervenak L.<sup>2</sup>, Závodszy P.<sup>1</sup>, Gál P.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;  
<sup>2</sup> SE, III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest;  
<sup>3</sup> Országos Onkológiai Intézet, Pathogenetikai Osztály, Budapest

A komplementrendszer a természetes immunitás fontos molekuláris komponense. A proteolitikus

kaszkádrendszer aktivációja gyulladási reakciót is okoz, illetve erősíti a gyulladással járó folyamatokat. A mannózkötő lektinhez kapcsolódó szerin proteáz-1 (MASP-1) a komplementrendszer egyik aktivációs útjának, az úgynevezett lektinútnak egyik, nagy mennyiségben jelenlévő proteáza. A MASP-1 fiziológiai szerepe a felfedezése óta vitatott, annak ellenére, hogy néhány potenciális fehérje-szubsztrátját azonosították. Elsőként mutattuk meg, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni a humán köldökzsinórvéna-eredetű endotél sejteket (HUVEC):  $Ca^{2+}$ -jelet generál, illetve beindítja az NF $\kappa$ B és p38 MAP-kináz jelátviteli útvonalakat. Az endotél sejtek hatnak a leukociták funkciójára, és kontrollálják a gyulladási reakciót: megváltoztatják az erek átteresztő- és szűrőképességét, valamint befolyásolják a véralvadást. Kísérleteinkben az endotél sejtek aktivációját egyedül a MASP-1 váltotta ki, a lektinút másik proteázának, a MASP-2-nek nem volt hatása a sejtek aktivációjára. A jelenség a MASP-1 proteolitikus aktivitásától függ, ami azt bizonyítja, hogy az endotél sejtek aktivációja egy proteáz aktivált receptoron (PAR) keresztül jöhet létre. A PAR-ok proteázszenszitiv régióit reprezentáló peptidszubsztrátokat használva megmutattuk, hogy a MASP-1 hasítja a PAR4 fehérjét. A funkcionálisan aktív PAR4 jelenlétét a HUVEC sejtekben PAR4 agonista peptiddel, illetve kvantitatív RT-PCR módszerrel bizonyítottuk. Végül megmutattuk, hogy a membránkötött intakt PAR4 mennyisége csökken MASP-1-kezelés hatására. Az eredmények eddig még nem ismert kapcsolatra világítanak rá a komplementrendszer aktivációja, és az endotél sejtek funkciója között. A PAR4 MASP-1 általi aktivációja fontos szerepet játszhat a komplement aktiválódás által gerjesztett gyulladási reakció kialakulásában.

#### P4-15

##### **Humán dUTPáz magi transzportjának szabályozása specifikus foszforiláció révén**

Róna G.<sup>1</sup>, Bozóky Z.<sup>1</sup>, Környei Zs.<sup>2</sup>, Neubrandt M.<sup>2</sup>, Madarász E.<sup>2</sup>, Takács E.<sup>1</sup>, Vértessy G. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> MTA Kísérleti Orvosi Kutató Intézet, Budapest

Az eukarióta élőlények, mivel genetikai állományukat külön kompartmentumba, a sejtmagba különítik el – térben és időben rendkívül hatásos szabályozási lehetőséghez jutnak a különböző makromolekulák citoplazma és sejtmag közötti szelektív transzlokációján keresztül. A 40 kDa méret feletti makromolekulák magi transzportjéért azok sejtmagi lokalizációs jele (NLS) felelős. Az NLS-t az importin receptorcsalád specifikus tagjai ismerik fel, melyek közvetítésével juthat át a fehérje a maghártya speciális pórusain. Az NLS-t, valamint annak környezetét érintő poszttranszlációs módosítások befolyásolhatják az importinokkal való kölcsönhatást: a szállító fehérje mind gyorsabban, mind lassabban akkumulálódhat a magba, vagy akár ki is záródhat onnan. A humán dUTPáz domináns izoformája jellegzetes NLS-t hordoz. A fehér-

je működése elengedhetetlen a genomi integritás megőrzéséhez, mivel hiányában nagy mennyiségű uracil épül a DNS-be a replikáció során, amely végül a sejt apoptotikus halálához vezet. Ismert volt, hogy az enzim a sejtmagban foszforilált formában található (Ser11-P az NLS-en belül), ám ennek lehetséges funkciója mindezidáig tisztázatlan volt. A vad típusú enzim, egy hiperfoszforilációt, valamint egy hipofoszforilációt mimikáló mutáns forma magi akkumulációjának dinamikáját videomikroszkópos kísérletekkel hasonlítottuk össze. Így elsőként mutattuk ki, hogy a dUTPáz NLS-szekvenciájának e foszforilációja esetén kireked a sejtmagból. Jelenleg a dUTPáz és az importin rendszer kölcsönhatását és a foszforiláció erre gyakorolt hatását *in vitro* kötődésvizsgálatokkal jellemezzük. A dUTPáz enzim magi lokalizációs szabályozását vizsgálva meghatározzuk, ez a foszforiláció melyik sejtciklus fázishoz köthető, és hogy az *in silico* predikciókkal azonosított kandidáns kináz gátlása milyen hatású.

#### P4-16

##### **A szöveti transzglutamináz hiánya fokozza az LPS-indukált gyulladási választ egérmakrofágokban**

Sarang Zs., Kőröskényi K., Fésüs L., Szondy Zs.  
*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

A szöveti transzglutamináz (TG2) multifunkciós fehérje, amely fehérje-keresztalkotó aktivitáson kívül rendelkezik GTPáz- és kinázaktivitással, és mind a sejten belül, mind extracellulárisan megtalálható. Részt vesz a programozott sejthalál folyamatában és az elhalt sejtek fagocitózis általi eltakarításában. Vad típusú (WT) és TG2 génhiányos (TG2KO) egerekből izolált rezidens hasüregi és csontvelői progenitorokból, *in vitro* differenciált makrofágokat használva kimutattuk, hogy a TG2KO sejtek fokozott TNF- $\alpha$  és IL-6 termeléssel válaszoltak bakteriális lipopoliszacharidos (LPS) kezelésre, ugyanakkor a TG2 bejuttatása gátolta a gyulladási citokinek termelését. Az LPS sejtfelszíni Toll-like receptor 4 peptidhez kötődve az inhibitor  $\kappa$  B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) foszforilálódásához és lebomlásához, és így a sejt-magi faktor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) aktiválásához vezet, amely transzkripciósfaktorként felelős a TNF- $\alpha$  és IL-6 megjelenéséért. Ennek megfelelően a TG2KO sejtekben csökkent a I $\kappa$ B- $\alpha$ -szintet és megnövekedett magi NF- $\kappa$ B-szintet mértünk. Laborunkban kimutatták, hogy a TG2 hiányában a makrofágok felszínén megnő az integrin- $\beta$ 3-receptor (ITG $\beta$ 3, vitronektinreceptor) szintje. A receptorról leírták, hogy az Src tirozin kináz aktiválásán keresztül képes aktiválni az NF- $\kappa$ B-útvonalt. A TG2 koreceptorként jelen van az integrin-receptor-komplexben, és irodalmi adatok szerint képes gátolni az Src aktiválódását, ugyanakkor, kísérleteink szerint a receptor szolubilis vitronektinnel való gátlásával TG2KO sejtekben csökkenthető volt az LPS-indukált TNF- $\alpha$  és IL-6 mRNS szintje. Kísérleti adataink alapján arra következtethetünk, hogy a fokozott gyulladási fenotípus kialakításában egyrészt a TG2 hiányában megnövekedett ITG $\beta$ 3-szint, másrészt a TG2

hiányában megnövekedett Src kináz enzimaktivitás vesz részt. (OTKA F-67632, T049445, ETT 100/2003)

#### P4-17

##### **A sejtfelszíni transzglutamináz 2 az integrin $\beta$ 3 és a cd36 koreceptoraként működve segíti az apoptotikus sejtek eltakarítását makrofágokban**

Szondy Zs.<sup>1</sup>, Tóth B.<sup>1</sup>, Sarang Zs.<sup>1</sup>, Garabuczi É.<sup>1</sup>, Vereb Gy.<sup>2</sup>, Bécsi B.<sup>3</sup>, Erdődi F.<sup>3</sup>, D. Aeschlimann<sup>4</sup>, Z. Ailian<sup>5</sup>

*DE OEC, <sup>1</sup> Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet; <sup>2</sup> Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet;*

*<sup>3</sup> Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen <sup>4</sup> Matrix Biology & Tissue Repair Research Unit, University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK;*

*<sup>5</sup> University of Edinburgh, Medical Research Council, Edinburgh, UK*

A szöveti transzglutamináz (TG2) olyan fehérje-keresztalkotó enzim, amely sok más biológiai funkciót is ellát, pl. a sejtfelszínen az integrin  $\beta$ 3 koreceptora is. A korábbiakban már bemutattuk, hogy a fehérje hiánya egerekben *in vivo* az apoptotikus sejtek fagocitózisának zavarát eredményezi, és SLE-szerű autoimmunitáshoz vezet [Szondy *et al.* (2003) *PNAS*, **100**: 7812-7817]. Bemutatjuk, hogy a TG2 a makrofág sejtfelszínén guaninnukleotid-kötött formában segíti a fagocitózist. Bizonyítjuk azt is, hogy a TG2 nemcsak az integrin  $\beta$ 3-nak, hanem az azt az apoptotikus sejthez kötő MFG-E8-molekulának is kapcsolódási partnere. Mindemellett bemutatjuk azt is, hogy a makrofágok nem random módon veszik fel az apoptotikus sejteket, hanem ehhez egy vagy két belépési pontot képeznek, amelyeket az integrin  $\beta$ 3 és a Rac1 lokális koncentrációja jellemez. TG2 hiányában elmarad az integrin  $\beta$ 3 koncentrációja, jelátviteli útvonala pedig zavarokat szenved. Sem az IP3 kináz, sem a RhoG, sem pedig a Rac1 aktiválódása nem normális, és az aktinszekezet is szokatlan. Ennek eredményeként az apoptotikus sejteket beléptető kapuk képződési és felvevőképességi hatékonysága számottevően lecsökken. További fagocitareceptor-mutáns makrofágok analízise emellett azt is sejteti, hogy a TG2 a CD36-receptorral is együttműködhet az apoptotikus sejtek fagocitózisfolyamata során. (OTKA 77587)

#### P4-18

##### **A PRMT1 szerepének tanulmányozása egérembrionális őssejtek differenciálódásában**

Simándi Z., Bálint B. L.

*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

Az embrionális fejlődés szabályozásában fontos szerepet töltenek be a magreceptorok, melyek a ligandumaktiválást követően koaktivátorokon keresztül képesek befolyásolni a génexpressziót. Több magreceptorra ismert koaktivátora a pro-teín arginin metiltranszferáz 1 (PRMT1). Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy mielőid leuké-

mia sejtvonalban ezeken a már leírt receptorokon túl a PRMT1 befolyásolja a szintén magreceptorok közé tartozó retinoidreceptorok retinsavra adott válaszát is. Ismert, hogy az embrionális fejlődés során a kialakuló idegrendszer területén a PRMT1 magasan expresszálódik, és hogy a retinsav eloszlása korrelál a neuronális differenciációval. Tudjuk továbbá, hogy a PRMT1 hiánya embrionális letalitáshoz vezet a preimplantáció időszakában, mely egybeesik a neuroectodermális differenciáció kezdeti időszakával. Ezek alapján hipotézisünk az volt, hogy a PRMT1 szerepet játszhat a neuronális differenciációban. Vad típusú és *PRMT1*<sup>-/-</sup> egérembrionális őssejtek retinoidindukált neuronális irányú differenciálódását hasonlítottuk össze morfológiai, immunhisztokémiai és génexpressziós szinten. A PRMT1 hiánya differenciációs blokkot nem okoz, az *in vitro* tenyésztetben megfigyelhetőek differenciálódó neuronok. Az egyéb differenciációs útvonalakban (endoderm-hepatocita, mezoderm-kardiomiocita) sincs zavar. Jelenleg a PRMT1 hiánya és a DNS fokozott károsodása közti kapcsolatot vizsgáljuk a differenciálódás során, mely magyarázatul szolgálhat a megfigyelt letális fenotípusnak.

#### P4-19

##### **Az adenosin a makrofágok A2A receptorain keresztül hatva hozzájárul az apoptotikus sejtfelvétel gyulladáscsökkentő hatásához**

Köröskényi K.

*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

Ismert, hogy a sejtek apoptózis elhalását nem követi gyulladáscsökkentő válasz, s az is elfogadott nézet, hogy az apoptotikus sejtek felvétele TGF- $\beta$ -termelést vált ki makrofágokban, mely auto- és parakrin módon csökkenti a gyulladási citokinek termelését. Újabb cikkek, valamint korábbi kísérleteink azonban megcáfolják a TGF- $\beta$  központi szerepét a gátlásban: eredményeink azt mutatják, hogy az apoptotikus sejtekkel kapcsolatba került makrofágok valóban kibocsátanak szolubilis molekulá(ka)t, melyek gátolják olyan makrofágok LPS-indukálta gyulladási citokintermelését is, melyek nem találkoztak apoptotikus sejtekkel. Mint lehetséges résztvevő, felmerült az adenosin – mint endogén gyulladáscsökkentő vegyület – szerepe a gátlásban. Makrofágokon megtalálható mind a négy receptoraltípusa, melyek közül az A2A játszik legnagyobb szerepet a gyulladási folyamatok gátlásában. Azt vizsgáltuk, hogy az A2AR hiánya befolyásolja-e az apoptotikus sejtek gyulladásgátló képességét makrofágokban. Azt találtuk, hogy az A2AR hiánya nem módosítja az apoptotikus sejtek közvetlen gyulladásgátló hatását és a gyulladásgátló faktor(ok) termelődését, de A2AR hiányában az apoptotikus sejteket nem látott makrofágok nem tudnak reagálni ezen faktor(ok)ra az IL-6-termelés gátlásával. Emellett az apoptotikus sejtekkel kapcsolatba került A2AR-hiányos makrofágok magasabb szinten bocsátják ki a neutrofilekre ható MIP-2 kemoattraktáns. Az emelkedett MIP-2-szint

fokozott neutrofilmigrációt eredményez az A2AR-hiányos egerekben *in vivo*. Az adenosin tehát az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok által kibocsátott egyik mediátor, mely részint citokin-specifikus módon részt vesz a gyulladási válasz csendesítésében, részint a MIP-2 szabályozásán keresztül közrejátszik további neutrofilmediált immunválaszok szükségességének eldöntésében. (OTKA F-67632, T049445, ETT 100/2003)

#### P4-20

##### **A myoblast city (mbc) gén szerepe az autofágiában**

Maruzs T.<sup>1</sup>, Lőrincz P.<sup>1</sup>, T. Lukácsovich<sup>2</sup>, Kiss I.<sup>3</sup>, Csikós Gy.<sup>1</sup>, Sass M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA, USA; <sup>3</sup> MTA SzBK, Genetikai Intézet, Szeged

Az autofágia során a sejtek citoplazmájuk egy részét lizoszomális úton lebontják. A folyamat részleteit *Drosophila melanogaster* eddig főleg funkcióvesztéses mutációk segítségével térképezték fel, mi azonban új megközelítést alkalmazva, funkcionyeréses mutánsok keresésével, illetve azok jellemzésével foglalkoztunk. Munkánk kiindulópontját egy DEP-elemet (*Double Enhancer P-element*) hordozó transzgenikus *Drosophila*-törzsgyűjtemény képezte. Ez a mindkét végén elmentés orientációjú UAS-eket tartalmazó módosított transzpozon Gal4 fehérjét kötve képes a vele szomszédos gének expresszióját fokozni. Amennyiben a fiziológiánál jóval korábbi időpontban sikerül autofágiát kiváltanunk a lárvális zsírtestben, feltételezhetjük, hogy a transzpozonnal szomszédos gének közül legalább az egyik részt vesz a folyamat elindításában. A módszer segítségével, a DEP-elem inzerációs helyét inverz PCR módszerrel meghatározva olyan géneket azonosítottunk, amelyek szerepe az autofágiában eddig ismeretlen volt. A 886d vonalban a DEP-elem a *Nup98* és az *mbc* gének között található, mindkét géntől 5' irányú (*upstream*) pozícióban, azaz Gal4 fehérje jelenlétében mindkettőnek túlzott expressziója bekövetkezhet. Ebből a vonalból többlépcsős keresztezés segítségével olyan törzseket állítottunk elő, melyekben a gének egymástól függetlenül aktiválhatók. A fenotípus újbóli vizsgálatával bizonyítottuk, hogy egyedül az *mbc* gén túlexpressziója a felelős az autofágia indukációjáért. RT-PCR módszerrel kimutattuk, hogy Gal4 jelenlétében valóban fokozódik az *mbc* expressziója. Egy független, EP-elemet hordozó törzs vizsgálatával is megerősítettük az *mbc* gén túlexpressziójának autofágiaindukáló szerepét, és hasonló eredményt kaptunk az általunk *ASmbc-Lumio*-jelzett transzgenikus vonal vizsgálatakor is. E lokalizációs vizsgálatokra is alkalmas törzs segítségével bizonyítottuk, az indukált autofág folyamatok nem a túlexpresszió során feldúsult Mbc fehérje eltávolítására irányulnak.



## P6 – Makromolekuláris kölcsönhatások

### P6-01

#### A burgonya SNF1-rokon kinázai a citoszolikus piruvát kináz regulátorai

Bánfalvi Zs.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,  
Gödöllő

Az SNF1 proteinkináz-család minden eukariótában megtalálható. Szerepe sokrétű, a metabolizmus szabályozásától a transzkripció befolyásolásáig terjed. Élesztőben az SNF1 kináz glükózéhezés során aktiválódik, és lehetővé teszi az alternatív szénforrások hasznosítását. Az élesztő SNF1 kináz emlősorológjai az AMP-aktivált protein-kinázok (AMPK-k). Az AMPK-k az energia-homeosztázis koordinátorai, a lipid- és glükózanyagcsere szabályozói. Az SNF1-rokon kinázok (SnRK-k) a növényekben is hasonló funkciót látnak el. Korábban már bizonyították, hogy az SnRK1-alcsalád tagjai foszforilálják és így inaktíválják a 3-hidroxi-3-metilglutaril-KoA reduktáz, a szacharóz-foszfát szintáz, a nitrát reduktáz s a trehalóz-foszfát szintáz 5 enzimeket. A burgonyában az SnRK1 két izoformában található (PKIN1, StubSNF1). Élesztőkét-hibrid rendszerben kimutattuk, hogy mindkét izoforma felismeri és kapcsolódni tud a glikolízis kulcsenziméhez, a piruvát kinázhoz, pontosabban annak citoszolikus formájához (PKc). A felismerési régió a PKc C-terminálisán helyezkedik el, szekvenciája: ALHRIGSASVI. Az élesztő SNF1 és az emlősök AMPK enzimeinek specifikus szubsztrátja a SAMS peptid (HMRSAMSGHLHLVKRR). Kimutattuk, hogy a burgonya mindkét SnRK1 enzime is foszforilálni tudja ezt a peptidet. Az SnRK1-ek azonban nemcsak a SAMS, de a PKc-specifikus SAS peptidet (VALHRIGSASVIKRR) is foszforilálni tudják. A SAS iránti affinitásuk kétszer nagyobb, mint a SAMS iránt. Az SnRK1-ek genetikai módosítással történt gátlása megváltoztatta a PK-aktivitást és fény-sötét periódustól függő cirkadián ritmusát. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy mindkét SnRK1 a PKc regulátora *in vivo*. A PKIN1-gátolt és StubSNF1-gátolt növények PK-aktivitási görbéje azonban eltérő lefutású volt. Ebből arra következtettünk, hogy bár mindkét SnRK1 felismeri és foszforilálja a PKc-t, funkciójuk a burgonyában mégsem teljesen azonos.

### P6-02

#### Nascent – Fehérje- fehérje fizikai interakciós hálózatszármaztató szoftver

Bánky D., Grolmusz V.

ELTE, Számítógéptudományi Tanszék, Budapest

Manapság az interneten több adatbázis is elérhető, melyek a fehérje-fehérje fizikai interakcióiról tárolnak információkat. Ilyen adatbázis például a DIP, a MINT, az IntAct vagy a HPRD, melyek laboratóriumi méréseken alapulnak. Bizonyos modell élőlényekről (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*, *Mus musculus*,

*Homo sapiens*) sok adat áll a rendelkezésünkre. Míg az *E. coli* baktérium fehérjeinterakcióiról ezen adatbázisok rengeteg információval szolgálnak, olyan fontos fajokról, mint például a *Mycobacterium tuberculosis*, szinte semennyivel. Kidolgoztunk egy eljárást, melynek segítségével megbecsülhető bármely élőlény fehérje-fehérje-interakciós hálózata egy „modell” faj felhasználásával. Ezt automatizálható, kifejlesztettük Nascent nevű programcsomagunkat [<http://nascent.pitgroup.org>], mely a Swiss-Prot és az IntAct adatbázisok felhasználásával egy forrásként használt faj adataiból generálja és megjeleníti egy kérdéses cél faj feltételezett protein-protein-interakciós gráfját. A prediktált hálózat menthető GraphML, SIF, JPEG vagy akár szöveges fájl formátumban.

### P6-03

#### Mérföldkövek az első uracil-DNS nukleáz enzim szerkezeti és funkcionális jellemzésében.

Békési A.<sup>1</sup>, Pukáncsik M.<sup>1</sup>, Muha V.<sup>1</sup>, Leveles I.<sup>1</sup>, Hunyadi-Gulyás É.<sup>1</sup>, Medzihradszky F. K.<sup>2</sup>, Erdei A.<sup>3</sup>, Vértessy G. B.<sup>1</sup>

MTA SzBK<sup>1</sup> Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> Proteomikai Kutatócsoport, Szeged; <sup>3</sup> ELTE Immunológia Tanszék, Budapest

A funkcionálisan és szerkezeti szempontból egyaránt egyedülálló uracil-DNS nukleáz (UDE) enzimet késői stádiumú ecetmuslicálárvákból (*Drosophila melanogaster*) azonosítottuk [Bekesi *et al.* (2007) *BBRC*, **355**: 643-648]. Ecetmuslicában a kanonikus uracil-DNS-metabolizmus alapvetően sérül: a lárvastádiumokban két kulcsenzim, az uracil beépülését gátló dUTPáz [Bekesi *et al.* (2004) *JBC*, **279**: 22362-22370], illetve a kivágásért felelős fő uracil-DNS glikoziláz [Aravind *et al.* (2000) *Genome Biol.*, **1**: RESEARCH007] egyaránt hiányzik. Munkahipotézisünk szerint a lárvális szövetek DNS-ében uracil halmozódhat fel, ami a lárvastádium végéig neutrális, ugyanakkor az UDE kifejeződésével a bábállapotban hibaként ismerődik fel, DNS-szálltörésekhez vezet, így részt vehet a metamorfózis alatt zajló sejthalál-folyamatok előmozdításában. Kimutattuk, hogy a rekombináns UDE nagy mennyiségű RNS-t köt, köztük a saját mRNS-ét is. Az RNS-kötés fiziológiás relevanciáját is megerősítettük. Limitált emésztés, gélshift, thermofluor, cirkuláris dikroizmus módszerek segítségével jellemeztük az RNS- és DNS-kötést, illetve az UDE-ben okozott konformáció- és stabilitásváltozást. Az RNS-mentes rekombináns UDE ellen termeltetett antiszérum segítségével azonosítottunk egy rövidebb fiziológiás izoformát, mely eltérő módon szabályozódik az egyedfejlődés során. Jellemeztük a két, izoforma-specifikus ellenanyag által felismert domináns epitópokat, valamint hipotézist állítottunk fel a két izoforma szabályozására, fiziológiás szerepére.

#### P6-04

### A Nod szignalizóma és a Nalp inflammaszóma együttműködése humán dendritikus sejtek antibakteriális válasza során

Gregus A., Benkő Sz., Rajnavölgyi É.

DE OEC, Immunológiai Intézet, Debrecen

A dendritikus sejtek patogénfelismeréséért főként Toll-like receptorok, intracelluláris Nod-like és RIG-like receptorok felelősek. Egyes NLR-ok fehérjekomplex-képzés révén teszik hatékonyabbá az immunválaszt. Előzetes eredmények alapján az adjuvánsként ismert muramil dipeptid (MDP) és bizonyos TLR ligandumok szinergistákként fokozzák a természetes immunitás gyulladási folyamatait, amelyben a Nod2-szignalizóma és a Nalp3-inflammaszóma kapcsolatán alapuló IL-1 $\beta$ -termelés fontosságát igazolták. Munkánk során vizsgáltuk, hogy az adaptív immunitás sejtjeinek aktiválódása hogyan hat az MDP által kiváltott válasza. E célból humán monocita eredetű dendritikus sejteket (moDS) a gyulladáshoz Th1 sejtek által termelt IFN $\gamma$  hiányában és jelenlétében MDP-vel aktiváltuk és vizsgáltuk azok fenotípusos és funkcionális változásait. Eredmények szerint az IFN $\gamma$  és az MDP szinergista hatást fejt ki a gyulladási citokinek és kemokinek szintjének (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$ ) emelkedésére és a DS-ek aktivációjára (CD83), tehát a gyulladáshoz vezető folyamatokat erősíti. Ezzel ellentétben a kaspáz-1 és a Nalp3 kifejeződését fokozó hatásért az IFN $\gamma$  felelős, de az MDP-vel nincs szinergista hatása. Ugyanakkor a kaspáz-1 enzim hatékony működéséhez, tehát az IL-1 $\beta$  szekrécióhoz az MDP által közvetített szignál is elengedhetetlennek bizonyult. Igazoltuk, hogy MDP hatására sem a CCR7 mRNS szintje, sem a receptor sejt-felszíni megjelenése, sem pedig a sejtek spontán és kemokin indukálta mobilitása nem változik, míg az alkalmazott IFN $\gamma$  csökkenti a DS-ek MDP által kiváltott mátrix metalloproteináz-expresszióját. Vizsgálataink azt jelzik, hogy az MDP és az IFN $\gamma$  együttes jelenléte migrációra már nem képes, de a szinergista hatás következtében rendkívül hatékony citokintermelő effektor DS-ek képződéséhez vezet, ami a gyulladáshoz vezető immunválasz további fokozását eredményezi.

#### P6-05

### Az „optimális proteáz inhibitor egyenlő optimális szubsztrát” elképzelés irányított evolúción alapuló újraértékelése

Héja D., Zboray K., Pál G.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A szerin proteázok létfontosságú életfolyamatok kulcsenzimeik, ezért nem meglepő, hogy a szabályozásukra számos eltérő stratégia is kialakult az evolúció során. A proteázok zöme inaktív zimogén formában keletkezik, és szabályozott proteolitikus hasítás aktiválja. A proteázaktivitás leszabályozása is gyakran szelektív proteolízissel zajlik. A leszabályozás egy másik gyakori formája szelektív proteázinhibitor fehérjéken keresztül történik. A

gátlás mechanizmusát tekintve ezek az irreverzibilis inhibitorok (szerpinek) és a reverzibilis inhibitorok csoportjára oszthatók. Mindkettő tagjai szubsztrátszerűen kötődnek a proteázhoz, és elhasadnak az úgynevezett P1 és P1' csoportok közötti peptidkötés mentén. A szerpinek hasadása egy mozgékony felszíni hurokban megy végbe, nagymérvű konformációváltozáshoz vezet, és a proteáz (a szerpinnel együtt) stabil acilenzim-komplexben inaktívul marad. Ezzel szemben a reverzibilis inhibitoroknál a hasítás merev felszíni hurokban megy végbe, nem indukál nagy konformációváltozást, a hasított inhibitor aktív marad, így a hasítás egyensúlyhoz vezet. Széles körben elfogadott nézet, hogy a reverzibilis inhibitorok jó modelljei a valódi szubsztrátoknak. A jelenlegi modell szerint, ha a proteáz számára egy optimális szubsztrátszekvenciát merevített hurok formájában prezentálunk, akkor optimális reverzibilis inhibitorunkat kapunk. Az állítás fordítva így szól: ha egy optimális inhibitor hurokot lineáris peptidként találunk a proteáz számára, akkor optimális szubsztrátot kapunk. Ezt a modellt a következő módon ellenőriztük: egy reverzibilis inhibitor felszíni hurokregióját fágbepumutással klasszikus modellenzimek, tripszin, kimotripszin illetve elasztáz gátlására optimalizáltuk. Az így kapott szekvenciapreferenciák mindhárom enzim esetében lényegesen eltértek a szubsztrátokra korábban megállapított preferenciáktól. Eredményünk arra utal, hogy a reverzibilis inhibitorok jelenlegi modellje revízióra szorul.

#### P6-06

### Az S100A4 metasztázishoz társult fehérje funkció-vizsgálata

Kiss B.<sup>1</sup>, Kovács E.<sup>2</sup>, Liliom K.<sup>2</sup>, Nyitrai L.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; <sup>2</sup>MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A kizárólag gerincesekben előforduló S100 család több mint 20 humán paralógjával az EF-kéz motívumot tartalmazó Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjék szupercsaládjának legnépesebb tagja. Részt vesznek a differenciációban, a sejtciklus és sejtmozgás szabályozásában. Az S100A4 kötő partnerei közé tartozik a p53 fehérje, a sejtmozgásért felelős nem izom miozin-IIA (myo2A), illetve extracellulárisan az annexin-II, melyekkel az interakció kizárólag Ca<sup>2+</sup> jelenlétében valósul meg. Számos, metasztázisra hajlamos tumor emelkedett S100A4 (metastasin) proteinszinttel jellemezhető. A lipid mediátor szfingozilfoszforilkolin (SPC) kompetitíven gátolja a kalmódulin (CaM) fehérjepartnereinek kötődését [Kovács, Liliom (2008) *Biochem J.*, **410**: 427-437], ezért megvizsgáltuk, hogy létrejöhet-e specifikus kölcsönhatás a szerkezeti rokon S100A4 és az SPC, valamint egyéb, biológiaiilag aktív lipidek között. Szingozin (SPH), szfingozin-1-foszfát (S1P), lizofoszfadilkolin (LPC), lizofoszfatidsav (LPA) és SPC apo- és holo-S100A4 fehérjére gyakorolt hatását vizsgáltuk az S100A4 tirozin, és az F45W mutáns kötőárhának szélén elhelyezkedő triptofán fluoreszcenciaváltozása alapján. A CaM

fehérjével kapott eredményekhez hasonlóan az SPC, és kisebb mértékben az SPH egyértelmű kötődést mutatott mind az apo-, mind a  $Ca^{2+}$ -telített S100A4-hez. A lipiddel történő titrálás során kooperatív kötődést tapasztaltunk a kritikus micellaképződési koncentráció feletti látszólagos Kd értékkel, így valószínűsíthető, hogy az SPC micellaként kötődik a fehérjéhez. LPA esetén szintén specifikus kötést találtunk, azonban gyengébb kooperativitással. Mivel a CaM és az LPA között nincs kölcsönhatás, feltételezhető, hogy az SPC és az LPA más-más mechanizmussal kötődik az S100A4-hez. Jelenleg vizsgáljuk a specifikusan kölcsönható lipidek jelenlétében az S100A4 miozin filamentum összeszerelődésre és disszociációra gyakorolt hatását, mely folyamatok a citoskeleton átrendeződésén keresztül jelentősek a rákos sejtek metasztázisában.

#### **P6-07 Komplementrendszer-gátlók kifejlesztése irányított evolúcióval**

Kocsis A.<sup>1</sup>, Závodszky P.<sup>1</sup>, Gál P.<sup>1</sup>, Pál G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A komplementrendszer szabályozatlan aktiválódása komoly betegségek (pl. Alzheimer-kór, szélütés, iszkémia-reperfüziós károsodás, reumatoid arthritis) kialakulásához vagy súlyosbodásához vezethet. A komplement három aktivációs útvonala (klasszikus, alternatív és lektinút) eltérő mértékben vehet részt egy-egy kóros folyamatban, így diagnosztikus és terápiás szempontból egyaránt nagy szükség lenne útvonalszelektív inhibitorokra. Mivel ilyenek nem ismertek, elhatároztuk, hogy létrehozzuk ezek első prototípusát. A mannózkötő lektinasszociált szerin proteáz 2 (MASP-2) a lektinút kulcsenzime. Amint a szervezetbe jutó patogén jellegzetes felszíni glikánmintázatát egyes lektinek felismerik, az ezekhez kapcsolódó MASP-2 autoaktiválódik, és beindítja a komplementrendszert. Feltételeztük, hogy a MASP-2-szelektív gátlásával a lektinút specifikusan és tökéletesen gátlható. MASP-2-inhibitorok tervezését nehezíti, hogy a szérumban számos hasonló szerin proteáz működik (lásd pl. komplement, véralvadás, fibrinolízis), így irányított evolúciós megközelítést, fágbemutatósi módszert alkalmaztunk. Ehhez a napraforgóból származó, legkisebb természetes tripszininhibitorból, a 14-aminosavas SFTI molekulából indultunk ki. Hat pozíció teljes randomizálásával tízmilliárd variánst tartalmazó könyvtárat hoztunk létre, és ezt MASP-1 és MASP-2 enzimeken szelektáltuk. A szelektált klónok konszenzusszekvenciái alapján két peptidet állítottunk elő. Ezek gátló hatását megmértük MASP-1 és MASP-2 enzimeken, a komplementaktiválás három útján, és a véralvadás rendszerén. Az egyik peptid mind a MASP-1, mind a MASP-2 enzimet gátolja, szelektíven gátolja a lektinut, de a véralvadásra is hat. A másik peptid szelektíven MASP-2-inhibitor, a lektinut szelektíven gátolja, és alig hat a véralvadásra. Kifejlesztettük tehát az első lektinútra szelektív inhibitorokat, amelyek mind alapvető, mind diagnosztikai és terápiás szem-

pontból ígéretesek. (G.P. és P.G. hozzájárulása egyenértékű volt.)

#### **P6-08 A TATA-kötőfehérjéhez társult faktor (TAF3) hatásának vizsgálata p53-függő promótereken**

Ludányi M. Á.<sup>1</sup>, Berezcki O.<sup>2</sup>, Boros I.<sup>2</sup>, Bálint É.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BZAKKA, BAYGEN, Szeged; <sup>2</sup> SZTE TTK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A TAF3 a TFIID általános transzkripció faktor komplex egyik alegysége, mely részt vesz a specifikus és az általános transzkripció faktorok közötti kapcsolat kialakításában, ez által számos transzkripció faktor számára koaktivátorként működik. Újabban kimutatták, hogy izomsejt-differenciáció során a TAF3 fehérje mennyisége megnő, tehát differenciációspecifikus promóterek aktivációjában funkcionálhat. Továbbá a TAF3 PHD (növényi homeodomén) doménje segítségével kötődni tud a hiszton H3 trimetilált lizin 4-hez, így szerepe lehet bizonyos promóterek epigenetikai szabályozásában. Kutatócsoportunk a korábbiakban a p53 kötőpartnereként azonosította a TAF3-t. Kimutattunk *in vitro* és *in vivo* módszerekkel, hogy a kölcsönhatás evolúciósan konzervált, mert mind *Drosophila melanogaster* TAF3 és p53, mind humán TAF3 és p53 között fennáll. Megállapítottuk, hogy érdekes módon, a TAF3 nem hat koaktivátorként a p53-ra, hanem erősen csökkenti annak transzkripció aktivitását. A továbbiakban megvizsgáltuk a TAF3 hatását különböző p53-függő promótereken luciferáz-riporter aktivitásméréssel. Azt találtuk, hogy a vizsgált sejtvonalakban a TAF3 nem gátolja a BAX (BCL2-asszociált X-fehérje) promóter aktivitását. Az IGFBP3 (inzulinszerű növekedési faktort kötő protein 3) promóter és a mesterséges, p53-függő PG13 promóter aktivitását oszteoszarkómasejtekben gátolja, de emlőkarcinómasejtekben nem. A TAF3 erősen represszálja az mdm2 promóter aktivitását minden vizsgált sejtvonalban. Jelenleg a represszióért felelős promóterelemek azonosítását végezzük, és megvizsgáljuk, hogy a TAF3 befolyásolja-e a promóterek UV-indukálhatóságát.

#### **P6-09 A szöveti transzglutaminázzal kölcsönható fehérjék keresése differenciálódott NB4 sejtekben**

Német I., Csósz É., Fésüs L., Balajthy Z.

DE OEC, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet, Debrecen

A szöveti transzglutamináz (TG2) enzim megtalálható a sejtek citoszóljában, sejtmagjában, mitokondriumaiban és az extracelluláris mátrixban. Intracelluláris fehérjeként rendelkezik  $Ca^{2+}$ -függő keresztkötő, membránfelszíni GTP-áz és szerin/treonin kinázaktivitással, extracelluláris térben integrinreceptorok koreceptoraként is hathat, s az egyes immunsejtek terminális differenciációjában betöltött szerepe is ismert. All-transz retinsavas (ATRA) kezelés hatására az NB4 sejtek neutrofil granulocita irányba differenciálódnak. Munkacso-

portunk kimutatta, hogy a humán promielocita NB4 sejtvonal neutrofil granulocita irányba történő differenciálódásakor a TG2 kifejeződése mind gén szinten, mind fehérje szinten jelentősen fokozódik, és módosítja egyes gének (pl. GP91) expresszióját [Balajthy et al. (2006) *Blood*, **108**: 2045-2054]. Munkahipotézisünk szerint a TG2 fehérje-fehérje-kölcsönhatások segítségével is részt vesz ebben a folyamatban. Irodalomból eddig a TG2 néhány partnere ismert, ezért célul tűztük ki új kölcsönható partnerek azonosítását. A differenciálódott sejtek lízise után monoklonális vagy poliklonális TG2-ellenes, illetve izotípus-azonos kontroll antitesttel immunprecipitációt végeztünk. A precipitálódott fehérjéket egy- vagy kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd Coomassie Brilliant Blue, vagy Sypro Ruby festést követően a specifikus fehérjesávokat szoftver segítségével azonosítottuk. A kivágott fehérjesáv gélben történő emésztését követően tömegspektrometriával kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékromatográfiás (HPLC-MS-MS) analízissel azonosítottuk a fehérjéket. A kísérleti eredmények validálása céljából az azonosított fehérje elleni antitesttel immunprecipitációt végzünk.

#### **P6-10**

#### **Az LC8 dinein-könnyűlánc (DYNLL) kötőmotívumának *in vitro* evolúciója fágbemutató segítségével: egy kompetitív gátlószer fejlesztésének első lépése**

Rapali P., Nyitray L., Pál G.

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest

A DYNLL konzervatív, homodimer, eukarióta csomóponti fehérje. Több tucat fehérje szabályozásában játszik szerepet, az esetek többségében a kölcsönható partnerek dimerizációját elősegítve. Számos biológiai folyamatban (pl. intracelluláris transzport, apoptózis, tumorigenezis) érintett. A DYNLL dimerizációs felszínén kialakuló két árokba kötődnek a partnerfehérjék rendezetlen régióinak X(D/S)KXTQT(D/E) konszenzusmotívumai. Megvizsgáltuk, hogy *in vitro* evolúcióval létrehozható-e a természetes szekvenciáknál nagyobb affinitású DYNLL-kötő peptid. Fágbemutatóval hétaminosavas naív peptidkönyvtárat hoztunk létre. A konzervatív centrális Gln aminosavat (0. pozíció) változatlanul hagytuk, a többi pozícióban megengedtük mind a 20 aminosav beépülését. A könyvtár mérete  $2,1 \times 10^{10}$  volt, így csaknem a teljes szekvenciateret lefedtük. A peptideket leucincipzár segítségével bivalens formában mutattuk be M13 fágok p3 burokfehérjéjén, kihasználva a DYNLL dimer jellegéből adódó aviditást. Négy szelekciós ciklus után 25 klónt azonosítottunk. A természetes szekvenciamintázattól a leglényegesebb eltérés a -4. pozícióban lévő konzervált Asp hiánya és az -5. pozícióban lévő Val magas aránya. Mono- és bivalens természetes és szelektált konszenzus-peptidek kinetikai és termodinamikai tulajdonságait hasonlítottuk össze. A természetes DYNLL-kötő peptideknél a monovalens és bivalens ligandumok  $K_d$ -értéke 1-10  $\mu\text{M}$  és 3-40 nM. Az *in vitro* evolúció-

val ezeknél két nagyságrenddel nagyobb affinitású szekvenciát tudtunk előállítani. A DYNLL egyik funkciója, hogy képes egyes proapoptotikus fehérjéket (Bim, Bmf) a sejtvázhoz szekvesztrálni, ezáltal sejttúlélést kiváltani. Ez a jelenség állhat egyes tumorok MAP-kináz-inhibitorokra mutató rezisztenciájának hátterében, amit a DYNLL-Bmf-interakció gátlásával ki lehet küszöbölni. Jövőbeni kísérletek fogják eldönteni, hogy a nagy affinitású szintetikus DYNLL-kötő peptidekkel tumor sejtvonalakban fokozni tudjuk-e a természetes sejthalált.

#### **P6-11**

#### **MvaI, egy kettős specifitással rendelkező restrikciós endonukleáz**

Stier I., Kiss A.

MTA SzBK, Biokémia Intézet, Szeged

Az MvaI restrikciós endonukleáz a *Micrococcus varians* RFL19 törzs (ma *Kocuria varians*) MvaI restrikciós-modifikációs rendszerének része. Az enzim a CC/WGG (W = A vagy T) szekvenciát ismeri fel, és a '/' jelnek megfelelő helyen hasítja. A keletkező DNS-fragmentumok egyetlen nukleotidból álló 5'-túlnyúló véget hordoznak. Az enzim monomerként működik, és a DNS-duplexet két, egymástól független, egyszálú vágással hasítja. A két szál hasításának sebessége jelentősen eltér. Kimutattuk, hogy az MvaI azzal a különleges tulajdonsággal rendelkezik, hogy az ismert szubsztráthely (CCWGG) mellett képes a CCCGGG szekvenciák egy részének hasítására is, amennyiben a megfelelő (aláhúzással jelölt) citozin metilált (5-metil-citozin), s a hely szekvenciakörnyezete megfelelő. A szubsztrátszekvenciák körének pontos meghatározása folyamatban van. Eddigi eredményeink szerint az MvaI legjobban a CCCCGGC és a TCCCGGC helyeket emészt, előbbi kb. tízszer lassabban, mint a CCWGG helyeket. Jóval alacsonyabb, de kimutatható sebességgel vágja a GCCCGGT helyeket is. A CG szekvenciáknál *in vitro* metilált, majd MvaI-emésztett DNS-fragmentumok szekvenálásával kimutattuk, hogy a hasítás a metilált citozin 3'-oldalán történik, azaz tompa végű fragmentum keletkezik: CCC/GGG.....GGG/CCC Tudomásunk szerint az MvaI enzim az első olyan restrikciós endonukleáz, amelyről kimutatták, hogy a kanonikus metilátlan felismerőhelye mellett egy másik, metilált szekvenciát is hasít.

#### **P6-12**

#### **A hisztonacetilációs mintázat vizsgálata a többszörös gyógyszer-rezisztenciát okozó MDR1 gén szabályozó régióiban**

Tóth M.<sup>1</sup>, Molnár J.<sup>2</sup>, Boros I.<sup>3</sup>, Bálint É.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BZAKKA, BAYGEN, Szeged; <sup>2</sup> SZTE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet, Szeged;

<sup>3</sup> SZTE TTK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A kemoterápia sikertelenségének oka gyakran a többszörös gyógyszer-rezisztencia (MDR), melyet kiválthatja az MDR1 gén amplifikációja és/vagy epigenetikus változás miatti megemelke-

dett expressziója. Célunk a hisztonacetiláció és a hiszton acetyl-transferázok (HAT) szerepének vizsgálata az *MDR1* gén expressziójának szabályozásában. Megvizsgáltuk az *MDR1* gén és az mRNS szintjét QRT-PCR technikával a doxorubicinérzékeny MCF7 emlőkarcinóma szülői sejtekben és annak hosszú idejű doxorubicin-kezeléssel előállított doxorubicinrezisztens MCF7-KCR leánysejtjében. Az *MDR1* gén szintje 15-szeresére, expressziója 30-ezerszeresére nőtt a gyógyszer-rezisztens sejtekben az érzékenyekhez képest. Ez arra utal, hogy a rezisztencia kialakulásáért nagy részben az *MDR1* megemelkedett transzkripciója lehet a felelős. A sejtvonalak általános hiszton-acetiláltságának összehasonlítása azt mutatta, hogy a H3 hiszton acetyláltsági szintje megemelkedett a gyógyszer-rezisztens leánysejtben a szülői sejtekhez képest. A továbbiakban az *MDR1* gén szabályozó és egyéb régióihoz kötődő hisztonok acetylációját vizsgálva kromatin-immunprecipitációt végeztünk acetyl-lizin-specifikus ellenanyagokkal (H3K4, H3K9, H3K14, H4K8, H4K12). Az *MDR1* 3' irányú (*downstream*) promóter régiójában és első exon régiójában a H3 K9 lizin acetyláltsági szintje sokszorosára növekedett az *MDR1* gént expresszáló MCF7-KCR sejtekben az *MDR1*-expressziójú MCF7 sejtekhez képest. A hisztonacetylációs mintázat módosítása céljából a sejteket trichostatin A (TSA) hiszton-deacetyláz-gátlóval és HATi II hiszton-acetyl-transferáz-inhibitorral kezeljük.

#### P6-13

##### Humán kimotripszin C elleni inhibitorok létrehozása irányított evolúcióval

Zboray K.<sup>1</sup>, Héja D.<sup>1</sup>, P. Medveczky<sup>2</sup>, M. Sahin-Tóth<sup>2</sup>, Pál G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest;

<sup>2</sup> Department of Molecular and Cell Biology, Boston University, Boston, USA

Korábbi *in vitro* kísérletek alapján a kimotripszin C

(KimoC) fontos szabályzó enzim, amely a fő tripszinforma, a kationos tripszin aktiválódásának és lebomlásának ütemét befolyásolja. A KimoC enzim inaktív proenzimként termelődik a hasnyálmirigyben, csakúgy, mint a többi pankreatikus proteolitikus enzim (kationos és anionos tripszin, mezotripszin, kimotripszin B1 és B2, elasztáz 2A, 3A, 3B, karboxipeptidáz A1, A2 és B1). A vékonybélbe kerülő proenzimek közül elsőként a tripszinogének aktiválódnak az enterokináz által, majd a tripszinek aktiválják a többi proenzimet, köztük a még nem aktivált tripszinogéneket. A tripszinaktivált KimoC szelektíven hasítja a kationos tripszinogént, és ez a hasított forma gyorsabban aktiválható kationos tripszinnel, mint az intakt, s ezen pozitív visszacsatolás miatt a kationos tripszin keletkezése felgyorsul. A folyamat csak a vékonybélre jellemző magas Ca<sup>2+</sup>-koncentráció mellett szelektív. Az alsóbb bélszakaszokra jellemző alacsony Ca<sup>2+</sup>-koncentráción megjelenik a KimoC merőben más aktivitása is: szelektíven hasít egy peptidkötést a kationos tripszin Ca<sup>2+</sup>-ionoktól megfosztott kalciumkötőhelyén. Ez a hasítás – pozitív visszacsatolás módján – gyorsítja a tripszin önemésztését, ami egyfajta védő funkciót tölthet be, hiszen a vastagbélbe lejutó, funkcionál nélküli proteázok károsíthatják a bélfalat. Az *in vitro* mérésekre alapozott következtetéseket nehéz *in vivo* ellenőrizni, mivel a KimoC-nek nincs ismert, szelektív inhibitora. Elhatároztuk, hogy irányított evolúcióval létrehozunk ilyen inhibitorokat. M13 fágon kifejeztünk az SGPI-2 proteázinhibítort, és 6 pozíciót randomizáltunk a proteázkötő hurokban. A többmilliárd variánst tartalmazó könyvtárat KimoC enzimmel szelektáltuk, a klónok konszenzus-szekvenciája számos ponton jellegzetes egyezést mutat az említett *in vivo* subsztrátok megfelelő szekvenciáival. A konszenzusszekvencia alapján előállított és kinetikailag jellemzett variánsokat *in vivo* kísérleteinkben, valamint a humán KimoC szerkezetének felderítésére fogjuk használni.

## P7 – Humán betegségek molekuláris biológiája

#### P7-01

##### Az *ABCC6* gén, mint rizikófaktor a szívkoszorúér megbetegedés kialakulásában

Arányi T.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az *ABCC6* génben előforduló funkcióvesztéses mutációk egy *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) nevű ritka (1:25.000-1:150.000), recesszíven öröklődő genetikai betegséget okoznak, melynek vezető tünete a bőr, az erek és a szem elasztikus rostjainak kalcifikációja. A kezdeti bőrgyógyászati tünetek után látásromlás, és a keringési rendszert érintő súlyosabb kórképek jelentkeznek. A szívkoszorúérmegbetegedés (CAD) és a *stroke* megemelkedett előfordulását írták le a PXE betegek körében. A beteg mutációt hordozó egészséges rokonaiban is megfigyeltek enyhébb szubklinikai tüneteket, például az elasztikus rostok kismértékű kalcifikációját a bőrben. Egy korábbi tanulmányban már leírták

a CAD és a leggyakrabban (20-30%) előforduló c.3421C>T mutáció kapcsoltágát. A vizsgálatot azonban a mai napig nem ismételték meg, annak ellenére, hogy a mutáció a vártnál jóval magasabb előfordulást mutatott a kontroll populációban. Ez az eredmény ellentmond a PXE irodalmi gyakoriságának, ezért a tanulmány megbízhatósága megkérdőjelezhető. Munkánkban a már leírt összefüggést kívántuk igazolni, továbbá az *ABCC6* génben előforduló c.3421C>T funkcióvesztést okozó mutáció és az ischaemiás *stroke* közötti kapcsoltágat is vizsgáltuk. Kontrollként 749 egészséges véréadó genomiális DNS-ét használtuk 363 ischaemiás *stroke*-ban szenvedő, és 361 CAD-os beteg vizsgálatához. A c.3421C>T mutáció jelenlétét vagy hiányát a kérdéses nukleotidot tartalmazó PCR-termék olvadáspont-analízisével határoztuk meg. A kontroll csoportban 1 hordozót azonosítottunk, ami megfelel ezen mutáció széles körben elfogadott előfordulási gyakoriságának. Nem tapasztaltunk

szignifikáns összefüggést a hordozó státusz és a stroke között, ezzel szemben szignifikáns összefüggés mutatkozott a CAD esetében (5/361 hordozó  $p=0,016$  OR=10,5). Jelen munkánkkal megerősítjük, hogy a c.3421C>T hordozó státusz rizikófaktor a szívkoszorúér megbetegedésekben.

## P7-02

### PARP-1 és PARP-2 szerepe kontakt hiperszenzitivitási reakcióban

Brunyánszki A.<sup>1</sup>, Hegedűs Cs.<sup>1,2</sup>, Szántó M.<sup>1</sup>, Gergely P.<sup>1,2</sup>, Virág L.<sup>1,2</sup>, Bai P.<sup>1,2</sup>

DE OEC<sup>1</sup> Orvosi Vegytani Intézet; <sup>2</sup> MTA Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutató Csoport, Debrecen

A poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 és -2 (PARP-1, -2) aktivációjuk során NAD<sup>+</sup>-ot használnak szubsztrátként különböző hosszúságú poli-(ADP-ribóz) (PAR) polimerek kialakításához, amelyeket kovalensen kötnek különböző akceptor fehérjék glutamátcsoportjához. Kiemelkedő szerepük van a génextpresszió szabályozásában transzkripció kofaktorként (pl. NFκB) gyulladási folyamatokban, így a kontakt hiperszenzitivitási reakcióban (CHS). A CHS T-sejt-mediált, késői hiperszenzitivitási reakció, amely állatmodelleken lipofil ágenssel (esetünkben oxazonon) váltható ki. A CHS reakció két szakaszra bontható: szenzibilizációra és elicitációra. Előbbi során az immunrendszer először találkozik az allergénnel és kialakul az aktív immunitás, utóbbiban az immunrendszer újból találkozik az vegyülettel, amely aktív immunválaszt indukál, és 24 óra elteltével megjelennek a jellemző tünetek, gyulladás, ödémaképződés. Célkitűzésünk volt a PARP-1 és -2 enzimek szerepének vizsgálata és molekuláris szerepük pontos meghatározása a hiperszenzitivitási reakció során. Kísérleteinkben vad típusú, illetve *PARP-1*<sup>-/-</sup> és *PARP-2*<sup>-/-</sup> egereket használtuk fel. A szenzibilizáció során oxazononnal (4-etoxi-metilén-2-feniloxazol-5-on) kezeltük az egereket borotvált hasbőrét, majd egy héttel később az elicitáció során a gyulladást az egerek fülén váltottuk ki. Az oxazonon okozta gyulladás mértékét fülvastagodás meghatározásával és mieloperoxidáz (MPO) enzimaktivitás mérésével határoztuk meg. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy CHS-ben a PARP-1 enzim hiánya nagymértékben befolyásolja a gyulladást, míg a PARP-2 hiánya egyáltalán nem okoz változást, ezért a továbbiakban csak a *PARP-1*<sup>+/+</sup> és a *PARP-1*<sup>-/-</sup> egereket vizsgáltuk. Hematoxin-eozin festéssel és génextpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az oxazonkezelt *PARP-1*<sup>-/-</sup>-mintákon alacsonyabb az infiltráló sejtek mennyisége, és ezzel együtt a kemokinek, az adhézións molekulák és a mátrix metalloproteináz-9 expressziós szintje is csökken az oxazonindukált *PARP-1*<sup>+/+</sup> egerekhez képest. A gyulladás során jelentős mennyiségű peroxinitrit képződik összhangban az iNOS fokozott expressziójával, melyet a gyulladás során infiltráló sejtek expresszálnak. A *PARP-1*<sup>-/-</sup> egerekben mind az iNOS expressziója, mind a gyöktermelődés csökkent mértékű a vad tí-

pushoz képest. Kimutattuk a gyulladt fülékben a gyöktermelődés által kiváltott PARP-1-aktivációt PAR immunfestéssel, amely a *PARP-1*<sup>-/-</sup> egerekben elmaradt. A PARP-1 enzim tehát fontos résztvevő a CHS folyamatában, illetve a CHS PARP-inhibitorokkal befolyásolható. Irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy az NFκB transzkripció faktor működési zavara állhat az általunk leírt változások mögött, így további kísérleteink ennek bizonyítására irányulnak. (Bolyai ösztöndíj (BP), OTKA NFF 78498, K60620, K60780, Mecenatúra DE-OEC Mec-1/2008, Egészségügyi Minisztérium ETT 12/2006)

## P7-03

### A poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) szerepének vizsgálata a kontakt hiperszenzitivitási gyulladási folyamataiban

Hegedűs Cs.<sup>1,2</sup>, Bai P.<sup>1,2</sup>, Szabó É.<sup>3</sup>, Virág L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen;

<sup>2</sup> MTA DE, Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport; <sup>3</sup> Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen

A poli-ADP-riboziláció a fehérjék poszttranszlációs módosításának egy formája, melyet a poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek katalizálnak. A PARP enzimes család legismertebb tagja a PARP-1, mely főleg DNS-törés hatására aktiválódik, homodimereket alkot, és a DNS-törésekhez kapcsolódik. Az aktivált PARP a NAD<sup>+</sup>-ot ADP-ribózzá és nikotinamidra hasítja, majd az ADP-ribóz részt a megfelelő akceptorfehérjék glutamát-oldalláncához csatolja. A PARP-1 – az NFκB transzkripció faktor koaktivátoraként – citokinek expresszióját szabályozza különböző gyulladási modelleken. Túlzott PARP-aktiváció a sejt NAD<sup>+</sup>-készleteinek deplécióját okozhatja, ami sejt-diszfunkcióhoz vagy a sejtek pusztulásához vezet. A kontakt hiperszenzitivitási (CHS), késői típusú hiperszenzitivitási reakció, két részre osztható: szenzitivitációs fázisra és effektor fázisra. Utóbbiban fontos szerepet játszik a proinflammatorikus citokinek termelődése, limfociták és granulociták infiltrációja, melyhez erős oxidatív stressz társul. Irodalmi adatok alapján a PARP gátlása vagy a *PARP-1* gén kiütése jelentősen csökkenti a gyulladási reakciókat (kolitisz, arthritisz, uveitisz). Jelen vizsgálatunk arra irányult, hogy feltárjuk a poli-ADP-riboziláció szerepét CHS-ben. Vizsgálatunkat oxazonnal kiváltott CHS egérmoldellen végeztük. Eredményeink alapján a PARP szerepet játszik a CHS során kialakuló ödémaképződés és neutrofilinfiltráció, a citokin expressziójának és a mátrix metalloproteináz (MMP) aktivációjának folyamataiban. A PARP irritatív dermatitisben is befolyásolja a duzzanat és neutrofil infiltráció mértékét. Tehát a PARP mind az antigén által kiváltott, immunmediált gyulladást, mind a nem antigénspecifikus általános gyulladási útvonalat modulálja. (Bolyai ösztöndíj (BP), ESz), OTKA NFF 78498, K60620, K60780, Mecenatúra DE-OEC Mec-1/2008, Egészségügyi Minisztérium ETT 12/2006)



#### P7-04

##### A metabolikus szindróma arginin-anyagcsereutakra gyakorolt hatásainak vizsgálata patkányokban

Hrabák A.<sup>1</sup>, Bajor T.<sup>2</sup>, Körner A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> Spinner Hungary Kft., Szekszárd; <sup>3</sup> SE, I. sz. Gyermekegyógyászati Klinika, Budapest

A metabolikus szindróma az elhízás következtében kialakuló tünetegyüttes, amely elsősorban kardiovaszkuláris rendellenességekkel, valamint szénhidrát- és lipidanyagcsere-zavarokkal jár. A szindróma különböző tüneteinek hátterében az arginin-anyagcsere, ezen belül főleg az NO-szintézis zavarát is sikerült kimutatni. Vizsgálatainkban sovány kontroll és elhízott Zuckerpatkányok különböző szerveiben és szöveteiben mértük a NOS izoenzimét és az argináz aktivitását és expresszióját. A kövér állatok testtömege és vércukorszintje szignifikánsan magasabb a kontroll állatokénál. A NOS I aktivitása az agy és kisagy esetében csökkent, vese, szív és zsírszövet esetén magasabb volt a kövér állatokban. A NOS II az agyban magasabb, a tüdőben alacsonyabb volt a kövér állatokban. A NOS III esetén a különbségek nem szignifikánsak, az aktivitások igen alacsonyak voltak. Az argináz a kövér állatok kisagyában, veséjében és zsírszövetében volt magasabb, a szívizomban alacsonyabb a kontrollhoz képest. Az enzimek expressziója az aktivitással szinkronban változott, tehát a különbségek az enzimszintézis módosulásával magyarázhatók. A kövér patkányok vérében és vizeletében a nitrit+nitrát-szint emelkedett, valamint nőtt a makrofágok nitrittermelése, a NOS II aktivitása és expressziója is. Szignifikánsan nőtt a kövér állatok makrofágjainak fagocitózisa is. A kövér állatok vérében az adiponektin szintje alacsonyabb, a leptin és rezisztin magasabb volt, az IL-6 nem változott. Eredményeink arra mutatnak, hogy a metabolikus szindróma hatására az arginin-anyagcsereutak viszonya több szervben (elsősorban az agyban) megváltozik.

#### P7-05

##### Humán könny proteomikai karakterizálása tömegspektrometriás módszerrel

Lábiscsák P., Boross P., Tózsér J.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A könny a szem felszínét borító és különböző funkciókat ellátó folyadék réteg. A klinikumban általánosan elterjedt könnydiagnosztikai módszerek általában figyelmen kívül hagyják a könny fehérje-összetételében történő változásokat. Az elmúlt években különböző proteomikai technikák felhasználásával végzett könnyvizsgálatok során közel 500 fehérjét azonosítottak. Célunk egy olyan tömegspektrometriás analízisen alapuló módszer beállítása volt, melynek segítségével a nem invazív módon gyűjtött könnymintákból minél több fehérje kimutatása válhat lehetségessé, és kiindulási ala-

pot biztosíthat a további összehasonlító proteomikai vizsgálatokhoz. Egészséges önkéntesektől (28 fő) kapilláris technika segítségével gyűjtött, egyesített (*pool*) könnymintákat vizsgáltunk. A minták egy részét tripszinnel oldatban emésztettük, másik részét SDS-PAGE-elválasztás után a gélből kivágtuk és tripszinnel emésztettük. Az oldatban emésztett és a gélből kinyert peptideket a 4000 QTRAP LC-MS/MS tömegspektrométerre injektáltuk. Az adatok kiértékeléséhez a Protein Pilot és a Mascot kereső-szoftvereket alkalmaztuk. A két technika és a két keresőprogram segítségével összesen 47 fehérjét sikerült azonosítani. A következőkben ezen adatok felhasználásával, a talált fehérjék mennyiségi analízisét tervezzük. Célunk a nem invazív mintavételnek köszönhetően egy tömegspektrometrián alapuló pontos és gyors eljárás kivitelezése, mellyel a betegségekre specifikus biomarkerek megtalálása és a betegségek korai és gyors diagnózisa válna lehetővé.

#### P7-06

##### A $\beta$ 2-mikroglobulin amiloid képződésének új kinetikai modellje és a törés szerepe az elongációban

Micsonai A.<sup>1</sup>, Karsai Á.<sup>2</sup>, H. Yagi<sup>3</sup>, Kellermayer M.<sup>2</sup>, Y. Goto<sup>3</sup>, Kardos J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> PTE ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs; <sup>3</sup> Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

Az amiloidképződés mechanizmusáról, annak molekuláris hátteréről ma még keveset tudunk. A polimerizációs reakció elemi lépéseinek vizsgálata és kvantitatív jellemzése nehéz feladat. A  $\beta$ 2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) az MHC-I könnyű lánc, de monomer formában is megtalálható a vérben. Vesedialízises betegekben a monomer fehérje koncentrációja jelentősen megnő, ami amiloid-lerakódásokhoz vezet. Munkánk során atomerő-mikroszkópos (AFM) és elektronmikroszkópos (EM) technikát alkalmaztunk a  $\beta$ 2m amiloidszálak számának és hosszának meghatározásához, melyből az elongáció kinetikai paramétereire lehet következtetni. A polimerizáció teljes kinetikáját thioflavin-T-fluoreszcencia segítségével követtük. Alacsony monomerkoncentrációt alkalmazva (ezzel kizárva a spontán nukleáció lehetőségét) magindukált reakciók során vizsgáltuk az elongáció sebességét befolyásoló tényezőket. (1) A szálak növekedési sebessége a monomerkoncentráció függvényében telítési görbét mutat, amelyre jól illeszthető a Michaelis-Menten-kinetika, és meghatározhatók a  $K_M$  és  $k_{cat}$  értékek, ahol  $k_{cat}$  az időegység alatt beépülő monomerek egységeinek számának felel meg. Ez arra utal, hogy az amiloidszálak hosszabbodása többlépéses folyamatként zajlik, amelyben a monomerek gyors kötődését egy sebesség-meghatározó, lassú lefolyású konformációváltozás követi. (2) A kevés maggal indukált polimerizáció kezdeti, lineáris lefutású szakasza után tapasztalható hirtelen sebességnövekedési szakasz a hosszú szálak spontán fragmentálódásának eredményeképpen mutatkozik. Ennek *in vivo* jelentősége az lehet, hogy a betegség korai szakaszában kialakuló kevés

nukleációs magból növekvő szálak eltörnek, aminek következtében az amiloid-képződés sebessége rohamosan megnő, valamint metasztatizisok, áttétek keletkezhetnek.

#### **P7-07**

##### **A lizofoszfátidsav szerepe a $\beta$ 2-mikroglobulin amiloidképzésében**

Pál-Gábor H.<sup>1</sup>, Gyimesi G.<sup>1</sup>, Gombos L.<sup>2</sup>, Kovács J.<sup>3</sup>, Liliom K.<sup>1</sup>, Kardos J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup> ELTE TTK <sup>2</sup> Biokémiai Tanszék, <sup>3</sup> Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

A vesedialízishez kötött amiloidózis során a  $\beta$ 2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) amiloidszálak formájában lerakódik a betegek szervezetében, súlyos mozgásszervi problémákat okozva. Mindmáig nem tisztázott, mely tényezők játszanak szerepet az amiloidképződésben fiziológias körülmények között. Mivel a megemelkedett fehérjekoncentráció önmagában még nem elég a szálak kialakulásához, egyéb, a vérben jelen lévő faktorok szerepét valószínűsítik. Munkánk során a vérben előforduló lizofoszfolid mediátor, a lizofoszfátidsav (LPA) szerepét vizsgáltuk a  $\beta$ 2m aggregációjában. Fluoreszcencia- és CD-spektroszkópiával, valamint DSC-mérésekkel kimutattuk, hogy az LPA kölcsönhat a natív, monomer  $\beta$ 2m-molekulákkal, és destabilizálja azok szerkezetét. Ezáltal a fehérje amiloidképzésre hajlamos állapotba kerül, és amiloidmagok jelenlétében szálnövekedés lép fel. ITC-mérésekkel vizsgáltuk a monomer  $\beta$ 2m és az LPA-micellák kölcsönhatását: a mért 520 nM egyensúlyi disszociációs állandó erős kötődésre utal. Megállapítottuk továbbá, hogy az LPA képes stabilizálni az amiloidszálak szerkezetét, megvédve őket a depolimerizációtól. A továbbiakban célul tűztük ki az LPA kötőhelyének meghatározását a fehérje felszínén. Feltételezzük, hogy a lipid és a fehérje között elektrosztatikus kölcsönhatás jön létre, amelyben az LPA negatív feji csoportjai és a  $\beta$ 2m pozitív lizin- és argininoldalláncai vesznek részt. A lehetséges kötőhelyek meghatározására *in silico* dokkolásos kísérleteket végeztünk. A dokkolás eredményeit felhasználva egyes lizin- és argininoldallancokat alanin aminosavra cseréltünk le, és vizsgáltuk a mutációk hatását a szálképződésre. Eredményeink hozzájárulhatnak a  $\beta$ 2m mikrotubulin amiloidképzésének jobb megértéséhez.

#### **P7-08**

##### **Sleeping Beauty transzpozon alapú génbevitel: GFP-címkézett ABCG2 multidrogtranszporter-variánsok karakterizálása stabil sejtvonalakban**

Schamberger A.<sup>1</sup>, Kasza I., Homolya L., Sarkadi B., Orbán T.

MTA –SE, Membránbiológiai Kutatócsoport, Budapest

Az ABCG2 féltranszporter megnövekedett expressziója tumorsejtekben multidrogrezisztenciafenotípus kialakulásához, ezáltal a kemoterápiás

kezelések sikertelenségéhez vezethet. Kimutattuk, hogy a fehérje N-terminálisán GFP-címkézett formája (GFP-G2) megőrzi működőképességét, és a fúziós fluoreszcens fehérje tranziens expressziós rendszerekben jól használható a multidrog-transzporter többszörös tesztelésére. Felmerült azonban az igény stabil, GFP-G2 proteint expresszáló sejtvonalak iránt, amelyekben a gén kifejeződése a sejt differenciáció különböző stádiumaiban is vizsgálható. *Sleeping Beauty* (SB) transzpozon alapú rendszert használtuk stabil sejtvonalak létrehozására. Ennek előnye a virális génbeviteli rendszerekkel szemben, hogy az integráció során nem mutat preferenciát az aktívan átíródó gének irányába. HEK293 és MDCKII sejtvonalakban igazoltuk, hogy a transzpozonos konstrukciók megfelelően működnek, és FACS-leválogatással, szelekció nélkül stabil sejtvonalak hozhatók létre. A vad típusú GFP-G2 fehérje funkcionális (pl. mitoxantrontranszport) tesztekben jól működött, és differenciált polarizált sejtekben megfelelő lokalizációt mutatott. Két vizsgált fehérjevariáns GFP-címkézett formája azonban a vad típustól eltérő lokalizációt adott, s az egyik mutáns nem volt alkalmas GFP-pozitivitáson alapuló FACS-leválogatással stabil MDCKII sejtvonalak létrehozására. Vizsgálataink további célja felderíteni, mi okozza a különböző mutánsok sejtvonal-specifikus tulajdonságait.

#### **P7-09**

##### **Coeliákias fágkönyvtárból transzglutamináz 2- és deamidált gliadinpeptid-specifikus egy-láncú variábilis fragmentek szelekciója**

Simon-Vecsei Zs.<sup>1</sup>, Király R.<sup>1</sup>, F. Ziberna<sup>2</sup>, F. Florian<sup>3</sup>, D. Sblattero<sup>4</sup>, Fésüs L.<sup>1</sup>, Korponay-Szabó I. R.<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; <sup>2</sup> Pediatric Medicine Laboratory, <sup>3</sup> Department of Biology, University of Trieste, Trieste, Italy; <sup>4</sup> Department of Medical Sciences, IRCAD, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; <sup>5</sup> DE OEC, Gyermekklinika, Debrecen; <sup>6</sup> Heim Pál Gyermekkórház, Budapest,

A coeliákia a vékonybél malabszorpciós szindrómája, kiváltó faktora a táplálékkal bevitt glutén, mely a szöveti transzglutamináz (TG2) enzim ellen autoimmun reakciót provokál. A betegekben TG2-specifikus, illetve az enzim által deamidált gliadin peptid (DGP) ellen diagnosztikus értékű antitestek termelődnek. A betegek antitest-repertoárjának vizsgálatára alkalmas módszer a fágkönyvtár készítése, melyben az egyes fágok egy-egy monoklonális, az antitestek variábilis régiójából klónozott egyláncú variábilis fragmentumot (scFv) tartalmaznak felszínükön. A TG- és DGP-specifikus klónok szelekciója fágbemutató technikával valósul meg. Vizsgálataink során felnőtt coeliákias beteg vékonybél-biopsziás mintájából készített fágkönyvtárból szelektáltunk TG2- és DGP-specifikus scFv-eket. A könyvtár 10<sup>9</sup> klónt tartalmazott, majd az első szelekciós kör végén mindkét antigénre 10<sup>7</sup> klón maradt, a második körben a TG-re szelektált klónok száma 10<sup>6</sup>, míg a DGP-re szelektáltaké 10<sup>4</sup> volt. Továbbiakban a

TG-re szelektált klónok közül a vizsgált 79-ből 12 bizonyult ténylegesen TG2-pozitívnak (15,2%), míg a DGP-re szelektált 28 vizsgált klónból csak 1 volt DGP-pozitív (3,5%). Kettő TG2-re és kettő DGP-re szelektált klón is keresztreakciót adott a másik antigénnel. Az általunk korábban készített TG2-mutánsokkal ELISA módszerrel vizsgáltuk a klónok TG2-epitópjait. Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a coeliakiás betegekben TG2- és DGP-specifikus antitestek is termelődnek, de a DGP elleni klónok száma alacsonyabb. A szelektált pozitív klónok egy része keresztreakciót mutat a másik antigénre, mely alátámasztja a két antigén tér szerkezeti hasonlóságát. A keresztreakáló klónok epitópspecifikitása azonban eltér a csak TG2-vel reagáló, a tipikus coeliakiás epitóphoz kötődő klónok epitópjától.

#### P7-10

##### Coeliakia rizikócsoportba tartozó endotél sejtek adhéziójának vizsgálata

Tóth B.<sup>1</sup>, Simon-Vecsei Zs.<sup>1</sup>, Király R.<sup>1</sup>, Fésüs L.<sup>1,2</sup>, Korponay-Szabó I. R.<sup>3</sup>

DE OEC<sup>1</sup> Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>MTA DE, Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, <sup>3</sup>Gyermekklinika, Debrecen

A coeliakia (gluténszenzitív enteropátia) a vékonybél leggyakoribb krónikus, malabszorpcióhoz vezető betegsége, melyet genetikailag fogékony egyénekben az étkezéssel bevitt glutén idéz elő. A betegség családi halmozódást mutat, a betegek gyermekei 20-30%-ban érintettek. A coeliakia HLA-asszociált betegség, mely szoros kapcsolatban áll az MHC II. osztályba tartozó 2 alléllal: a DQA\*0501 és a DQB\*0201 allélekkel, melyek a DQ2 fehérjét kódolják. A betegek 95%-ára a HLA-DQ2, a fennmaradó esetek nagy részére pedig a HLA-DQ8 fehérje jellemző, mely szükséges, de nem elégséges feltétele a betegség kialakulásának. A magyar populációban a DQ2-hordozás kb. 25%-ban fordul elő, ezért feltehetően ezen allélek mellett más, egyelőre ismeretlen gén(ek) is részt vesz(nek) az antigénprezentációban és az immunválaszban. Vizsgálatainkban coeliakiás családok újszülöttjeinél HLA-DQ-tipizálást végeztünk, köldökzsinórból endotélsejteket izoláltunk, majd ezeket prospektív módon, az antigéninger előtt vizsgáltuk sejtszintű eltérések keresésére. Így potenciálisan 4 csoport alakítható ki a jelenleg rendelkezésünkre álló 25 sejtvonalból: DQ2- vagy DQ8-hordozó betegek, egészséges DQ2- vagy DQ8-hordozók, akiknél nincsenek jelen coeliakiagének, olyan gyermekek, akiknél nincs DQ2/8, de coeliakiagéneket hordoznak, valamint egészséges DQ2/8-negatív gyermekek. Vizsgáltuk az endotél sejtek adhézióját, és a DQ2-re homozigóta sejtek letapadási hajlandósága 50%-kal csökkent a kontrollhoz képest. Ennek alapján a továbbiakban különböző extracelluláris-molekulákkal fedett felszínen az adhézió, illetve mioblasztok és fibroblasztok segítségével az endotélsejtek érkepzési hajlandóságának részletes vizsgálata indokolt.

#### P7-11

##### A *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) öröklődő betegség hátterében álló ABCC6 fehérje vizsgálata homológiamodellek segítségével

Fülöp K., Barna L., O. Symmons, Závodszky P., Váradi A.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Számos ABC (ATP Binding Cassette) fehérjét kódoló gén mutációja okoz öröklődő betegséget. A *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) betegség genetikai hátterében az ABCC6 gén mutációit azonosították. A PXE szisztémás kötőszöveti rendellenesség, amelynek során az elasztikus rostok kalcifikációja figyelhető meg. A betegség molekuláris biológiai háttere, valamint az ABCC6 fehérje fiziológiai szubsztrátja nem ismert. A PXE kialakulásáért deléciók és inszerciók mellett igen nagy számú pontmutáció tehető felelőssé. A pontmutációkat 3D szerkezeti képbe helyezve szerkezet-függőségekre világíthatnak rá. A Sav 1866 bakteriális ABC-transzporter és két másik fehérje ABC doménjeinek kristályszerkezeti adatait alapul véve elkészítettük az ABCC6 fehérje homológiamodelljét [Fülöp et al. (2009) *BBRC*, **379**:706-709]. A kapott 3D szerkezetben elhelyezve 119 PXE-t okozó pontmutációkat, azt találtuk, azok szignifikánsan nagyobban fordulnak elő az ATP-hidrolízis szempontjából fontos ABC-ABC- domének kontakt felszínein, valamint az ABC fehérjék legújabb kristályszerkezeti adatai alapján azonosított szerkezeti régiók, a TM-héliceket összekötő intracelluláris hurkok és ABC-domének által kialakított kontakt felszíneken, mint a fehérje más régióiban. Ez az első genetikai természetű bizonyíték az újonnan azonosított funkcionális doméninterakciós felszín fontosságára. 2009-ben a humán ABCB1 fehérje apo- és szubsztáttkötött konformációjának röntgenkristallográfiai adataival az első eukarióta fehérje kristályszerkezeti koordinátái váltak elérhetővé. A szerkezet a Sav 1866 esetében kristályosított konformációtól eltérő állapotban rögzített intermediert mutat. Az ABCB1 molekuláris szerkezeti adatai alapján is elkészítettük az ABCC6 fehérje feltételezett szubsztáttkötő konformációjának homológia modelljét.

#### P7-12

##### Az *ecetmuslica multidrog-rezisztenciához társult fehérje (DMRP)* az emberi homológ fehérjék nagykapacitású modellje

Szeri F.<sup>1</sup>, Iliás A.<sup>1</sup>, S. Robinow<sup>2</sup>, Liliom K., Váradi A.

<sup>1</sup>MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest;

<sup>2</sup>Department of Zoology, University of Hawaii, Manoa, USA

Az ABC transzporterek tevékenysége élettanilag több szempontból is kiemelt fontosságú. A humán genomban jelen lévő úgynevezett "hosszú" multidrog-rezisztenciához (MDR) társult fehérjéknek – az emberi MRP fehérjéknek – *ecetmuslicában* egyetlen ortológja van, a *Drosophila* MRP (DMRP). Ezt a fehérjét Sf9 sejtekben fejeztük ki és aktivitását

összehasonlító vizsgálatokban jellemeztük. Kimutattuk, hogy a DMRP az emberi homológok jó modellje, mivel szubsztrátspecifitása, inhibitorprofilja és kinetikai jellemzői átfednek azokkal, és kiemelkedően magas transzportkapacitás jellemzi fontos modellértékű humán szubsztrátokra (LTC4, ösztradiol-glükuronid, calcein, fluo3 and CDCF). A DMRP kiugróan magas vanadátszenzitív alap ATP-áz enzimaktivitással rendelkezik, amely NEM-GS és probenecid jelenlétében fokozható, ugyanakkor meglepő módon a transzportált szubsztrátok ezt az aktivitást gátolták. Ezen eredményeink alapján feltételeztük, hogy a jelenség hátterében egy az Sf9 sejtekben endogén módon jelenlévő ismeretlen DMRP szubsztrát vagy allosztérikus aktivátor áll. A DMRP kiemelkedő aktivitását alapul véve termodinamikai szempontból jellemeztük a fehérje ATP-áz

ciklusának átmenti állapotát. Kísérleteinkben jól elkülöníthetően különböző sebességmeghatározó lépést tapasztaltunk az alapaktivitás és a modulált aktivitások esetében, ugyanakkor mindkét esetben azonos aktivációs szabadenergia-változást határoztunk meg. Mivel az emberi MRP-k alacsony aktivitása hasonló vizsgálatokat nem tesz lehetővé, kísérleteink a modellértékű *ecetmuslica* testállatból származó DMRP fehérjén az elsők az MRP-típusú ABC transzporterek körében. Eredményeink jelentősége, hogy vizsgálati adataink alapján a MDR- és MRP-típusú transzporter proteinek katalitikus ciklusának átmeneti állapota termodinamikai szempontból hasonlóan bizonyult, annak ellenére, hogy a két fehérje katalitikus ciklusa ismert módon eltér egymástól.

## P8 – Egyéb témák

### P8-01

#### A 2-es típusú transzglutamináz neutrofil granulocita differenciálódásában betöltött szereének vizsgálata

Csomós K., Balajthy Z., Fésüs L.

*DE-OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

A szöveti transzglutamináz (TG2) fehérjék poszttranszlációs módosítását katalizáló enzim; különböző fehérjék közötti  $\gamma$ -glutamil- $\epsilon$ -lizil izopeptid kötés létrejöttét, ill. aminok, poliaminok fehérjékbe történő beépítését végzi. Mindemellett az enzim GTPáz aktivitással is rendelkezik és G-fehérjeként működhet. A neutrofil granulociták fejlődésük kezdeti stádiumában, promielocita állapotban nem tartalmaznak szöveti transzglutaminázt, differenciációjuk során azonban az enzim nagymértékben indukálódik. A TG2 megtalálható a citoplazmában, de bejut a sejtmagba is, ahol szintén jelentős keresztkötő aktivitása mutatható ki. (Balajthy et al. Blood. 2006). A szöveti transzglutamináznak a neutrofil granulocita differenciálódásban betöltött szerepe egyelőre tisztázatlan. Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a TG2 bizonyos neutrofil granulocita funkcióban szerepet játszó gének expresszióját befolyásolja (NADPH oxidáz gp91 alegység), valamint TG2 hiányában a sejtek differenciációja zavart szenved, számos neutrofil funkció hiányzik vagy csökkent mértékű (szuperoxid-gyök termelés, fagocitózis, vándorlás) (Balajthy et al. Blood. 2006). Ezekből az eredményeinkből kiindulva célul tűztük ki, hogy teljes génexpressziós vizsgálatot végzünk annak felderítése érdekében, hogy mely gének kifejeződését modulálhatja a szöveti transzglutamináz. Kísérleteinkhez az NB4 promielocita sejtvonalat használjuk, melyből all-transz retinsavas (ATRA) kezeléssel a természetes neutrofil granulocitához közeli, TG2-t expresszáló alak differenciálható. Normál NB4 sejtvonalból lentivírus alapú shRNS vektor felhasználásával létrehoztunk egy stabil TG2 knockdown sejtvonalat, valamint random shRNS

szekvenciát expresszáló, stabil kontroll sejteket. A szöveti transzglutamináz csökkent kifejeződése miatt bekövetkező génexpressziós változásokat DNS microarray technika segítségével vizsgáltuk a normál és a TG2 knockdown NB4 sejtek ATRA-differenciációja során.

### P8-02

#### Különböző módon nekrotizált neutrofil granulociták és eliminálásának vizsgálata egerekben

Doró Z., Buchan Gy., Mádi A., Fésüs L.

*DE-OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

A szervezetünkben naponta átlagosan minden ötszázadik-ezredik sejt kicserélődik. Az előregedett vagy haszontalan sejtek természetes sejthalállal 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. A természetesen elhaló sejtek hatékony eliminálása rendkívül fontos, mert a szövetekben a fel nem vett apoptotikus sejtek másodlagosan nekrotizálhatnak, amely gyulladásszerű folyamatokat indít el. A számos gyakran használt sejthalál modellek közül a neutrofil granulociták a legigéretesebbek, melyeket egér csontvelőből izoláltunk sűrűséggradiens centrifugálással. A neutrofil granulociták rövid életű sejtek, kb. 24 óra alatt már spontán apoptotizálnak, így nekrozisra való hajlamuk is nagyobb. Vizsgálataink során az irodalomból ismert módszereket alkalmazva három eltérő nekrozis modellt állítottunk be. Az első a szérum megvonására lejáró spontán nekrotikus folyamatnak tűnő sejthalálforma az ún. nekroptózis volt. A nekroptózis programozott módon végbemenő nekrozis, mely a nekrozistól eltérően molekulárisan szabályozott folyamat együttes, nekrozisra jellemző morfológiával. A nekroptózis egyszerűen kiváltható a kaspázok gátlásával. Nekrosztatinnal specifikusan gátolható, mert ez az

anyag a nekroptotikus folyamat egyik kulcsenzimének, a RIP-1 kináznak az alloszterikus gátlószere. Kísérleteink során leírtuk és részletesen jellemeztük az egér neutrofil granulociták nekrotikus elhalási folyamatait, különös tekintettel a nekroptotikus formára, melyet eddig még csak más sejttípusok esetén közöltek le. Tanulmányoztuk a különböző módon elhalt sejtek makrofágok általi fagocitózisát. Megvizsgáltuk, hogy ezek hogyan eliminálódnak, ha együtt adjuk őket a makrofágokhoz a fagocitózis mérések során (un. koinkubációs mérések), illetve amikor a nekrotikus formákat apoptotikus módon elhalt neutrofil granulocitákkal kombináljuk. Ezen folyamatok molekuláris vizsgálatai hozzájárulhatnak majd különböző gyulladásos, autoimmun-és neurodegeneratív kórképek kialakulásának megértéséhez.

### P8-03

#### Epigenetikus változások vizsgálata tumor-asszociált miofibroblasztokban

Huliák I.<sup>1</sup>, Kiricsi M.<sup>1</sup>, Czepán M.<sup>2</sup>, Rakonczay Z.<sup>2</sup>, Hegyi P.<sup>2</sup>, Boros I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SZTE TTK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

<sup>2</sup> SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika, Szeged

Az utóbbi években bizonyítást nyert, hogy a tumorok kötőszöveti állománya fontos szerepet játszik a daganatok fejlődésében. A tumor mikro környezetben nagyszámú miofibroblaszt található; ezen sztrómasejtek fokozottan expresszálnak olyan extracelluláris proteázokat, melyek segítik az áttétek képződését. Mindemellett a daganatok kialakulásának hátterében megbújó epigenetikai változások – azaz a nukleotidsorrend módosulása nélkül bekövetkező génexpresszió változások – is egyre inkább előtérbe kerülnek. Így kísérleteinkben össze kívántuk hasonlítani tumorokból (tumor-asszociált) és a tumor által nem érintett környező szövetből (kontroll) izolált miofibroblasztok epigenetikus mintázatát, kíváncsiak voltunk, van-e különbség a genetikai anyag csomagolását biztosító hisztonok módosításaiban. Emellett vizsgálni kívántuk a kollagénbontó mátrix metalloproteinázok (MMP) expresszióját és aktivitását is. A hiszton H3 és H4 fehérjék N-terminálisának poszttranszlációs módosulásait (acetiláció, metiláció) specifikus antitesteket alkalmazva immuncitokémiával teszteltük, az eredmények megerősítéséhez western blot-ot végeztünk. A hiszton acetilációban részt vevő fehérjék expresszióját RT-QPCR-rel követtük. Az MMP-k közül kísérleteinkben a zselatináz aktivitású MMP2-t és MMP9-et vizsgáltuk; az mRNS mennyiséget RT-QPCR-rel, míg a fehérjék aktivitását zimográfiával határoztuk meg. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy a tumor-asszociált miofibroblasztokban változik a hiszton H4 acetiláció szintje a kontrollhoz viszonyítva. A továbbiakban ezt a globális H4 acetiláció változást szeretnénk specifikálni; a tumorfejlődésben szerepet játszó gének promóterének analízisét tervezzük kromatin

immunprecipitáció módszert alkalmazva. Az eredmények várhatóan olyan epigenetikai változások felismerését jelentik, amelyek jellemezik a tumor-asszociált miofibroblasztokat, ezáltal a jövőben terápiás célpontok lehetnek.

### P8-04

#### A CTD foszfatázok vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben

Juhász I., Tombácz I., Boros I. M.

SZTE, TTK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Az RNS polimeráz II foszforiláltsági állapota dinamikusan változik a transzkripció során. A polimeráz promoterről való elindulásához hiperfoszforilált forma kialakulása szükséges, míg ahhoz hogy az enzim új transzkripciót kezdhessen a CTD-nek defoszforilálódni kell. Ezért a CTD foszfatázoknak és kinázoknak fontos szerepük van a génexpresszió szabályozásában. Munkám során a CTD foszfatázokat (Fcp1, Scp) tanulmányozom, modellszervezetként a *Drosophila melanogaster* -t választottuk, mely jól kidolgozott genetikai háttérrel rendelkezik. Csoportunk kimutatta, hogy a fehérje túltermelése és csendesítése is letális hatású, mely bizonyítja, hogy az Fcp1 elengedhetetlen funkcióval rendelkezik. Célul tűztük ki a fehérje tisztítását és aktivitás vizsgálatát. A munkához olyan transzgenikus vonalakat használtam, amelyekben egy fúziós jelölést tartalmazó Fcp1 fehérje termelődik hőshock hatására. Optimalizáltam *Drosophila* fehérjekivonat készítésének módját, és Superdex200-as géliszűrő oszlopon frakcionáltam a fehérjekivonatot. A fúziós jelölés segítségével (FLAG) western blottal azonosítottam az Fcp1-et tartalmazó frakciókat. Az aktivitás vizsgálatokat spektrofotometriásan mesterséges kromogén szubsztráttal (*para*-nitro-fenil-foszfát) végeztem. Nyálmirigy óriáskromoszómákon kimutattuk az Fcp1 jelenlétét immunfluoreszcenciával, ami arra utal, hogy az Fcp1 az RNS polimeráz II CTD foszfatáza. Az Fcp1 kromatinhoz való kötődését kromatin immunprecipitációval (ChIP) a hsp70 génen vizsgáltuk. Humán modellrendszerben leírtak az Fcp1-hez hasonló foszfatázt, mely az Scp nevet kapta. Ezért azonosítani kívántuk az Scp fehérjét *Drosophila*-ban, illetve meghatározni funkcionális szerepét. *In silico* homológia vizsgálatokat végeztem, meghatároztam 5 lehetséges DmScp ortológot. A géneket klónoztam, fúziós jelöléssel láttam el a fehérjéket, mely segítségével tovább vizsgálható, tisztítható illetve nyomon követhető az Scp kifejeződése.

### P8-05

#### Retinoidok hatása a timociták apoptózisában

Kiss B., Tóth K.Á., Sarang Zs., Fésüs L., Szondy Zs.

DE-OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A természetes retinsavak (9-cisz- és all-transz-retinsav) az A-vitamin aktív metabolitjai, melyek a

sejtmagi receptorok családjába tartozó retinoid receptorokon keresztül gének átíródását szabályozzák. Az intézetben folyó korábbi kutatómunka kimutatta, hogy a retinsavak az RARgamma receptoron keresztül sejthalált váltanak ki egér tímuszsejteken. Perifériás T-sejteken és T-sejt hibridómákon pedig az RARgamma ligálása fokozta a Nur77 transzkripció faktor kifejeződését. A Nur77 a DNS-kötő domén szekvencia homológia alapján a szteroid/tireoid/retinoid sejtmag receptor szupercsaládba tartozó transzkripció faktor, melynek ligandja ismeretlen. A Nur77 transzkripció faktorról ismert, hogy kulcsszerepet tölt be a timociták negatív szelekciós elhalása során, szelektív túltermelése egér tímuszsejtekben pedig különféle sejthalál gének indukcióján keresztül apoptózist vált ki. Kísérlete-

inkben azt vizsgáltuk, indukálódik-e a Nur77 egér timociták retinoid kiváltotta sejthalála során. Ha igen, szerepet játszik-e a Nur77 a sejthalál indukciójában. Eredményeink azt mutatják, hogy a Nur77 indukálódik mind mRNS, mind fehérje szinten a retinoid kiváltotta timocita sejthalála során. A Nur77 indukciója meghatározó, mert Nur77 hiányos egerekben a retinoidok nem váltanak ki apoptózist. Megfigyeltük, hogy retinoid kezelése hatására Nur77 függő sejthalál gének indukálódnak. Emellett a Nur77 mitokondriális transzlokációját figyeltük meg. Adataink alapján a retinoidok úgy programozzák át a tímuszsejteket, hogy azok a sejthalál receptorokon keresztül, a mitokondrium részvételével zajló apoptózist hoznak létre. (OTKA 77587)

## TE – Technológiaismertető előadások

### TE-01

#### QCM – A tool for molecular analysis

A. Kovacs

Attana AB, Stockholm, Sweden

Attana AB is a world leading company in molecular interaction applications using the Quartz Crystal Microbalance (QCM) technology. Established in 2002 in Stockholm, Sweden, and selling instruments since 2003, Attana has now launched its 5<sup>th</sup> generation of QCM instrument platforms. The instruments are today employed in the pharmaceutical industry as well as the academia, with customers in the US as well as throughout Europe. This presentation will discuss the solutions, applications and benefits of Attana's label-free and real-time QCM analysis technology and addresses how to get high quality data in pure and crude samples and affordable analysis of molecular interactions. Except for applications such as off-rate screening, detailed kinetics and concentration determination, the technology also, due to its excellent temperature control, enables challenging experiments such as thermodynamic studies, all at an affordable price.

### TE-02

#### Felületiplazmon-rezonancia (SPR) készülékek bimolekuláris kölcsönhatások valós idejű vizsgálatára

Szakács T., Szepesi I.

ABL&E-Jasco Magyarország Kft., Budapest

Az 1902-ben felfedezett felületiplazmon-rezonancia (SPR) jelenség tudományos gyakorlatban alkalmazható felhasználási lehetőségének első demonstrálására 1983-ban került sor, az első kereskedelmi

forgalomazású SPR-készülékek pedig az 1990-es évek elején jelentek meg. Az elmúlt 20 év során bekövetkezett technikai fejlődésnek köszönhetően ma már nagy pontosságú, gyors és könnyen kezelhető analitikai berendezések állnak rendelkezésre bimolekuláris kölcsönhatások valós idejű vizsgálatára. Az SPR-spektrométerekkel a vizsgált molekulák kémiai módosítása nélkül lehetséges megkülönböztetni a kölcsönhatást létrehozni képes molekulákat az inaktívaktól, vizsgálhatjuk a fellépő kölcsönhatások kinetikáját, meghatározhatjuk az affinitási állandókat és a kölcsönhatást létrehozó molekulák koncentrációját. Előadásunkban az SPR ismertetésétől indulva bemutatjuk, hogyan lehet bimolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára használni ezt a jelenséget. Az Autolab SPR-készülékek bemutatásán keresztül megvizsgáljuk milyen részegységek szükségesek ahhoz, hogy például egy sikeres antitest-antigén-vizsgálatot el tudjunk végezni. Összehasonlítást végzünk a bimolekuláris vizsgálatokra széles körben elterjedt ELISA módszerrel. Mivel a sikeres SPR-vizsgálatok feltétele, hogy a kölcsönhatásban részt vevő molekulák közül az egyik a felületen immobilizálva legyen, ezért egy példán keresztül megmutatjuk, hogyan lehet a kereskedelmi forgalomban kapható felületeken kívül néhány lépésben létrehozni a saját céljainkra megfelelőt, az aranylemez felületének kémiai módosításával. Az Autolab potenciosztátok és SPR-készülékek kombinálásával elektrokémiai vizsgálatokat is végezhetünk, munkaelektrodként a módosított aranyfelületet használva. A felületen polimerfilmet képezve pedig biokompatibilitási vagy letapadásvizsgálatokra is alkalmassá tehetjük az SPR-készülékünket.



## A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke

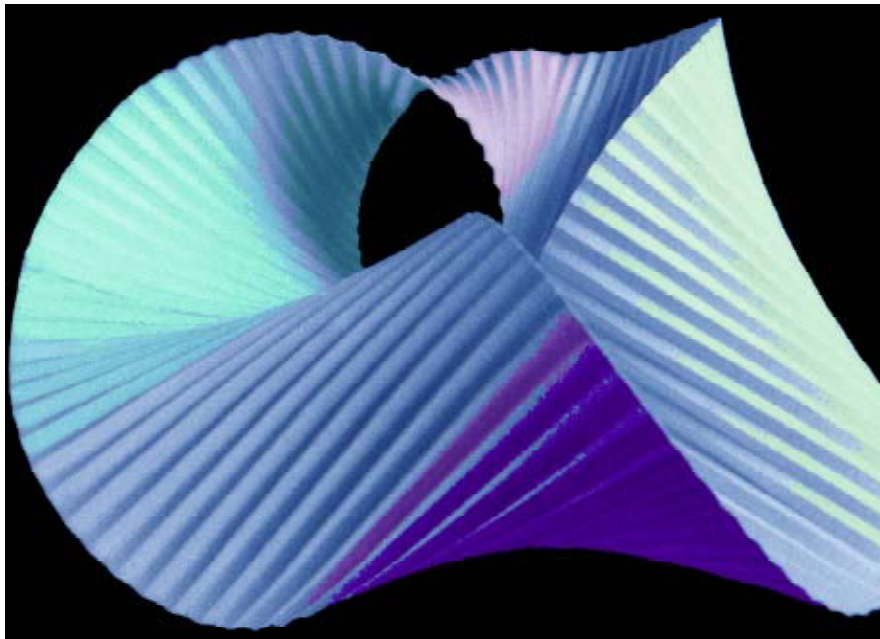
AMTC: Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma	MTA: Magyar Tudományos Akadémia
ÁOK: Általános Orvostudományi Kar	MTK: Mezőgazdaság-tudományi Kar
BAYGEN: Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergetikai Intézet	OEC: Orvos- és Egészségtudományi Centrum
BZAKKA: Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány	PTE: Pécsi Tudományegyetem
DE: Debreceni Egyetem	SE: Semmelweis Egyetem
ELTE: Eötvös Loránd Tudományegyetem	SzBK: Szegedi Biológiai Központ
KK: Kémiai Kutatóközpont	SZTE: Szegedi Tudományegyetem
	TTIK: Természettudományi és Informatikai Kar
	TTK: Természettudományi Kar

## Szerző szerinti mutató

<b>A</b>		Bősze Sz.	E1-02	<b>É</b>	
Aeschlimann, D.	P4-17	Bozóki B.	P3-01	Édes I.	E3-06
Ailian, Z.	P4-17	Bozóky Z.	P4-15	Érdi B.	P4-08
Aleksandrov, A.	E7-06	Bravics B.	E6-04	<b>F</b>	
Alexa A.	P4-01, P4-12	Brázda P.	E6-04	Falcao-Pires, I.	E3-06
Andrikovics H.	E7-02	Brunyánszki A.	P7-02	Farkas I.	E2-02, P4-06
Apáti Á.	DE-01	Buchan Gy	P8-02	Farkas V.	P1-05
Arányi T.	E2-05, E4-05, E7-01, P7-01	Buday L.	E4-05	Fésüs L.	P4-07, P4-16, P6-09, P7-09, P7-10, P8-01, P8-02, P8-05
Ayaydin, F.	P4-06	Bugyi B.	E3-05	Florian, F.	P7-09
		<b>C</b>		Friedrich P.	P4-12
<b>Á</b>		Carlier, M.-F.	E3-05	Fülöp K.	E7-01, P7-11
Ábrahám E.	P4-06	Cervenak L.	P4-14	<b>G</b>	
Ádám Cs.	P2-01	Cui, L.	E7-06	Gál P.	E1-05, E6-03, P4-14, P6-07
Ángyán A	P2-02	Czepán M.	P8-03	Garabuczi É.	P4-07, P4-17
		Czikora I.	P4-05, P4-10	Garai Á.	P4-03
<b>B</b>		Czirók A.	E3-03	Gergely P.	P4-05, P4-10, P4-11, P7-02
Bagossi P.	P2-05, P3-01	<b>Cs</b>		Gógl G.	P4-01, P4-12
Bai P.	P7-02, P7-03	Cseh S.	P1-06	Gogolák P.	E7-04
Bajor T.	P7-04	Csépányi-Kömi R.	P2-03	Gombos L.	P7-07
Bakó É.	P4-11	Csermely P.	E2-01	Gonda Sz.	P3-04
Balajthy Z.	P6-09, P8-01	Csikós Gy.	P4-02, P4-20	Goto, Y.	P7-06
Bálint B. L.	P4-18	Csomós K.	P8-01	Gregus A.	E7-04, P6-04
Bálint É.	P6-08, P6-12	Csontos Cs.	P4-05, P4-10	Grolmusz V.	E2-03, P2-06, P6-02, P2-04
Bander P.	P3-01	Csősz É.	P6-09	<b>Gy</b>	
Bánfalvi Zs.	P6-01	<b>D</b>		Gyémánt Gy.	P2-05
Bánky D.	E2-03, P6-02	Damjanovich S.	E6-04	Gyimesi G. .	P7-07
Bánréti Á.	P4-02	de Boussac, H.	E4-05	Gyimesi M.	E3-04, P3-02, P3-03
Bárkai T.	P4-03	Dokholyan, N. V.	E7-06	Gyöngyösi A.	P4-09
Barna L.	P1-06, P7-11	Doleschall Z.	P4-14	<b>H</b>	
Bécsi B.	P4-05, P4-17	Dombrádi V.	P2-01, P4-06, P4-12	Hajdú I.	E3-01, P1-06
Beinrohr L.	P4-14	Dormán Gy.	P1-06	Hajdú J.	E0-01
Békési A. .	P3-05, P6-03	Doró Z	P8-02	Hamdani, N.	E3-06
Benkő Sz.	P6-04	Dosztányi Zs.	E2-06, E6-01	Hancz A.	E4-02
Bereczki O.	P6-08	Dudits D.	P4-06	Haracska L.	E3-01
Billington, N.	P3-03	<b>E</b>			
Birkás E.	P4-04	Erdei A.	E4-07, P6-03		
Blastyák A.	E3-01	Erdődi F.	P4-05, P4-11, P4-17		
Borbély A.	E3-06				
Borbély G.	E6-02				
Boros I.	P6-08, P6-12 P8-03, P8-04				
Boross P.	P3-01, P7-05				
Bors A.	E7-02				

Harangi J.	P2-05	Körner A.	P7-04	Mócsai A.	E4-01
Harmat V.	E1-03, P1-03, P3-05	Környei Zs.	P4-15	Molnár G.	E6-04
Haystead, T. A.	E4-03	Kőröskényi K.	P4-16, P4-19	Molnár J.	P6-12
He, L.	E7-06	Korponay-Szabó I. R.	P7-09, P7-10	Molnár T.	E6-05
Hegedűs Cs.	P7-02, P7-03	Kovács E.	P6-06	Mótyán J. A.	P2-05
Hegedűs T.	E7-06	Kovács J.	P7-07	Muha V.	P6-03
Hegyí P.	P8-03	Kovács L.	P4-12	<b>N</b>	
Héja D.	P6-05, P6-13	Kovács M.	E3-04, P3-02, P3-03	Nagy G. N.	P1-03
Homolya L.	P7-08	Kovacs, A.	TE-01	Nagy L.	E0-04, E6-04
Horváth A.	E6-04, P1-01	Kovács, I.	E2-01	Nánási T.	E2-01
Horváth V. G.	P4-06	Kovari J.	E4-07	Német I.	P6-09
Hrabák A.	P7-04	Kúnos Gy.	E0-03	Németh G.	E6-02
Hubay T.	E2-03	Kurkó I.	E6-02	Neubrandt M.	P4-15
Hueber, A. O.	E4-02			<b>Ny</b>	
Huliák I	P8-03	<b>L</b>		Nyitray L.	E6-05, P6-10, P6-06
Hunyadi-Gulyás É.	P6-03	Lábiscsák P.	P7-05	<b>O</b>	
Hutvágner Gy.	E0-02	Láng A.	E1-05	Orbán T.	DE-01, P7-08
<b>I</b>		Laube, B.	E6-06	Ovádi J.	E1-01
Iliás A.	P7-12	Leveles I.	P1-03, P3-05, P6-03	<b>Ö, Ó</b>	
Iván G.	E2-03, P2-04, P2-06	Ligeti E.	P2-03	Ördög R.	E2-03, P2-06
Ivics Z.	DE-01	Liliom K.	P6-06, P7-07, P7-12	Órfi L.	E6-02
Izsvák Zs.	DE-01	Lontay B.	E4-03	<b>P</b>	
<b>J</b>		Lopata A.	P1-02, P1-03	Pál Cs.	E2-04
Juhász I.	P8-04	Lőrincz P.	P4-20	Pál G.	E6-03, P6-05, P6-07, P6-10, P6-13
Juhász G.	P4-08	Lőrincz Zs.	P1-06	Pál-Gábor H.	P7-07
<b>K</b>		Lőw P.	P4-13	Palotai R.	E2-01
Kajdi R.	P4-09	Ludányi M. Á.	P6-08	Papp Z.	E3-06
Kardos J.	P7-06, P7-07	Lukács M.	P4-01	Pásztiné Gere E.	P1-04
Karsai Á.	P7-06	Lukácsovich, T.	P4-02, P4-20	Paulus, W. J.	E3-06
Kása A.	P4-10	<b>M</b>		Pénzes K.	E6-02
Kasza I.	P7-08	Madarász E.	P4-15	Perczel A.	E1-05, P1-05
Kegl T.	E6-06	Major B.	E1-05	Peták I.	E6-02, E7-03
Kellermayer M.	P7-06	Makó V.	P4-14	Péterfi Z.	E4-04
Képiró M.	P1-04	Maksay G.	E6-06	Pintar, J.	P4-04
Kéri Gy.	E6-02	Martinek T.	E1-04	Pintér L.	E3-01
Kertész I.	P4-04	Maruzs T.	P4-20	Pomozi V.	E7-01
Kintses B.	P3-03	Matúz K.	P3-01	Prohászka Z.	P4-14
Király R.	P7-09, P7-10	Mádi A.	P8-02	Pukáncsik M.	P6-03
Kiricsi M.	P8-03	Málnási-Csizmadia A.	E3-02, P1-04, P3-03	<b>R</b>	
Kiss A.	P4-11, P6-11	Medveczky, P.	P6-13	Radnai L.	E6-05
Kiss B.	P6-06, P8-05	Medzihradszky F. K.	P4-12, P6-03	Rajnavölgyi É.	P6-04, E7-04
Kiss I.	P4-20	Meggyesi N.	E7-02	Rakonczay Z.	P8-03
Klement É.	P4-12	Megyeri M.	P4-14	Rapali P.	E6-05, P6-10
Knigjt, P. J.	P3-03	Merényi G.	E4-07	Reményi A.	P4-01, P4-03
Koblos G.	E4-05	Mészáros B.	E2-06, E6-01	Riordan, J. R.	E7-06
Kocsis A.	E6-03, P6-07	Micsonai A.	P7-06	Robinow, S.	P7-12
Kocsis Zs.	P4-13	Mihalik Á.	E2-01	Róna G.	P4-15
Kókai E.	P4-06, P4-12	Miskei M.	P2-01		
Kolozsvári B.	P4-11				
Koncz G.	E4-02				
Kónya E. .	P3-05				

<b>S</b>		Szalay M.	E2-01	Uitto, J.	E7-01
Sáfár D.	P2-03	Szántó M.	P7-02	Ullrich, A.	E6-02
Sahin-Tóth, M.	P6-13	Szekeres T.	E6-04	Unk I.	E3-01
Sántha M.	P3-04	Széles L.	DE-02		
Sarang Zs.	P4-16, P4-17 P8-05	Szepesi I.	TE-02	<b>V</b>	
Sarkadi B.	DE-01, P7-08	Szeri F.	P7-12	Vámosi Gy.	E6-04
Sarlós K.	E3-04, P3-02,	Szilágyi K.	E1-05	van der Velden, J.	E3-06
Sass M.	P4-02, P4-13, P4-20	Szokol B.	E6-02	Vántus T.	E6-02
Sblattero, D.	P7-09	Szondy Zs.	P4-07, P4-16, P4-17, P8-05	Váradi A.	E2-05, E4-05, E7-01, P7-11, P7-12
Schamberger A.	P7-08	Szűcs M.	P4-04	Varga Á.	P4-13
Scheer I.	E1-06	<b>T</b>		Varga Z.	E6-02
Serohijos, A. W. R.	E7-06	Takács B.	P3-03	Vereb Gy.	P4-17
Simándi Z.	P4-18	Takács E.	E1-06, E4-07, P1-03, P4-15	Vértessy G. B.	E1-06, E2-06, E4-07, P1-02, P1-03, P3-05, P4-15, P6-03
Simon I.	E2-06, E6-01	Tantos Á.	P4-12	Virág L.	P7-02, P7-03
Simon-Vecsei Zs.	P7-09, P7-10	Tombácz I.	P8-04		
Somlai G.	P4-07	Tordai A.	E7-02		
Sperka T.	P4-12	Tóth B.	P4-17, P7-10		
Stienen, G. J. M.	E3-06	Tóth E. M.	P3-04	<b>W</b>	
Stier I.	P6-11	Tóth G.	P4-04	Waczek F.	E6-02
Stráner P.	P1-05	Tóth J.	E1-06, E2-06, E4-06, E4-07, P1-02, P1-03	Wen, T.	P4-04
Süveges D.	E6-05	Tóth K.	E6-04	<b>Y</b>	
Symmons, O.	E2-05, P7-11	Tóth K.Á.	P8-05	Yagi, H.	P7-06
<b>Sz</b>		Tóth M.	P6-12	Yu, P.	P4-06
Szabadka Z.	E2-03, P2-06	Tömöri T.	P1-06	<b>Z</b>	
Szabó A.	E7-04	Tőzsér J.	P3-01, P4-12, P7-05	Závodszy P.	E1-05, E6-03, P4-14, P6-07, P7-11
Szabó É.	P7-03			Zboray K.	P6-05, P6-13
Szabó P.	E7-01	<b>U</b>		Ziberna, F.	P7-09
Szabó V.	E2-03	Uher F.	E7-05		
Szakács T.	TE-02				



*„Béta-redő”. Németh Andrea, számítógépes grafika.*

**Németh Andrea** képzőművész 1965-ben a Képző- és Iparművészeti Gimnáziumban érettségizett. Ezután egy évig az Offset nyomdában litografikus gyakornokként dolgozott. 1970-ben végzett a Magyar Iparművészeti Főiskola Grafika Tanszékén. Mesterei Baska József, Erneyi Sándor és Finta József voltak. Édesapját, Németh József fotóművészt tekinti példaképének. Munkáira négy alkalommal kapott nivódíjat. Tizenkét egyéni kiállítása volt és számos csoportos kiállításon vett részt. Reklámfotókat, plakátokat és katalógusokat készített. Kilenc könyvet illusztrált. Jelenleg művészekről készít portréfotókat és riportokat készít velük.



*„Protein folding”. Szőlőgyökér Dörgicséről, Gráf László gyűjtése.*

**Gráf László** akadémikus, az ELTE egyetemi tanára, a proteáz enzimek és gátlószereik nemzetközi szintű kutatásán túl kiváló fotográfus és a természet készítette „műalkotások” szenvedélyes gyűjtője. Saját ars poeticája szerint a tudományos kutatás nem áll távol a művészi tevékenységtől, ráadásul ő maga évtizedek óta „fehérjeszobroszkodik”, amely kifejezéssel a fehérjemérnökség száraz terminus technikusát emelte művészi szintre („Fehérjeszobroszlat: az alkotás öröme és haszna” címmel tartott előadást a Mindentudás Egyetemén 2005-ben). Nagy sikert aratott az ELTE látványosi kampuszán „Hajnali részegség” címmel megtartott fotókiállítása. 2000-ben az alsódörgicsei evangélikus templomban állították ki képeit. A világ minden tájáról összegyűjtött természeti alkotások professzori irodáját művészi galériává varázsolják.



# NE KERESSE TOVÁBB, MEGTALÁLTA!

FINNZYMES ÉS NEW ENGLAND BIOLABS ENZIMEK  
BUDAPESTI ÉS SZEGEDI RAKTÁRUNKBÓL!

