

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata  
XXXV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM 2011. augusztus



*Fotó: Juhász Balázs*

## **A Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése**

*Pécs, 2011. augusztus 28 - 31.*

Helyszín: Hotel Palatinus



**Beköszöntött a tömegspektrometria új világa:**

**A Thermo Scientific két ÚJ műszere**  
**a kismolekulák analízisétől a proteomikáig**  
**mindennapivá teszi a NAGYFELBONTÁSÚ HPLC/MS<sup>n</sup>-t!**

## Q-EXACTIVE



- felbontásban  
→ pontos tömegmérésben  
→ elemösszetétel - meghatározásban
- érzékenységben
- gyorsaságban

egyszóval:

- megbízhatóságban

### *Asztali FT- Q-OT MS*

Fourier transzformációs  
kvadrupól – orbitrap  
analizátorú  
hibrid – tandem MS<sup>n</sup>

140.000

(@ m/z = 200; 1,5 Hz)

jobb, mint 1 ppm

Ultranagy - nyomású HPLC  
és „normál” analitikai HPLC  
időskálán is

~ 5 nagyságrendben  
lineáris

:Felbontás:

:Pontos tömeg:

:Gyorsaság:

:Érzékenység:

:Kvantitáció:

## LTQ-ORBITRAP ELITE



### *FT- LIT-OT MS*

Fourier transzformációs  
duál lineáris ioncsapdás –  
orbitrap analizátorú  
hibrid – tandem MS<sup>n</sup>

240.000

(@m/z = 400; 1Hz)

jobb, mint 1 ppm

Ultranagy - nyomású HPLC és  
„normál” analitikai HPLC  
időskálán is

~ 6 nagyságrendben  
lineáris

**Mindezt↑egyszerre!**

**ÚJ, EDDIG NEM HASZNÁLT PÁSZTÁZÁSI MÓD KOMBINÁCIÓK!**

**Könnyű, egyszerű, rutinjellegű működtetés.**

**Gazdag ionforrás (ESI, nanoESI, APCI, APPI) és szoftver/célszoftver – választék.**

**A jövő megérkezett! Legyen az Öné is!**

# **BIOKÉMIA**

A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Keserű György, Kiricsi Mónika (titkár),  
Nyitray László, Sarkadi Balázs, Székács András, Szondy Zsuzsa, Váradi András

Főszerkesztő:

Szűcs Mária

Technikai szerkesztő:

Márki Árpád

XXXV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM

2011. augusztus

## **TARTALOMJEGYZÉK**

E0 – Plenáris előadás és díjazottak előadásai.....	2
E1 – Genom instabilitás és karcinogenezis .....	3
E2 – Biokémiai analitika .....	5
E3 – Membrán és citoskeleton.....	8
E4 – Pathobiokémia .....	10
E5 – Genomika és génműködés szabályozás .....	13
E6 – Sejtorganellum biokémia .....	15
E7 – Neurobiokémia.....	18
P1 – Genom instabilitás és karcinogenezis .....	20
P2 – Biokémiai analitika .....	22
P3 – Membrán és citoskeleton.....	26
P4 – Pathobiokémia .....	28
P5 – Genomika és génműködés szabályozás.....	32
P6 – Sejtorganellum biokémia .....	36
P7 – Neurobiokémia.....	38
P8 – Egyéb .....	39
A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke .....	42
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 előadás és díjazottak előadásai

### A „Bio-Science Díj” nyertesének előadása

#### E0-01

**Génkölcsonhatások rendszerbiológiája: az élesztő anyagcserehálózati modelljének kiértékelése és automatizált fejlesztése nagyléptékű génkölcsonhatási adatok felhasználásával**

<sup>1</sup>SZAPPANOS Balázs, <sup>1</sup>Kovács K., <sup>1</sup>Szamecz B.,  
<sup>1</sup>Honti F., <sup>2</sup>Costanzo M., <sup>2</sup>Boone C., <sup>3</sup>Jelasy M.,  
<sup>1</sup>Pál C., <sup>1</sup>Papp B.

<sup>1</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; <sup>2</sup>University of Toronto, Terrence Donnelly Centre for Cellular and Biomolec, Canada; <sup>3</sup>SZTE, Mesterséges Intelligencia Kutatócsoport, Szeged

Két gén genetikai kölcsönhatást mutat, ha a bennük fellépő mutációk hatásai nem függetlenek egymástól. Habár az utóbbi időben egyre több génkölcsonhatási adat látott napvilágot, mégis, viszonylag kevésbé értjük, milyen molekuláris mechanizmusok magyarázzák őket. Mennyire tudjuk például előre jelezni biokémiai ismereteink alapján, hogy mely gének mutatnak egymással génkölcsonhatást? És hogyan tudunk új biológiai ismereteket kinyerni a nagyléptékű génkölcsonhatási adatsorokból? A sejtek anyagcserejének működését realiztikusan leíró rendszerbiológiai modellek segíthetnek e kérdések megválaszolásában. E célból a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombában kísérletesen lemértük kb. 185000 anyagcsere génpár kiütésének hatását és ezt összevetettük egy anyagcserehálózati modellel, hogy *i)* megértsük a genetikai kölcsönhatási hálózatok szerveződésének alapelveit, *ii)* megállapítsuk, milyen mértékben képes a modell előrejelezni a génkölcsonhatásokat, és *iii)* az adatok segítségével továbbfejlesszük a modellt. Az *in vivo* génkölcsonhatási térkép több tulajdonságát is sikeresen visszaadja az anyagcserehálózat modell, valamint mechanisztikus magyarázatot nyújt a genetikai kölcsönhatások száma és a gének nélkülözhetősége közötti kapcsolatra. Habár azt tapasztaltuk, hogy a modell által prediktált erős génkölcsonhatások nagy többsége a kísérletes adatsorban is látható, az *in vivo* kölcsönhatások többségét a modell nem találja meg. Továbbá statisztikai modellekkel összehasonlítva az anyagcseremodellét azt kaptuk, hogy bár a statisztikai modellek predikációs sikere nagyobb, a kölcsönhatások többségét ezek a módszerek sem képesek kielégítően előre jelezni. Mivel ismereteink az anyagcserehálózatról nem tekinthetők teljesnek, ezért következő lépésben a metabolikus modell predikációs sikerét kíséreltük meg növelni. E célból kifejlesztettünk egy heurisztikus optimalizáláson alapuló algoritmust, mely automatikusan finomítja a hálózatot a kísérletes génkölcsonhatási adatsor alapján. Módszerünk több változtatást is javasolt a modellen, melyek közül néhányat kísérletesen is ellenőriztünk. Ennek eredményeként számos javítást végrehajtottunk a NAD bioszintézis útvonalban, amelyek az irodalmi adatokkal is összhangban állnak.

### A „MBKE Előadói Díj” nyertesének előadása

#### E0-02

**Transzkripciós faktorok kölcsönhatása: a STAT6 hatása a PPAR-gamma működésére makrofágokban és dendritikus sejtekben**

SZÁNTÓ Attila, Nagy L.

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

A PPAR-gamma (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) egy lipid molekulák által aktivált transzkripciós faktor, mely a lipidanyagcsere és a gyulladási folyamatok szabályozásában vesz részt makrofágokban és dendritikus sejtekben. E két sejttípus a különféle gyulladási környezetre eltérően viselkedik, megváltozik a génexpresszió és végső soron új, jellegzetes funkcióval rendelkező, eltérő sejttípusok jönnek létre az egyes feladatok ellátására. Arra keresük a választ, hogy a gyulladás különböző mediátorai hogyan befolyásolják PPAR-gamma működését ezekben az eltérő sejttípusokban. Érdekes módon azt találtuk, hogy a PPAR-gamma aktivitása a gyulladási környezet szoros kontrollja alatt áll. Eredményeink szerint a gyulladást okozó molekulák gátolják, míg a gyulladásgátló interleukin-4 (IL-4) elősegíti a PPAR-gamma működését. Ez utóbbi hatás mechanizmusát vizsgálva megmutattuk, hogy az IL-4 a STAT6 transzkripciós faktoron keresztül fokozza a PPAR-gamma aktivitását. Ehhez szükséges a két transzkripciós faktor kölcsönhatása a PPAR-gamma célgénének promóterén. A STAT6 tehát elősegíti a PPAR-gamma DNS-hez kötődését és aktivitását, aminek eredményeképpen több gén transzkripciója magasabb szinten indukálódik. Eredményeink szerint a STAT6 szükséges a PPAR-gamma működéséhez, nélküle elmarad a PPAR-gamma által indukált génexpressziós válasz. Ez a szabályozás egyirányú, fordított esetben a PPAR-gamma nem szükséges az IL-4 által kiváltott STAT6 válasz létrejöttéhez. Ezek alapján úgy tűnik, hogy egy új mechanizmust találtunk, ami lehetővé teszi két szignálút kölcsönhatásán keresztül a magreceptorok aktivitásának szabályozását. Ezzel lehetővé válik, hogy megmagyarázzuk, hogy az egyik transzkripciós faktor fizikai kölcsönhatáson keresztül hogyan teszi lehetővé a másik működését, és végső soron a környezeti hatásoknak megfelelő, adott sejttípusra jellemző génexpressziós szabályozás létrejöttét.

#### E0-03

**Rare diseases in the 7th EU Framework Programme for Research and Technological Development**

DOBIRTA Gratiela

*European Commission, Brussels, BELGIUM*

## E1 - Genom instabilitás és karcinogenezis

### E1-01

#### Kemoszenzitivitás genetikai alapjainak vizsgálata ecetmuslicában

DEÁK Péter

SZTE, Genetikai Tanszék, Szeged

A kemoterápiás kezelések célja a daganatos szövetek szelektív eliminálása. Ez az eljárás azokon a tapasztalati tényeken alapszik, hogy rákos sejtek érzékenyebbek DNS-t károsító szerekkel szemben, mint a daganatokat körülvevő normális testi sejtek. Sajnos azonban ezek a szerek hatással vannak a nem daganatos sejtekre is, és éppen ez okozza a kemoterápiás kezeléseket kísérő toxikus mellékhatásokat. A kemoterápia specifitását és hatékonyságát jelentősen növelné az egyes tumorok kemosenzitivitásának előrejelzése. Feltételezhető, hogy a sejtciklus ellenőrzési mechanizmusában (checkpoint) és a DNS-hibajavításban résztvevő géneknek szerepe lehet a tumorsejtek eltérő kemosenzitivitásában. Egyrészt egyre nyilvánvalóbb, hogy az ellenőrzési folyamatok károsodása általános jelenség a tumorgenezis során. Másrészt pedig az ellenőrzési mechanizmusokban és DNS-hibajavításban résztvevő gének mutánsai az eddig vizsgált kísérleti fajokban fokozott érzékenységet mutattak DNS-t károsító szerekkel szemben, köztük olyanokkal szemben is, amelyeket kemoterápiában alkalmaznak. Ebben a projektben ismert *Drosophila* checkpoint és DNS-hibajavítási mutánsok érzékenységét határozzuk meg engedélyezett kemoterápiás szerekkel szemben. A mutánsok azonos genetikai háttérrel rendelkeznek, ezért a mutánsok között megfigyelhető érzékenységbeli különbség közvetlenül kapcsolható az érintett gének funkciójához. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a különböző checkpoint mutánsok jelentős érzékenységbeli különbséget mutatnak az alkalmazott szerekkel szemben. Ez annak lehet a következménye, hogy az egyes gének eltérő mértékben járulhatnak hozzá az ellenőrzési mechanizmusok működéséhez, illetve pleiotrópok. Kiugró toxicitási értékeket kaptunk bizonyos drog – mutáns kombinációkban, amelyek jelentős szelektivitásra utalnak. Mivel a legtöbb homozigóta mutáns érzékenyebbnek bizonyult bizonyos szerekkel szemben, mint a heterozigóták, feltételezhető, hogy az egyes checkpoint és DNS-hibajavítási gének mutációi azok, amelyek alapvetően meghatározzák a sejtek genotoxikus hatásokra adott válaszát. Mivel mind a checkpoint, mind pedig a DNS-hibajavítási gének jelentős evolúciós konzerváltságot mutatnak az élesztőtől az emberig, azt gondoljuk, hogy a kísérleteink hasznos információval szolgálnak a checkpoint mutációk szerepéről a tumorok kemosenzitivitásának kialakításában, valamint hatékonyabb klinikai tesztek és tumorra szabott kemoterápia kidolgozásában.

### E1-02

#### A transzléziós DNS polimerázok szabályozása

SZÜTS Dávid

St George's, University of London, London, United Kingdom

A DNS-replikáció gyakran sérült szakaszokba ütközik a templát szálon. A replikáció továbbhaladásának biztosításához szükséges folyamatok egyike a transzléziós szintézis (TLS), melynek keretében a replikációs polimeráz helyét ideiglenesen átveszi egy speciális polimeráz, amely képes a károsodott templátot felhasználva új DNS-szálat szintetizálni. A TLS folyamat mutációk kialakulásához vezethet, míg a sérült szakaszok garantáltan hibamentes replikációjára a testvérkromatida újonnan szintetizált szálat felhasználó templátváltó mechanizmusok segítségével van lehetőség. Ezen folyamatok vizsgálata alapvető fontosságú a tumoros betegségek megértésének és kezelésének szempontjából. Mutáns DT40 csirke sejtvonalatok felhasználva megvizsgáltuk a sérült DNS replikációját lehetővé tevő folyamatok, első sorban a TLS, szabályozását. A TLS polimerázok a PCNA replikációs fehérjéhez kötve kerülhetnek a megfelelő pozícióba a templáton. A TLS polimerázok a PCNA-hoz kétféle módon köthetnek; vagy a PCNA monoubikvitilált formájához kapcsolódva, vagy az Y polimerázcsaládba tartozó REV1 fehérjén át. Nem ubikvitilálható PCNA, illetve REV1 mutáns sejtekbe bejuttatott, szintetikus DNS-léziókat tartalmazó plazmidok replikációjának vizsgálatával megmutattuk, hogy a kétféle mechanizmus egyaránt szükséges, nem redundáns szerepet tölt be a TLS szabályozásában. A T-T ciklobutil pirimidin dimer léziókon a PCNA ubikvitiláció a polimeráz  $\eta$ , míg a REV1 a polimeráz  $\zeta$  funkcióját segíti. Ennek megfelelően ultraibolya léziókon a két mechanizmus eltérően befolyásolja a mutagenikus replikáció gyakoriságát. Továbbá a PCNA ubikvitiláció hiányában a sejtekből kinyert plazmid molekulákon posztreplikációs hézagokat mutattunk ki, melyeknek jelenléte a DNS-replikáció és a TLS térbeli és esetleges időbeli elkülöníthetőségére utal.

### E1-03

#### Az ubikvitiláció szerepe a humán DNS-hiba tolerancia útvonalban

BALOGH Dávid, Juhász Sz., Burkovics P., Haracska L.

MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged

A sejtjeinkben található örökítőanyagot folyamatosan különböző károsító hatások érik. Ide tartozik az UV sugárzás, a dohányfüst, az alkohol, kemikáliák és anyagcsere folyamatok során keletkezett reaktív oxigén gyökök, amelyek megváltoztatják a DNS szerkezetét. Ennek kivédése érdekében számos DNS-hibajavító útvonal alakult ki. Ezek a mechanizmusok folyamatosan helyreállítják a DNS lánc eredeti struktúráját, mégis akadnak olyan hibák, amik nem kerülnek kijavításra a sejtciklus S fázisá-

ig. Ekkor a replikációs villa leállítását, ennek következtében kromoszómatoréseket, végső esetben a sejt halálát okozhatják. Ennek elkerülésére alakult ki a DNS-hiba tolerancia útvonal, amely különböző mechanizmusok révén képes a replikációs villa mentésére. Az útvonal első lépése a polimerázok processzivitási faktoraként azonosított PCNA molekula 164-es lizinjének monoubikvitilálása a Rad6/Rad18 komplex által. Ennek következtében a replikatív polimeráz lecserélődhet egy, a hiba átírására képes alternatív polimerázra. Egy másik, hibamentes átírást biztosító mechanizmus során a monoubikvitilált PCNA molekulát az Mms2/Ubc13/HLTF komplex az ubikvitin 63-as lizinjén keresztül poliubikvitilálja, aminek következtében a HLTF fehérje a replikációs villát képes visszafordítani. Az így létrejött DNS szerkezeten a hibával szemben lévő szál a már újonnan szintetizált utód szálról íródhat át. Harmadik lehetőségként a hiba alternatív templát váltás révén is áthidalásra kerülhet. Kutatásaink a DNS-hiba tolerancia útvonal működésének és szabályozásának pontosabb megismerésére irányulnak, melyek fókuszában az ubikvitin fehérje áll. Célunk, hogy megismerjük az egyes kulcsenzimek ubikvitilálásának pontos szerepét, hatását a résztvevő fehérjék aktivitására, és kölcsönhatásaira. Végül célunk a DNS-hiba tolerancia útvonal molekuláris mechanizmusának megértése.

#### **E1-04**

##### **A dUTPáz enzimműködés valamint az enzim-ligandum kölcsönhatás elemzése**

LEVELES Ibolya, Pécsi I., Vértessy B., Tóth J.  
*MTA Enzimológiai Intézet, Genom metabolizmus és DNS javítás csoport, Budapest*

Eszencialitását tekintve az uracil DNS-ből való kizárásában kulcs szerepet játszó dUTPáz (dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidohidroláz) csoportunk egyik fő kutatási alanyát jelenti. A közelmúlt kísérletei a reakciómechanizmusnak olyan részleteire derítettek fényt, amely a hasonló működésű nukleotid hidroláz enzimek tanulmányozása során is érdeklődésre tarthat számot. Az aromás átlapolás másfajta értelmezést is nyert, mely szerint a pi-pi kölcsönhatás nem csupán a konformáció stabilizációjában, valamint egyes fehérjék esetében az aktív központ kialakításában vehet részt, hanem a katalízis központjától viszonylag távol elhelyezkedve, finomhangolóként az átmeneti állapot stabilizálását célozza. A két-értékű fémionok kulcsszerepet játszanak egyes az enzimek mechanizmusában. Az enzimek működésének vizsgálatában gyakran használatos az EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), mely kelátorként köti meg ezen ionokat, ezáltal lehetővé válik az enzimek vizsgálata fémmentes környezetben. A dUTPáz esetében a fémek hiánya nem okoz drasztikus csökkenést az enzim aktivitásában. A közelmúltban, az előzetes irodalmi adatokkal ellentétben, a dUTPáz teljes inaktivitást jelezték EDTA jelenlétében. Ezen ellentmondások feloldására az enzim fémfüggését részletes elemzésnek vetettük alá, mely szerint az EDTA a ligandum potenciális kompetitorának bizo-

nyult a nukleotid kötőhelyén. Csoportunkban tanulmányozott uracil-DNS degradáló faktor is újszerűnek bizonyul, mivel nem létezik ismert szerkezetű homológ fehérje. Szerkezetét tekintve két különböző nukleotidtartalmú konformációban van jelen, mely inhomogenitását tekintve jelentősen megnehezíti a fehérje kristályosítását és szerkezetmegoldását. A használt módszerek jelentős hányadát részletes röntgenkristallográfiai elemzés jelenti.

#### **E1-05**

##### **Bloom-szindróma helikáz: egy DNS-átalakító motorfehérje funkcionális anatómiája**

Gyimesi M., Harami G., Sarlós K., Roy D.,  
KOVÁCS Mihály  
*ELTE, Biokémiai Tanszék, Budapest*

A humán Bloom-szindróma (BLM) helikáz a genomkarbantartás központi szereplője: változatos DNS-szerkezetátalakító aktivitásai nélkülözhetetlenek a homológ rekombináción (HR) alapuló DNS-hibajavítás során. A BLM-helikáz egy legalább hat doménből álló komplex fehérje, amely önmagában képes egyszálú DNS-en történő transzlokációra, a kétszálú DNS szálainak szétválasztására és párosítására, komplex DNS-szerkezetek átalakítására és nukleoprotein filamentumok lebontására. Részletes mechanizmus-vizsgálatot hajtottunk végre rövidített BLM-helikáz konstrukciók sorozatán, és arra a meglepő eredményre jutottunk, hogy az enzimnek a két RecA- és a Zn-kötő doménből álló minimális magja önmagában képes a fenti aktivitások elvégzésére. A helikáz oligomerizációjához viszont, amely a komplex DNS-szerkezetek által allosztérikusan indukált módon jön létre, az N-terminális domén jelenléte is szükséges. Eredményeink a minimális funkcionális motor-mag azonosítása mellett annak megértését is segítik, hogy az egyes domének illetve alegységek között milyen együttműködés szükséges az egyes mechanokémiai aktivitások során.

#### **E1-06**

##### **Az interfázisos kromatin állomány topológiai-lag elkülönült R-loop- és nick-gazdag mátrix, illetve 30-200 kbp méretű hurkokat tartalmazó szuperhelikális doménekre tagolódik**

FENYŐFALVI György, Székvölgyi L., Hegedüs É.,  
Imre L., Doan X.Q.M., Szabó G.  
*DE OEC, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen*

Korábbi munkáink során úgy találtuk, hogy mind a nyugvó, mind az osztódó emlős- és élesztő sejtek genomikus DNS állománya egyszál-töréseket (ún. nick-eket) tartalmaz, amelyek körülbelül kromatin hurok méretű (30-200 kbp) távolságonként követik egymást. Ezek az egyszál-törések izolált sejtmagokban a hisztonok eltávolítása után – ún. nukleáris „halo” preparátumon – jól jelölődtek DNS polimeráz I holoenzimmel (nick-transzláció), ellenben nem voltak kimutathatóak exonukleáz aktivitással nem rendelkező Klenow-fragmentummal vagy terminális transzferázzal, csak ribonukleáz A vagy -H1

kezelés után, ami RNS/DNS hibridek jelenlétére utalt a nick-ek közelében. Valóban, RNáz H1 kezelésre érzékeny, RNS/DNS hibrid specifikus antitesttel jelölhető helyeket találtunk a sejtmagban halo preparátumon. A transzkripció gátlása, a hibridek mennyiségének jelentős csökkenését okozta, a csökkenés üteme azok rövid féleletidejére utalt. A hibridek R-loop-oknak felelnek meg, hiszen fluoreszcensen jelzett rekombináns SSBP fehérjék kötődési helyeivel (vagyis egyszálú DNS szakaszokkal) kolokalizálódnak, sőt, azokkal FRET – vagyis molekuláris – távolságon belül találhatóak. Nukleáris halo preparátumon mind az immunfluoreszcensen jelölt R-loop-ok, mind a nick-transzlációval detektált egyszál-törések főként a centrális részre, az ún. mátrixra lokalizálódnak, míg az ezt körülvevő „halo” – azaz a kromatin hurkok – alig jelölődnek. Kvantitatív mikroszkópos analízissel (CLSM, LSC) úgy tűnik, hogy a nick-ek és az R-loop-ok is egymás környezetében foglalnak helyet. A kromatin hurkok

szuperhelicitásának és méretének tanulmányozására kifejlesztettünk egy igen érzékeny mérő módszert, mellyel kimutattuk, hogy a mátrixban jelenlévő egyszál törések ellenére a kromatin hurkok DNS szálainak szuperhelikális feszültsége megőrzött, mivel a „halo”-ba kitüremkedő negatívan túltekert DNS interkalátorokkal relaxálható és pozitívan túltekert maradt, a sejtciklus összes fázisában. A RNS/DNS hibridek szintjének változtatása, a sejtek RNS- és DNS-polimeráz, illetve topoizomeráz I és II gátlószeres kezelése jelentős hatással voltak a DNS hurkok szuperhelicitására és a hurkok méretére. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az interfázisos kromatin állomány R-loop- és nick-gazdag mátrix, illetve 30-200 kbp méretű hurkokat tartalmazó szuperhelikális doménekre való tagolódása szigorúan szabályozódik mind a transzkripcióval, mind a replikációval összefüggésben. Grantok: OTKA 72762, TAMOP 4.2.2-08/1-2008-0015, TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 project.

## E2 - Biokémiai analitika

### E2-01

#### **Fehérjék azonosítása és kvantitatív meghatározása 1D- és 2D-PAGE elválasztást követően „label-free” tömegspektrometriás módszerrel**

Szabó Z., Szeliné Szomor J., Földi I., JANÁKY

Tamás

*SZTE, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged*

Fehérje-expressziós különbségek meghatározására a proteomikában legelterjedtebb eljárás a vizsgálati minták 2D-poliakrilamid gélelektroforézis képeinek összehasonlítása, majd az eltérő intenzitású foltokban található fehérjék tripszines emésztést követő tömegspektrometriás (LC-MS vagy MALDI-MS) azonosítása. A legtöbb esetben azonban egy foltban több fehérje is azonosítható, jelentősen megnehezítve ezáltal a színintenzitáson alapuló mennyiségi információ hozzárendelését az egyes fehérjékhez. A probléma megoldására „jelzés-mentes” (label-free) tömegspektrometriát (LC-MSE) alkalmazva kifejlesztettünk egy eljárást, melynek segítségével egyrészt összehasonlítható egy fehérje két minta (pl. kontrol és kezelt) azonos gél-sávjában (1D-PAGE) vagy azonos foltjában (2D-PAGE) lévő mennyisége, másrészt meghatározható az egy sávban/foltban lévő fehérjék egymáshoz viszonyított aránya. Megfelelő tömegspektrometriás mérési és kiértékelési technika alkalmazásával módszerünk rutinszerűen alkalmazható, s alternatívája lehet a fehérje-expressziós változások immunoblott technikán alapuló meghatározásának.

### E2-02

#### **Biomarker keresés humán mintákban II-es típusú diabétesz és Crohn betegség esetén tömegspektrometria és kapcsolt technikák segítségével**

<sup>1</sup>TAKÁTSY Anikó, <sup>1</sup>Böddi K., <sup>2</sup>Wittmann I.

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>PTE ÁOK, II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum, Pécs

Számos glikolipidet és glikoproteint azonosítottak biomarkerként, mely új terápiás és diagnosztikus technikák kifejlesztését teszi lehetővé. A nem-enzimatis glikációs folyamatokban (pl. diabétesz) képződő Amadori termékek és glikációs végtermékek tehetők felelőssé többek között a cukorbetegség komplikációi között szereplő diabéteszes nephropátia és retinopátia kialakulásáért. Az 1970-es évek óta a hemoglobin A1c-t használják markerként rutinszerűen a klinikai diagnosztikában a cukorbeteg 4–6 hetes glükóz kontrolljában. Specifikusabb és informatívabb fehérje biomarkerek feltérképezése a glikémiás státusz jobb felmérését és a glikáció diabéteszes komplikációkban betöltött szerepének jobb megértését teszi lehetővé. A Crohn betegség az emésztő traktusban jelentkező autoimmun betegség, mely a szájtól a végbélig a teljes emésztőrendszert támadhatja. Miután jelenleg nincs sikeresen alkalmazható kezelés, a terápia az aktív fázisok kiküszöbölésére és az inaktív fázis fenntartására korlátozódik. A betegség egyes stádiumainak azonosítása még manapság is kihívásnak számít. Munkánk során új biomarkerek azonosítását tűztük ki célul, melyek egyszerű és gyors diagnosztizálást tesznek lehetővé. Ehhez fordított fázisú és boronát affinitás kromatográfiás eljárásokat használtunk melyet tömegspektrometriás azonosítás követett. Az alkalmazott mátrix segítette lézer deszorpciós ionizációs tömegspektrométer, repülési idő analizátoros detektorral pontos meghatározást tett lehetővé széles tömegtartományban. E technikák segítségével két potenciális biomarkert azonosítottunk II-es típusú diabétesz esetén és két fehérjét, melyek közül az  $\alpha 1$ -savas-glikoprotein overexpressziója, illetve a Zn- $\alpha 2$ -glikoprotein meg-

jelenése csak a Crohn betegség aktív fázisára jellemző.

## E2-03

### Tömegspektrometria és bioszimilitás

HEVÉR Helga

Richter Gedeon Nyrt., Budapest

A rekombináns technológiával előállított fehérjék a gyógyszerhatóanyagok új generációját képviselik. A Richter 2007-ben hozta meg azt a stratégiai döntést, amely szerint (a magyar gyógyszeriparban elsőként) belép a biotechnológia területére mind biotechnológiai kutatás-fejlesztés, mind gyártás területén. Célunk bioszimiláris fehérjék előállítása és gyártása. Bár a Richter több évtizede alkalmaz különféle biotechnológiai eljárásokat kismolekulás gyógyszerhatóanyagok gyártása során, humán gyógyászati felhasználásra alkalmas rekombináns fehérjék baktérium és emlős sejtekben történő termeltetésével eddig még nem foglalkozott. A kutatás-fejlesztés palettájának ilyen irányú kiterjesztése az analitikusok számára is hatalmas kihívást jelent. A több évtizedes kismolekulás gyakorlattal szemben egy teljesen új szemléletmódot kell elsajátítani a fehérjék karakterizálásához. Hogyan kell kezelni egy fehérjét? Milyen komplementer analitikai módszerekkel maximálható a fehérje egy kérdéses sajátosságának teljes feltérképezése? Az előadás egy rövid áttekintés ad arról, hogy a tömegspektrometriának milyen szerep és milyen kihívások jutnak egy bioszimiláris fehérje fejlesztése során, mielőtt a hatóanyag humán gyógyászati felhasználásra alkalmassá válik.

## E2-04

### Bioszimilitás és NMR

KISS Róbert

Richter Gedeon Nyrt., Budapest

A biotechnológiai kutatások és ezen belül a fehérje alapú hatóanyag gyártása, a világon megfigyelhető tendenciákkal összhangban, egyre jelentősebb teret nyer. A biotechnológia célja, hogy élő szervezetek felhasználásával állítsunk elő számunkra fontos vegyületeket. Ezen folyamatok összetettsége új kihívások elé állítja az gyógyszer-analitikát, köztük az NMR spektroszkópiát. Előadásunkban szeretnénk bemutatni az NMR spektroszkópia lehetőségeit Bioszimiláris analitika területén, kiemelve az un. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) módszer alkalmazhatóságát a kismolekulás szennyezések azonosítása során, valamint a fehérje alapú gyógyszerhatóanyagok szerkezeti összehasonlításának lehetőségét.

## E2-05

### Belső molekuláris mozgások és funkcionális szerepük a humán epesav-kötő fehérjében

TÓKE Orsolya

MTA KKK, Budapest

A vékonybél távoli szakaszában termelődő humán

epesav-kötő fehérje (I-BABP) kulcsszerepet tölt be az epesavak metabolikus célbajuttatásában, és ezáltal a zsírsavak, a koleszterin, és a zsírban oldódó vitaminok felszívódásában. A fehérje két kötőhellyel rendelkezik, amelyek között trihidroxí-epesavak esetén erős, dihidroxí-epesavak esetén mérsékelt pozitív kooperativitás működik (Tóke *et al.*, 2006). Kinetikai vizsgálatok (Tóke *et al.*, 2007) valószínűsítik, hogy a ligandumok kötődését egy lassú konformációs változás kíséri, amely stabilizálja a fehérjét. Az I-BABP-epesav kölcsönhatás szerkezeti és dinamikai aspektusainak feltárása érdekében nagyfelbontású mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk, amelynek során feltérképeztük a szabad és az epesavval komplexált I-BABP fehérjében különböző időskálán zajló belső molekuláris mozgásokat. A dinamikai vizsgálatok eredményei megerősítik korábbi elképzelésünket, miszerint az epesav-kötődést jellemző pozitív kooperativitásban alloszterikus tényezők szerepe valószínűsíthető. Irodalomjegyzék: Tóke O, Monsey JD, DeKoster GT, Tochtrop GP, Tang C, Cistola DP. Determinants of cooperativity and site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *Biochemistry* 45: 727-737 (2006); Tóke O, Monsey JD, Cistola DP. Kinetic mechanism of ligand binding in human ileal bile acid binding protein as determined by stopped-flow fluorescence analysis. *Biochemistry* 46: 5427-5436 (2007). Köszönetnyilvánítás GVOP-3.2.2.-2004-04-0210/3.0 és OTKA F68326.

## E2-06

### Az EDTA, mint a dUTPáz enzim inhibitora

<sup>1</sup>LOPATA Anna, <sup>1</sup>Takács E., <sup>2</sup>Jórárt B., <sup>1</sup>Leveles I., <sup>2</sup>Viskolcz B., <sup>1</sup>Vértessy G.B., <sup>1</sup>Tóth J.

<sup>1</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Genom metabolizmus és DNS-hibajavítás Kutatócsoport, Budapest;  
<sup>2</sup>SZTE, Kémiai Informatika Tanszék, Szeged

A dUTPáz enzim, amely a DNS integritásáért felelős, több organizmusban is bizonyítottan esszenciális (élesztő: Gadsden *et al.* 1993, mikobaktériumok: Pécsi *et al.*, publikálás alatt). Ezen enzim tartalmaz egy Mg<sup>2+</sup> kofaktort, amely a szubsztrát dUTP-hez kötődik. A Mg<sup>2+</sup> kofaktor nélküli katalitikus tulajdonságok vizsgálatához legtöbbször a hatfogú kelátor EDTA-t (etiléndiamin-tetraecetsav) adagolják az enzimhez. Noha az általános vélekedés szerint az EDTA csak a fémionokkal való komplexképzéssel befolyásolja az enzim aktivitását, méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a feleslegben lévő nagy mennyiségű EDTA az enzimhez kötődik és közvetlenül is gátolja annak működését. Az EDTA által kifejtett gátló hatást részletesen megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy e kelátor vegyes típusú inhibícióval gátolja a dUTPáz működését, kompetitív és nemkompetitív karakterrel egyaránt. Az enzim aktív centrumában elvégzett dokkolási számításaink azt mutatják, hogy az EDTA képes kötődni az enzimhez, hasonló helyet foglal el az aktív centrumban, mint a fiziológiás szubsztrát dUTP és ugyanazokhoz a konzervatív kölcsönhatási pontokhoz kötődik, mint a dUTP cukor és foszfát részei. A számításokra



alapozva az enzim-EDTA komplex kristályosításával is próbálkoztunk, amely kísérletek során két, jól diffraktáló, 2 Å körüli felbontású kristályszerkezetet kaptunk. Az EDTA-nak megfelelő elektron-sűrűség mindkét szerkezetben megtalálható volt. Kísérleteink, számításaink és kristályszerkezeteink egyértelműen alátámasztják, hogy az EDTA kötődik a dUTPáz enzim aktív centrumába, ezzel közvetlenül is gátolva a nukleotid hidrolízist. Mivel a nukleotid kötő oldalláncok a legtöbb nukleotid hidrolázban hasonlóak, feltételezhetjük, hogy a dUTPáz enzim esetében tapasztalt gátlás más nukleotid hidrolázoknál is felléphet. Ezért eredményeink alapján a fémmentes körülmény előállításához javasolható a lehető legkisebb mennyiségű EDTA használata, amelyet a fém-EDTA komplex disszociációs állandójából lehet megbecsülni.

## E2-07

### Membrán-permeábilis enziminhibitorok különböző szövetekből kivont lipidekkel való kölcsönhatásának vizsgálata felületi plazmon-rezonancia (SPR) elvén alapuló mérési technikával

BÉCSI Bálint, Gergely P., Erdődi F.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A membránpermeábilis enzim inhibitorok hatásmechanizmusában fontos szerepe van a molekulák membránnal történő asszociációjának, illetve e kölcsönhatás asszociációs-disszociációs kinetikájának. Az SPR elvén alapuló mérés technikák lehetőséget nyújtanak membrán asszociációs vizsgálatok kivitelezésére is. Borjú agy-, szív- és májsejtekből kinyert liofilizált teljes lipid kivonatokból preparált micellákat megközelítőleg azonos mértékben a szenzorchip felületén immobilizáltunk. Vizsgáltuk a protein foszfatáz inhibitorok (okadánsav, mikrocisztin, ciklosporin A, tautomycin, cantharidin, epigallocatechin-3-gallát), valamint az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz leghatékonyabb gátlószerének (Nitro-L-arginine methyl-ester) asszociációját a különböző szövetekből kivont lipidekhez. A cantharidin és az L-NAME kötődését a különböző eredetű lipidekhez hasonló szenzorgramok jellemzik és az illesztett görbékből számolt egyensúlyi állandók csak kis mértékben térnek el. Ezzel szemben a OA, MC-LR, CsA és EGCG nagyobb affinitással kötődik a szív- és májszövetből kinyert lipidekhez, mint az agyéhoz. A tautomycin lipidekkel való kölcsönhatása nagyon gyenge, különösen a szívből kivont lipidekkel. A rezonanciajel maximumok koncentráció függéséből arra következtettünk, hogy az EGCG lipidekkel történő asszociációja jelentős koncentrációfüggést mutat, míg ez a mikrocisztinre csak alacsonyabb koncentráció-tartományban jellemző. Ezen kölcsönhatások asszociációja és disszociációja meglehetősen gyors, ami összhangban lehet azzal a feltételezett mechanizmussal, hogy az enzimek hatásos gátlásához nem csak a membránnal való asszociációs készség, hanem a membránról történő viszonylag gyors disszociáció is szükséges. Az SPR technikán alapuló módszer hozzájárul különbö-

ző inhibitorok membránpermeációs sajátosságainak vizsgálatához, illetve alkalmas az inhibitorok ezen tulajdonságainak összehasonlítására. A kutatásokat az OTKA K68416, CNK80709 és TÁMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019 DERMINOVA projektek támogatták.

## E2-08

### Neuropeptidok vizsgálata nagyfelbontású tömegspektrometriás képkalkotó módszerekkel

<sup>1</sup>Maász G., <sup>2</sup>Pirger Zs., <sup>1</sup>Bóna Á., <sup>1</sup>Jámbor É., <sup>1</sup>MÁRK László

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Kísérletes Állattani Osztály, Tihany

A tömegspektrometrián alapuló képkalkotási (IMS) technikák alkalmasak biomolekulák széleskörű, nagy érzékenységgel, közvetlenül a szöveti metszetből történő feltérképezésére, valamint nagyszerűen kapcsolhatók egyéb, rutin képkalkotási és proteomikai módszerekkel. A legelterjedtebb IMS scanning technika a mátrix-segítette lézer deszorpció/ionizációs tandem repülési idő analízis tömegspektrometria (MALDI TOF/TOF MS). Az eljárás kiválóan alkalmazható különböző eredetű szöveti minták széles spektrumú molekuláris vizsgálatára, amelyhez hozzájárul a módszer reprodukálhatósága, jó tömeg felbontóképessége, gyorsasága és kiváló térbeli felbontása (ca. 5-10 mikrométer). A módszer segítségével egyaránt vizsgálhatók normál idegrendszeri folyamatok (pl. hosszú távú, asszociatív memória), valamint különböző neurodegeneratív elváltozások során tapasztalható molekuláris változások is. Munkánk során puhatestű modellszervezetek (éti csiga - *Helix pomatia*; nagy mocsári csiga - *Lymnaea stagnalis*) paraformaldehid fixált idegrendszeri mintáinak nagyfelbontású (pár mikrométeres) biomolekuláris feltérképezésére MALDI TOF/TOF és MALDI LTQ Orbitrap képkalkotási technikát alkalmaztunk. A fixált minták szövet-előkészítése során az újonnan kifejlesztett, magas reprodukálhatóságú, kombinált, mátrix (CHCA) - zselatin (10%) beágyazási technikát alkalmaztuk. A kifejlesztett állapot agydúcából, valamint kéthetes *Lymnaea* embriókból 8-10, illetve 15 µm-es kriosztát metszeteket készítettünk, majd azokat ITO-bevonatú speciális lemezekre gyűjtöttük. A speciális lemezekre gyűjtött csiga minták feldolgozása során, számos, korábban jól ismert neuropeptid (mint pl. PACAP-38, PACAP-27, FMRFa, PMSMLRLa) nagy felbontású, sejten belüli, térbeli feltérképezését végeztük el az alkalmazott IMS módszerekkel.

## E2-09

### Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary System

ROOS Natascha

Kromat Kft., Budapest

The Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC system is a dedicated solution for large bio-molecule analysis. The design of new metal-free components

in the sample flow-path and the absence of iron and steel in solvent delivery ensures the integrity bio-molecule, minimizes unwanted surface interactions and increases column life-time. This is ideal when working under harsh solvent or pH conditions. The power ranges from lowest pressure for traditional

bio-purification columns up to high pressure STM analytical bio-columns. Together with the new Bio-HPLC column portfolio for SEC and IEX and 10 x higher sensitivity, highest resolution per time is achieved for protein and NBE characterization.

## E3 - Membrán és citoskeleton

### E3-01

#### **Lipidomika: membránok, stressz, betegségek**

BALOGH Gábor, Péter M., Török Zs., Gombos I., Glatz A., Gungor B., Crul T., Horváth I., Vígh L.  
MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A lipidomika, az „omika” korszak e gyorsan fejlődő tudományterülete igyekszik teljes minőségi és mennyiségi információt adni a lipidek összességéről, képződésükről és lebomlásukról, valamint metabolikus és transzportfehérjék működéséről a sejtorganellumok, sejtek, szervek, illetőleg a teljes szervezet szintjén. Ezen túlmenően számba veszi, hogy milyen kölcsönhatásban állnak a lipidek a génekkel vagy fehérjékkel, és ezen keresztül hogyan szabályozzák a sejtek működését. Vizsgálatainkban a sejtszintű stresszválasz kutatását a lipidomika eszköztárával kombinálva kimutattuk, hogy a hő vagy membránfluidizáló szer által előidézett membrán módosítások specifikus változásokat eredményeznek a lipidösszetételében. Legújabb eredményeink szerint nemcsak a membránlipidek, hanem a korábban pusztán raktározó szereppel felruházott zsírcseppecskék, 'lipid droplet'-ek, is aktív részesei lehetnek a stresszelhárító apparátusnak. Ezt támasztja alá az a többféle organizmusra (hasadó élesztő, különböző emlős sejtek) is érvényes megfigyelésünk, miszerint azok hiperfluidizációs stresszre triglicerid szintjük növelésével válaszolnak. A stressz kutatás és a lipidomika új utakat nyit a betegségek felismerésében és kezelésében, hiszen számos betegségről tudjuk, hogy azokban a lipidek „elromlása” szoros kapcsolatban áll a patológias állapot kifejlődésével. Cukorbeteg patkányok szöveteinek lipidmolekulaspeciesz szintű elemzéséből nyert eredményekkel mutatjuk be, hogy a lipidomon hagyott egyedi ujjlenyomatok alapján hogyan lehetséges az egészséges, a beteg, vagy éppen a gyógyszerkezelt állatokra jellemző biomarker mintázatok felismerése. A lipid diagnosztika, a lipidterápia, valamint a bioinformatika párhuzamos fejlődése révén válnak összekapcsolhatóvá az „omikai” irányvonalak, jelentősen átstrukturálva szemléletünket. Még a „klasszikus” biokémiai kutatásokban is új kérdésfelvetési, kísérlettervezési elveket iniciál majd a kvantitatív, nagy áteresztőképességű lipidomikai módszerek elterjedése.

### E3-02

#### **Az ICAM3 szerepe a makrofágok és az apoptotikus neutrofil granulociták közötti kapcsolatban**

KRISTÓF Endre Károly, Zahuczky G., Doró Z., Fésüs L.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Naponta több százmilliárd fiziológiás módon elpusztult sejt komplikációmentes eltávolítását elsősorban a mononukleáris fagocita rendszer végzi. A hídképző molekulák és receptorok – melyek felismerik az elhaló sejteket – nagyfokú redundanciát mutatnak és számos jelátviteli útvonallal kapcsolatban állnak. Korábbi „TaqMan Low-density array” mérés számos (ADORA2A, FPRL1, ICAM3, THBS1) gén szerepét valószínűsítette a fagocitózis folyamatának fontos elemeként, mivel ezen gének kifejeződése a fagocitózis folyamata alatt jelentősen fokozódott. RNS interferencia (RNAi) jelenségén alapuló lecsendesítést követően – melyet transzláció szintjén Western-blottal és felszíni immunfestéssel ellenőriztük – kizárólag az ICAM3 gén kifejeződésének gyengülése okozott szignifikáns fagocitózis csökkenést. Célunk volt az ICAM3 fehérje szerepének és lehetséges kölcsönható partnereinek vizsgálata mindkét sejt oldaláról. Vizsgálatainkhoz humán vérből izolált monocitákat öt nap alatt makrofágokká differenciáltattuk és humán vérből szeparált apoptotikus neutrofil granulocitákkal mértük fagocitózis képességüket. A fagocitózis mérését a sejtek fluoreszcens festésével és a fagocitált sejthányad áramlási citometriával történő meghatározása alapján végeztük, mely előtt közvetlenül gátló antitestekkel előkezeltük az elhalt és a bekebelező sejteket. A fagocitózis képesség szignifikáns csökkenését az ICAM3 (CD50) blokkolását követően mindkét irányból észleltük. Az LFA-1 heterodimer CD11a alegységének gátlása csak a makrofágok oldalán csökkentette szignifikánsan a fagocitózist, míg a DC-SIGN blokkolása nem befolyásolta a fagocitózis képességet. Mindkét transzmembrán fehérje az ICAM3 ismert nagy affinitású receptora. A fagocitózis folyamán az ICAM3 glikoprotein szerepe ismert volt az elhaló sejt oldaláról, de bizonyítható jelentősége a makrofágokon kifejeződő adhéziós fehérjéknek is. Az ICAM3 kölcsönhatásainak pontos feltérképezésére még további vizsgálatok szükségesek.

### E3-03

#### **A TIP47 fehérje a mitokondrium membrán stabilizálásával részt vesz a mitokondrium mediálta sejthalál szabályozásában**

Cseh A., HOCSÁK Enikő, Rácz B., Szabó A., Szigeti

A., Sümegi B.  
*PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs*  
A TIP47 (Tail-interacting protein, más néven PP17) a PAT fehérjecsald tagja, amely a mannóz-6-foszfát receptornak az endoszómából a trans-Golgiba történő transzportjához szükséges. Számos irodalmi adat utal arra, hogy részt vesz a lipid dropletetek metabolizmusában, viszont a mai napig nincs adat arról, hogy milyen szerepet játszhat a sejthalál folyamatok szabályozásában. NIH3T3 sejteket transzfektáltunk TIP47 cDNS-t tartalmazó pcDNA vektorral, a sejteket H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezeltük, végül MTT-teszttel mértük a túlélő sejtek számát. A TIP47 kiütéséhez Dicer-Kit-tel készített dsRNA-t használtunk HeLa sejtvonalon. A transzfekció és a kiütés hatékonyságát Western-blottal ellenőriztük. Mitokondriális membrán potenciált (MMP) *in vitro* patkány májból izolált mitokondriumokon mértünk spektrofotométerrel, *in vivo* pedig TIP47 overexpresszált és kezelt NIH3T3 sejteken JC-1 festést alkalmaztunk fluoreszcens mikroszkópia során. Az áramlási citometriás vizsgálathoz FITC-konjugált annexin V-tel és propidium jodiddal jelöltük a kezelt sejteket. Igazoltuk, hogy TIP47 jelenlétében megnő a túlélő NIH3T3 sejtek száma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálta sejthalálban. A fehérje siRNA technikával történő kiütése túlélési hátrányt jelentett a sejtek számára. Western blottal kimutattuk, hogy az eredetileg citoplazmatikus fehérje kezelés hatására a mitokondriumban is megjelenik, miközben a citoszólban a mennyisége csökken. *In vitro* és *in vivo* kísérletekkel is bizonyítottuk, hogy a TIP47 a mitokondrium membrán hiperpolarizációját okozza és csökkenti a Ca<sup>++</sup> által indukált mitokondrium membrán depolarizációt. Tekintettel arra, hogy a mitokondriumnak szerepe lehet mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthalálban áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk azok elkülönítésére. Az eredmények egyértelműen a TIP47 fehérje védő szerepét igazolták. Az eredmények függvényében úgy gondoljuk, hogy a korábban már leírt funkciók mellett, a TIP47 a mitokondrium membrán közvetlen stabilizálásával részt vesz a mitokondrium mediálta sejthalál szabályozásában.

### E3-04

#### Lizofoszfátidsav és gelsolin kölcsönhatásának jellemzése

BAKSA Attila, Varga A., Besztercei B., Liliom K.  
*MTA Enzimológiai Intézet, Budapest*

A jelátviteli folyamatokban számos, a sejtmembránhoz kötődő komplex vesz részt, amelyek moduláris szerkezetű fehérjéket, valamint lipideket tartalmaznak. A jelátviteli fehérjék moduláris felépítése teszi lehetővé a többkomponensű fehérje-lipid komplexeket összetartó domén-domén illetve domén-lipid kölcsönhatások létrejöttét. Jelenleg is számos evolúciósan konzervált lipiddomén ismert, amelyek általánosan elterjedtek az eukarióták körében. Egy fiziológiai szempontból jelentős lipid mediátor, a lizofoszfátidsav (LPA) specifikus sejtfelszíni receptorokon hat. Emellett képes aktiválni a PPAR $\gamma$  nukleáris receptort, valamint számos sejtmembránban

zajló folyamatot befolyásol eddig nem azonosított célfehérjéken, mechanizmusokon keresztül. Korábban kimutatták, hogy az LPA kötődik a gelsolinhoz, amely a sejtek egyik aktin-filament daraboló fehérjéje, és interferál a gelsolin foszfatidilinozitol-biszfoszfát (PIP2) kötésével. A kölcsönhatás molekuláris részletei azonban nem ismertek. Feltevésünk szerint az LPA a gelsolin pleckstrin homológia (PH)-doménjéhez képes kötődni és ezáltal befolyásolni a fehérje aktin-filament daraboló hatását, ezen keresztül a sejtmozgást és sejthalatot. Munkánk során jellemezni akarjuk a LPA gelsolinhoz való kötődését és annak funkcionális következményeit. Fluoreszcencia-spektroszkópiái, CD és ITC méréseink azt mutatják, hogy LPA a kritikus micellaképző koncentrációja feletti koncentrációban mutat kötődést a gelsolinnal. Vagyis a fehérje nem az egyedi lipid molekulákkal, hanem a lipid asszociált formájával hat kölcsön. Ez a kölcsönhatás az LPA-ra szelektív, nanomólos egyensúlyi disszociációs állandóval jellemezhető és a gelsolin mindkét izoformájával, valamint az általunk azonosított és expresszált PH-doménjével megfigyelhető. Ezek az eredmények jól korrelálnak csoportunk korábbi eredményeivel, melyekben pl. a calmodulin és a szfingozilfoszforilkolin, valamint a  $\beta$ 2-mikroglobulin és a LPA között mutatunk ki hasonló jelenséget.

### E3-05

#### EBP50/NHERF1 fehérje vizsgálata endotél sejtekben

BORATKÓ Anita, Gergely P., Csontos Cs.  
*DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

Az NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor) családba tartozó NHERF1-et először vese epithél sejtek apikális régiójában elhelyezkedő regulátor fehérjeként írták le. Később az ERM (ezrin-radixin-moesin) fehérjékkel való asszociációjáról is beszámoltak, innen ered másik neve, EBP50 (ERM-binding phosphoprotein of 50 kDa). A fehérje két PDZ domént tartalmaz és egy ERM-kötő régiót a C-terminális végén. Szekvenciájában több foszforilációs helyet azonosítottak, a kinázok, melyek ezen helyek foszforilációjáért felelősek, már ismertek. Például HeLa sejtekben az EBP50 sejtciklus függő módon foszforilálódik a CDK1 által. Ezzel szemben a foszfatázok, melyek a reverzibilitást biztosítják, még nem. Az eddigi vizsgálatok főleg epithél sejteken zajlottak, jelen munkánkban marha tüdő artéria endothél sejteken (BPAEC) tanulmányoztuk az EBP50 lokalizációját valamint a potenciális foszfatázokat, melyek felelősek lehetnek a mitózisban foszforilált EBP50 defoszforilációjáért. Sejtfractionálással mind a citoplazma, mind a magi frakcióban detektálni tudtuk a fehérjét. Immunfluoreszcenciás kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy az EBP50 az endothél sejtekben főleg a magban és a perinukleáris régióban helyezkedik el. Osztódó sejtekben lokalizációja megváltozik és a citoplazmába transzlokálódik. Western blot kísérletekben a G2/M fázisban szinkronizált sejtek lizátumában az EBP50 foszforilációját figyeltük meg. Specifikus

foszfatáz gátlószerekkel történő vizsgálatainkban, 5 nM okadánsav képes volt gátolni a defoszforilációt, mely a PP2A szerepére utal. Immunoprecipitációs kísérletekben kimutattuk az EBP50 kölcsönhatását a PP2A A regulátor és C katalitikus alegységével is, emellett osztódó sejtekben immunfluoreszcenciával

a két fehérje ko-lokalizációját detektáltuk a citoplazmában. Ereményeink alapján elmondható, hogy a PP2A szerepet játszik a defoszforilációban, valamint az EBP50 megjelenése az endothél sejtekben sejtciklus függő módon változik. A munkát támogatta: OTKA CNK80709 (GP).

## E4 - Pathobiokémia

### E4-01

#### Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and SIRT1 in metabolic regulation

<sup>1</sup>BAI Péter, <sup>2</sup>Canto C., <sup>1</sup>Brunyánszki A., <sup>1</sup>Szántó M., <sup>3</sup>Kiss B., <sup>4</sup>Schreiber V., <sup>2</sup>Auwerx J.

<sup>1</sup>University of Debrecen, Department of Medical Chemistry, Debrecen; <sup>2</sup>Ecole Polytechnique Fédérale De Lausanne Physiolog, Laboratory of Integrative and Systems, Switzerland; <sup>3</sup>University of Debrecen, Department of Dermatology, Debrecen; <sup>4</sup>Université De Strasbourg, France

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 and -2 were described originally as DNA repair proteins. However recent discoveries have suggested that PARP-1 and -2 may influence metabolic processes through influencing metabotropic receptors or signal transduction pathways involved in metabolic regulation. Hereby we show that PARP-1 and -2 may influence SIRT1, an important metabolic regulator. The deletion of PARP-1 or -2 enzymes have led to hypomorphy, enhanced oxygen consumption, improved glucose tolerance and provided protection against high fat feeding. In both strains improved metabolic features were associated to increased muscular mitochondrial function that was linked to SIRT1 induction. SIRT1 is an NAD<sup>+</sup>-dependent class III protein deacetylase that upon induction through deacetylating PGC-1 $\alpha$  and FOXO1 induce mitochondrial activity. The molecular background of SIRT1 induction was different in PARP-1<sup>-/-</sup> and -2<sup>-/-</sup> mice. We identified PARP-2 as a negative regulator of SIRT1 promoter. Upon the depletion of PARP-1 we have observed increase in NAD<sup>+</sup> levels both *in vivo* and in cellular models making it very likely that the disruption of PARP activity upon PARP-1 depletion enhance NAD<sup>+</sup> levels and in turn boost SIRT1 activity. To verify this hypothesis we turned to investigate the effects of PJ34, a PARP inhibitor. We have observed the induction of mitochondrial biogenesis, in a SIRT1-dependent manner in C2C12 myotubes upon PJ34 treatment and accordingly *in vivo*, in skeletal muscle after four days of PJ34 treatment. We propose hereby that PARP-1 and PARP-2 can influence the energy homeostasis through modifying SIRT1 activity. Importantly, this process can be exploited pharmacologically, as PARP inhibitors are capable of turning on mitochondrial biogenesis and energy expenditure. Supported by: Bolyai fellowship (PB); NIH FR-26/2009, Baross program Seahorse grant; OTKA PD83473, IN80481; Mecenatura Mec-8/2011.

### E4-02

#### A PARP-2 depléció hatásának vizsgálata a SIRT1 aktivációjára

<sup>1</sup>SZÁNTÓ Magdolna, <sup>2</sup>Rutkai I., <sup>1</sup>Hegedűs Cs., <sup>2</sup>Czikora Á., <sup>1</sup>Rózsahegyi M., <sup>1</sup>Gergely P., <sup>2</sup>Tóth A., <sup>1</sup>Bai P.

<sup>1</sup>DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>DE OEC, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Kardiológiai Intézet, Debrecen

A SIRT1 egy NAD<sup>+</sup>- függő deacetiláz enzim, mely a fehérjék lizin oldalláncait deacetilálja, miközben egy NAD<sup>+</sup> molekulát használ szubsztrátként és ezen keresztül érzékeli a sejtek energiaállapotát. Képes az energiahiányos állapot ellensúlyozására a mitokondriális biogenezis indukcióján keresztül. Kimutattuk, hogy a PARP-2 a SIRT1 promoterének negatív regulátora, így a PARP-2 depléciója a SIRT1 expressziójának növekedését indukálja. Kísérleteinkben a PARP-2 szerepét vizsgáltuk Doxorubicin (DOX) által kiváltott vaszkuláris károsodásban. A DOX szabadgyökök termelését indukálja, ami DNS károsodáshoz, PARP aktivációhoz és következményesen mitokondriális diszfunkcióhoz és sejtkárosodáshoz vezetnek. PARP-2<sup>-/-</sup> egerekből származó aorták simaizma védett a DOX-indukált károsodással szemben. Mivel a PARP-2 PARP-aktivitással rendelkezik, feltételeztük, hogy a védett fenotípus talán hasonló folyamatok eredménye, mint volt az a PARP-1<sup>-/-</sup> egerek esetében. Mindazonáltal nem tudunk nagyobb mértékű változást kimutatni sem a PARP aktivitásban sem a NAD<sup>+</sup> deplécióban a PARP-2 depléciójának hatására, ami eltérő védő mechanizmust valószínűsít. Megvizsgáltuk, vajon a PARP-2 depléciójának hatására bekövetkező SIRT1 indukció-e az oka a védett fenotípusnak. Valóban, az aortákban valamint PARP-2-csendesített simaizomsejt kultúrában a mitokondriális DNS mennyiségének, illetve a mitokondriális biogenezis génjeinek indukcióját és az oxigen fogyasztás megemelkedését tapasztaltuk. Ezek a hatások egybeestek a SIRT1 promoter indukciójával. Összefoglalva, a SIRT1 aktivációja fokozza a mitokondriális biogenezist, stabilizálja a mitokondriális aktivitást, és ezáltal védelmet nyújt a DOX által okozott mitokondriális károsodással szemben. Munkánkat támogatta: Bolyai ösztöndíj (BP, TA); NIH FR-26/2009, Baross program (Seahorse és Életment); OTKA PD83473, K68077, CNK80709, IN80481; Mecenatura Mec-8/2011, ETT 430/2006, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0019 projektek.

#### E4-03

##### **Az ABCC6 transzporter betegségét okozó mutánsainak *in vivo* korrekciója kémiai chaperonok segítségével: első lépések az oki allél-specifikus terápia felé**

<sup>1</sup>Le Saux O., <sup>2</sup>Fülöp K., <sup>1</sup>Yamaguchi Y., <sup>2</sup>Szabó Z.,  
<sup>1</sup>Brampton C.N., <sup>2</sup>Pomozi V., <sup>2</sup>Iliás A., <sup>2</sup>Arányi T.  
<sup>2</sup>VÁRADY András

<sup>1</sup>University of Hawaii, USA; <sup>2</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Budapest

Az ABCC6 funkcióvesztéses mutációi krónikus vagy akut disztrófiás mineralizációt okoznak, amely többféle kórképhez vezet: embernél a pseudoxantoma elasticum (PXE) öröklődő betegséghez,  $\beta$ -thalassemiaiban PXE-szerű meszesedési tünetekhez, egér törzsekben pedig a DCC (dystrophic cardiac calcification) fenotípushoz. Az egyik ABCC6 allél hiánya fokozott rizikót jelent a koszorúér megbetegedésben (CAD). Az ABCC6 transzmembrán transzporter, amely a hepatociták plazmamembránjában található. Olyan kísérleti rendszert dolgoztunk ki a humán ABCC6 fehérje betegségét okozó mutációi által okozott szerkezeti és funkcionális változások vizsgálatára, amely alkalmas a hibás intracelluláris lokalizációt mutató, de enzimatikusan aktív mutánsok azonosítására. Ezek a mutánsok a célpontjai a „kémiai chaperonok” által biztosított „folding” korrekciónak. Az R1138Q, V1298F, R1314W, G1321S és R1339C mutánsokat Sf9 sejtekben és *in vivo* egér májban (farokvéna-injektálás segítségével) expresszáltuk, és meghatároztuk a biokémiai és sejten belüli lokalizációs tulajdonságaikat. A hibás lokalizációjú mutánsok közül az R1138Q és az R1314W esetében tapasztaltunk jelentős transzport aktivitást. Mivel mindkét mutáns az ER-hoz kötődött, MDCKII sejtvonalon és *in vivo* egér májban teszteltük, hogy vajon a 4-phenylbutyrate (4-PBA) - egy, az FDA által elfogadott molekula, amely kémiai chaperonként is működik - alkalmas-e a hibás lokalizációt mutató mutánsokat „kiszegíteni” (rescue) a plazmamembránba. A 4-PBA kezelés hatására az R1314W mutáns jelentős része a plazmamembránba irányított mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között, igazolva, hogy lehetséges bizonyos ABCC6 mutánsok sejten belüli érésének elősegítése *in vivo*. Ez az eredményünk, reményeink szerint, terápiás célú kutatásokat indukál. Módszerünk külön értéke, hogy a mutáns fehérjék sejten belüli érését *in vivo*, a humán fiziológiához közel álló körülmények között modellezi, és lehetőséget ad további farmakológiai beavatkozások tesztelésére.

#### E4-04

##### **Role of regulation of MKP-1 expression by PARP-1 in oxidative stress induced cell death**

RÁCZ Boglárka, Hocsák E., Solti I., Kálmán N., Jakus P., Debreceni B., Ifj. Gallyas F., Sümegei B.  
PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Previously, it was suggested that release of nuclearly-formed ADP-ribose polymers (PAR) or

ADP-ribosylated proteins could be responsible for the cytosolic and mitochondrial effects of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 activation in oxidative stress. In the present report, we provided a novel alternative mechanism. We found that reactive oxygen species (ROS)-activated PARP-1 regulated the activation of JNK and p38 MAP kinases since inhibition of PARP-1 by pharmacons, small interfering RNA silencing of PARP-1 expression or the transdominant expression of enzymatically inactive PARP-1 resulted in the inactivation of these mitogen-activated protein kinases (MAPKs). This regulation was achieved by increased expression and enlarged cytoplasmic localization of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) upon PARP-1 inhibition in oxidative stress since changes in MKP-1 expression were reflected in the phosphorylation states of JNK and p38. Furthermore, we found that in MKP-1-silenced cells, PARP inhibition was unable to exert its protective effect indicating the pivotal roles of JNK and p38 in mediating the oxidative-stress-induced cell death as well as that of increased MKP-1 expression in mediating protective effect of PARP inhibition. We suggested that regulation of a protein which can directly influence cytoplasmic signaling cascades at the expression level represents a novel mechanism for the cytoplasmic action of PARP-1 inhibition.

#### E4-05

##### **A reduction in the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex decreases matrix substrate-level phosphorylation: a handle for neurodegeneration?**

<sup>1</sup>Kiss G., <sup>1</sup>Konrád C., <sup>2</sup>Starkov A.A., <sup>2</sup>Kawamata H.,  
<sup>2</sup>Manfredi G., <sup>2</sup>Zhang S.F., <sup>2</sup>Gibson G.E., <sup>2</sup>Beal F.,  
<sup>1</sup>Adam-Vizi V., <sup>1</sup>CHINOPOULOS Christos  
<sup>1</sup>SE, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup>Weill  
Medical College, Cornell University, New York, USA

Provision of succinyl-CoA by the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDHC) is essential for generation of matrix ATP (or GTP) by substrate-level phosphorylation catalyzed by succinyl-CoA ligase. A decline in KGDHC activity has been associated with a number of neurodegenerative diseases. The focus of this association has been biased towards the diminished provision of reducing equivalents, and the extent of reactive oxygen species formation. Here we show that transgenic mice with a deficiency in the dihydrolipoyl succinyltransferase (DLST) or dihydrolipoyl dehydrogenase (DLD) subunit of KGDHC exhibiting a 25-40% decrease in activity, prompted respiration-impaired i) isolated, ii) in situ synaptic and iii) in situ neuronal somal mitochondria towards extramitochondrial ATP consumption. This was attributed to a shift in the reversal potential of adenine nucleotide translocase towards more negative values due to diminished matrix substrate-level phosphorylation, thus causing the translocase to reverse prematurely in respiration-impaired mitochondria of DLST+/- and DLD+/- mice. These

results were further corroborated by the finding that mitochondria from WT mice respiring on substrates that supported substrate-level phosphorylation, exhibited higher ADP-ATP exchange rates compared to those obtained from DLST+/- and DLD+/- mice. We propose that KGDHC-associated pathologies are subserved by the inability of respiration-impaired mitochondria to rely on „in-house” mitochondrial ATP reserves.

#### E4-06

##### **Az unfolded protein response (UPR) és a vas-anyagcsere kapcsolata**

<sup>1</sup>SIPOS Katalin, <sup>1</sup>Pandur E., <sup>1</sup>Nagy J., <sup>1</sup>Poór V.S.,

<sup>2</sup>Nagy T., <sup>2</sup>Miseta A.

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Igazságügyi Orvostani Intézet, Pécs;

<sup>2</sup>PTE ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs

Az unfolded protein response (UPR) a sejt komplex védekező mechanizmusa a fehérjeszintézis vagy a szekréció zavaraira. Élesztőben fő komponense egy érzékelő fehérjén (Ire1p) keresztül a chaperonok szintézisének fokozása. Emlős sejtekben is megmaradt ez az útvonal, de ehhez még más komponensek is csatlakoztak. Munkánk során azt a lehetőséget vizsgáltuk, hogy az RNáz L inhibitor fehérje, egy esszenciális citoszolikus vas-kén fehérje milyen módon tud részt venni az UPR folyamatában. A kérdés azért vetődött fel, mert az Ire1p ER stressz szenzor fehérje rendelkezik egy RNáz L homológ domainnel. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy mind élesztőben, mind humán sejtekben az Rli befolyásolja az UPR aktivitását. Irodalomból ismert adat, hogy az UPR aktivitása és a hepcidin, az eddig ismert egyetlen vasanyagcserét szabályozó hormon, expressziója között kapcsolat áll fenn. Megvizsgáltuk, hogy ez a kapcsolat igaz-e az Rli fehérje vonatkozásában is, azaz az Rli mennyiségi változása hatással van-e a hepcidin expressziójára. Érdekes, hogy az UPR különböző hatásmechanizmusú ágensekkel történő aktiválása a hepcidin szintet nem azonos módon befolyásolta. Előadásomban szeretném felvázolni az UPR aktivitása és a hepcidin expressziója közötti lehetséges kapcsolatokat, érintve a vasanyagcsere szabályozásának és egyes, az UPR változásán alapuló betegségeknek összefüggését.

#### E4-07

##### **A Candida albicans protein foszfatáz Z szerepet játszik a patogén gomba sóháztartásában és megbetegítő képességében**

DOMBRÁDI Viktor

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Kimutattuk, hogy az opportunistá patogén *Candida albicans* genomja egy protein foszfatáz Z gént tartalmaz, amit CaPPZ1-nek nevezünk el. A gén nagyfokú polimorfizmust mutat, különösen 3'-nem kódoló régiója variábilis. A hipervariábilis régió analízise lehetőséget nyújt a diploid gomba haplotípusának azonosítására, és felhasználható a gombafertőzés diagnosztikájában. A génről átíródó fehérje szerkezete hasonlít a *Saccharomyces cerevisiae* Ppz1 és a *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 enzimekhez. Az *E. coli* baktériumban expresszált CaPpz1 defoszforilálja a p-nitrofenilfoszfátot, és a foszfatáz reakció gátolható rekombináns Hal3 fehérjével, az *S. cerevisiae* Ppz1 jól ismert inhibitorával. Tehát a *C. albicans* és a sarjadzó élesztő PPZ foszfatázai azonos biokémiai aktivitással rendelkeznek. A foszfatáz katalitikus doménjében *in vitro* mutagenézissel azonosítottunk 3 olyan fontos aminosavat, amelyek szerepet játszanak az enzim aktivitásában illetve stabilitásában. Ha a CaPPZ gént *S. cerevisiae* ppz1 és *S. pombe* pzh1 deléciós mutáns törzsekben expresszáltattuk a heterológ fehérje funkcionálisan helyettesítette a hiányzó foszfatázokat. A CaPPZ1 ugyancsak komplementálta az *S. cerevisiae* slt2 mutánst, ami arra utal, hogy a gén terméke kölcsönhatásba lép a MAP-kináz jelátviteli útvonallal. Eredményeink szerint a CaPPZ1 a sarjadzó és hasadó élesztőkben található ortológjaihoz hasonló funkciókat láthat el. Ezt a következtetésünket alátámasztotta a *C. albicans* CaPPZ1 génjének inaktiválása és a deléciós mutáns vizsgálata. Megállapítottuk, hogy a CaPpz1 részt vesz a kation homeosztázis szabályozásában, a membránpotenciál kialakításában, az ozmotikus stabilitásban és a sejtfal integritásának fenntartásában. Továbbá azt találtuk, hogy a CaPpz1 fontos a fonális gomba hifa növekedésének és fertőzőképességének meghatározásában. Ezzel a foszfatáz olyan új funkcióját sikerült kimutatnunk, aminek orvosi jelentősége is lehet. Munkánkat a OTKA K 68765 és a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 támogatta.

## E5 - Genomika és génműködés szabályozás

### E5-01

#### Genomika a pszichiátriában és alkalmazása a farmakológiában

BAGDY György

SE, Gyógyszerhatástani Intézet, Budapest

Az epigenetika térnyerése ma már jellemző az orvostudományra. Ugyanakkor a központi idegrendszeri zavarok kapcsán továbbra is a bázissorrenddel összefüggő betegséghajlam és egyéb funkcionális változások vannak az érdeklődés középpontjában. A hangulatzavarok terén különösen kevés a humán vizsgálatokban reprodukálhatóan jelentős hatással bíró kandidáns gének illetve genetikai variánsok száma. A szerotonin transzporter gén szabályozó régiójában található funkcionális polimorfizmus (5-HTTLPR) és a CB1 receptor gén (CNR1) variánsainak összefüggése a neuroticizmusnak nevezett személyiségvonással, valamint hatása a stressz következtében kialakuló depresszióra ilyenek tekinthető. Mivel bizonyos gyógyszerek szorongás-fokozó, és depressziót kiváltó hatása jelentős, a farmakogenomikai alkalmazás lehetősége is nyilvánvaló. A CB1 receptor (CB1R) antagonistákat nemrég még az egyik legígéretesebb gyógyszer-csoportként tartottuk számon. A család első tagja a rimonabant, amely az elhízás és az azzal kapcsolatos metabolikus és kardiovaszkuláris zavarok, mint például az inzulinrezisztencia, a diabetes mellitus, és a lipidanyagcsere zavarainak kezelésében egyaránt hatékonynak bizonyult. A széleskörű klinikai alkalmazás során azonban a betegek egy részében nem kívánt hatásként szorongás és depresszió jelentkezett, sőt az öngyilkossági hajlam fokozódása is felmerült. Ennek hatására a gyártó visszavonta a gyógyszer forgalmazását és a többi CB1R antagonistá további fejlesztését is felfüggesztették, ami az egész világ gyógyszeriparára kihatott. Mivel az egyéb hatásmechanizmussal működő étvágycsökkentők amúgy sem népes táborra az utóbbi években a súlyos mellékhatások miatt amúgy is megfogyatkozott (pl. dexfenfluramin, sibutramin), jelentős úr keletkezett ezen a piacon, és ez a CB1R antagonistákkal kapcsolatban kialakult elutasító álláspont felülvizsgálatához vezetett. A személyre szabott orvoslás alkalmazásával, többek között a fent nevezett két gén polimorfizmusainak meghatározásával lehetőség nyílik arra, hogy a CB1R antagonistá vegyületeket biztonságosan, pszichiátriai mellékhatásoktól mentesen alkalmazzuk (Lazary J, Juhasz G, Hunyady L and Bagdy G: Personalized medicine can pave the way for the safe use of CB1 receptor antagonists. Trends Pharmacol. Sci., 2011, 32: 270-80). Támogatás: EU, LSHM-CT-2004-503474, TAMOP-4.2.1.B-09/1/KMR-2010-0001, ETT318/041/2009. 1.

### E5-02

#### Kritikus pontok a jelátviteli hálózatban

<sup>1</sup>MÓDOS Dezső, <sup>2</sup>Lenti K., <sup>1</sup>Fazekas D., <sup>3</sup>Csermely P., <sup>1</sup>Korcsmáros T.

<sup>1</sup>ELTE, Genetika Tanszék, Budapest; <sup>2</sup>SE, Morfológiai és Fiziológiai Tanszék, Budapest; <sup>3</sup>SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

A sejtre ható külső ingereket a jelátviteli rendszer közvetíti. Ennek legfontosabb útvonalait tartalmazza a kutatócsoportunk által kifejlesztett Signalink adatbázis ([www.signalink.org](http://www.signalink.org)). Ezt felhasználva megállapítottuk, hogy az emberi jelátviteli utak lefutási lehetőségeinek számában nagyon jelentősök az útvonalak közötti, cross-talk kapcsolatok. 2006-ban a jelátvitel szabályozása szempontjából kritikus pontokat azonosítottunk az inzulin útvonalon belül. Ezek olyan erősen szabályozott fehérjékből álló csoportok, melyek egymás izomformái és legalább egy tagjuk cross-talkban vesz részt. Összességében az egyes izomformák aránya dönti el, hogy a jel az adott útvonalon terjed vagy cross-talkon keresztül más útvonalra tér át. Felmerült, hogy a Signalinkben lévő további 7 útvonalon is azonosíthatóak kritikus pontok és az őket alkotó kritikus ponti fehérjék. Az elemzéshez bioinformatikai adatbázisokat használtunk fel: (1) OrthoDb, Inparanoid izoforma azonosítás; (2) ENSMEBL fehérje tulajdonságok; (3) Pictar, TargetScan, OREGanno génszabályozás; (4) OMIM, GAD, COSMIC, DrugBank orvosi információk. Az elemzésünk során 66 kritikus pontot és 208 új kritikus ponti fehérjét azonosítottunk a következő kritériumok alapján: cross-talkban vesznek részt, eltérő funkciójú izoformákkal rendelkeznek, és erősen szabályozottak. A kritikus pontok az EGF/MAPK útvonalon belül szignifikánsan gyakoribbak, és az útvonalak elején található receptor és mediátor fehérjék. Evolúciós és útvonalakat összekötő tulajdonságaik alapján azonosítottunk két kritikus ponti fehérjetípust: (1) a sok útvonallal kapcsolatban álló konzervatív Multilinker-típust; (2) a két útvonalat összekötő evolúciósan adaptív Linker-típust. Orvosi vonatkozásokkal kapcsolatban elemzésünk kimutatta, hogy a kritikus ponti fehérjék jó gyógyszer-célpontok lehetnek, illetve daganatokban gyakrabban szenvednek mutációt. Következésképpen a kritikus ponti fehérjék specifikus támadása lehetőséget adhat a jelátvitel számunkra megfelelő módosítására.

### E5-03

#### Autoreguláció: a HAMP gén szabályozásának új mechanizmusa WRL68 sejtvonalon

<sup>1</sup>PANDUR Edina, <sup>1</sup>Nagy J., <sup>1</sup>Poór V.S., <sup>1</sup>Rapp J., <sup>1</sup>Mayer M., <sup>2</sup>Miseta A., <sup>1</sup>Sipos K., <sup>3</sup>Fekete Zs.

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Igazságügyi Orvostani Intézet, Pécs;

<sup>2</sup>PTE ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs;

<sup>3</sup>PTE ÁOK, Orvosi Biológia Intézet, Pécs

A HAMP gén által kódolt hepcidin a szervezet vas-

anyagcseréjét szabályozó, 25 aminosavból álló peptid hormon. A hepcidin hatását receptorán, a ferroportin nevű vasexporteren keresztül fejt ki, hozzákötődve a ferroportin internalizálódik és degradálódik a sejtben. Ennek eredményeként a hepcidin gátolja a vas felszabadulását makrofágokból és enterocitákból, valamint csökkenti a szérumban vas szintjét. A hepcidin expresszióját egymással ellentétes folyamatok befolyásolják, ezek együttes hatása alakítja ki a hepcidin szintet. A szérumban vasszint növekedése következtében a hepcidin expressziója fokozódik. A BMP fehérjék a SMAD jelátviteli útvonalon, míg gyulladási folyamatokban az IL-6 a JAK/STAT3 jelátviteli úton át hat a hepcidin átírására. A hepcidin negatív regulátorai kevésbé ismertek. A matriptáz-2 szerin proteáz a mHJV-t degradálja, melynek következménye a hepcidin repressziója. A megnövekedett eritropoezis is hozzájárulhat a hepcidin szintjének csökkenéséhez. Ennek szabályozásában feltételezhetően a GDF15 negatív regulátora a hepcidin expresszióinak. Immuncitokémiai módszer segítségével korábban kimutattuk, hogy a prohepcidin a hepatociták sejtmagjában is megtalálható, a szemcsézett citoplazmatikus festődés mellett. Kísérleteink célja az volt, hogy felderítsük a prohepcidin magban való lokalizációjának szerepét. Igazoltuk az általunk kidolgozott PCR alapú kötési módszerrel, illetve kromatin immunprecipitációval, hogy a prohepcidin kötődik a saját promóteréhez. Luciferáz esszével mutattuk ki, hogy a WRL68 sejtben overexpresszált prohepcidin csökkenti a HAMP promóter aktivitását, ugyanakkor a prohepcidin elnyomása antiszensz technikával növeli az aktivitást. Az alfa 1-antitripsinnel kötődő prohepcidin azonban nem képes a HAMP promóterhez kötődni, ezáltal szabályozó hatást kifejteni. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a prohepcidin negatív feedback mechanizmussal gátolja a HAMP gén aktivitását, azáltal, hogy képes saját promóteréhez kötődni.

#### E5-04

##### **Redukált genomú *Escherichia coli* törzs változékonyságának csökkentése szintetikus biológiai alkalmazásokhoz**

CSÖRGŐ Bálint, Fehér T., Tímár E., Pósfai Gy.  
MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

Egy populáció evolúcióját és hosszú távú túlélését alapvetően a genetikai variációkat generáló molekuláris mechanizmusok határozzák meg. Munkánk során az *Escherichia coli* K12 MG1655 törzsből konstruált, csökkentett genomméretű sejt (MDS42) evolúciós képességeit a természetes határok alá csökkentettük. Az alacsony mutációs rátájú variánsok létrehozásának motivációja a törzs szintetikus biológiai (SB) felhasználhatóságának javítása. Az SB új biológiai rendszerek precíz konstrukcióját célozza. Ennek akadálya lehet, hogy az újonnan létrejött, evolúciós tulajdonságok a mutáció/szelekció révén nem kívánt tulajdonságok gyors megjelenéséhez (pl. a termeltetett rekombináns fehérje mennyiségi/minőségi leromlásához) vezethetnek.

Célszerű egy csökkentett mutációs rátájú törzset létrehozni, mely fokozott genetikai stabilitást biztosító gazdaként szolgálhat SB alkalmazásokban. Alapvető stratégiánk a sejt változékonyságát generáló folyamatok kiiktatása: a vad törzsből deletáltuk az összes mobilis genetikai elemet (IS, profág, rhs), majd a nagy hibaszázalékkal működő, SOS-indukált DNS-polimeráz enzimek génjeit (polII, polIV, polV). A módosítások végrehajtásával egy szignifikánsan (3x) stabilabb genomú, ugyanakkor növekedésében nem korlátozott törzset (MDS42pdu) kaptunk. A mutációs ráta relatív csökkenése különösen stresszhelyzetben jelentős (30x). A stabilizált genomú törzs előnyeit és potenciális felhasználási lehetőségeit egy fehérje túltermeltetéses kísérlettel demonstráltuk. Egy toxikus fehérje (SinI metiltranszferáz) génjét hordozó plazmiddal MDS42 és MDS42pdu törzsekben a fehérjét expresszáltuk. A fehérje túltermeltetés során vett mintákból a plazmidokat visszaizoláltuk, majd egy biológiai teszt segítségével meghatároztuk a mutációt szenvedett (inaktív metilált termelő) plazmidok arányát. 24 órás fehérjetermelés után az MDS42 törzsből a plazmidok 20%-a hordozott mutációt a toxikus génben, míg stabilizált genomú MDS42pdu törzsből közel négyszer kisebb volt ez az arány.

#### E5-05

##### **Esélyegyenlőség a hálózatanalízisben; azaz hogyan találjunk kiscsúcsot, de fontos csúcsokat metabolikus hálózatokban?**

GROLMUSZ Vince

ELTE, Számítógéptudományi Tanszék, Budapest

A Boehringer cég metabolikus hálózatot ábrázoló posztere valószínűleg mindenkinek régi ismerőse laboratóriumok falairól. A metabolikus hálózatok egyik ábrázolási módja a következő: feleltessük meg a biokémiai reakciókat az őket katalizáló enzimeknek, és kössünk össze két enzimet, A-t és B-t egy irányított éllel - (A,B)-vel - pontosan akkor, ha az A által katalizált reakcióból kilép egy molekula, amely a B által katalizált reakció egyik kiindulási anyaga. Ezzel az ábrázolási móddal nagy, összetett metabolikus hálózatokból nagy irányított gráfokat kapunk: egy példa a *Mycobacterium tuberculosis* metabolikus hálózatára szerepel itt is: <http://uratim.com/PageRank/FigS1.png>. A metabolikus hálózatok analízisének egyik célja új, lehetséges gyógyszer-célpontok azonosítása. Az ilyen irányított gráfokkal reprezentált metabolikus hálózatokban fontos csúcsokat legtöbbször a nagy fokszám alapján azonosítanak, ezeket a „hub”, azaz csomóponti fehérjéket gyakran jó gyógyszer-célpontnak tartják. Ennek a módszernek finomítására dolgoztuk ki Világháló analízisében jól ismert, PageRang alapú módszerünket (Bioinformatics Vol. 27, No. 3. pp. 405-407, 2011). A csomóponti enzimek gátlásával azonban gyakran túl komolyan beavatkozunk egyes szervezetek működésébe, és ezzel túl sok mellékhatást válthatunk ki. Alternatíva nem a hub-fehérjék, hanem bizonyos kiscsúcs fehérjék gátlása, befolyásolása. A jelen munkában egy olyan mód-



szert mutatunk be, amellyel fontos, kiscukú fehérjéket tudunk azonosítani, egyedül az irányított gráf matematikai tulajdonságainak segítségével. Ezzel „esélyegyenlőséget” adhatunk a nem-hub fehérjéknek a gyógyszer-célpontok keresésében. A módszer validálásához több patogén mikroorganizmus metabolikus hálózatában kerestünk fontos, kiscukú csúcspontokat, és ellenőriztük, hogy megtalálunk-e már ismert, fontos gyógyszer-célpontokat is (hiszen nem lehetett célunk új, eddig ismeretlen célpontok azonosítása, ezek ellen új gátlószerek megtalálása, és ezek kísérleti igazolása).

#### E5-06

##### **Gyulladást szabályozó citokinek hatása a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) gamma aktivitására**

<sup>1</sup>NAGY Zsuzsanna, <sup>1</sup>Czimmerer Zs., <sup>2</sup>Szántó A., <sup>1</sup>Dániel B., <sup>3</sup>Schwabe J., <sup>1</sup>Nagy L.

<sup>1</sup>DE OEC, Biokémiai és Molekuláris

Biológiai Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>Harvard Medical School, Department of Genetics, USA; <sup>3</sup>University of Leicester, Department of Biochemistry, UK

A PPAR $\gamma$  magreceptor atherosclerosisban és diabetesben is fontos szerepet tölt be. A PPAR $\gamma$  az anyagcsere- és a gyulladós folyamatok közötti kapocsként is szolgál, ugyanis a makrofágok zsírfelvételét is szabályozza. Ezért a PPAR $\gamma$  szövetspecifitását befolyásoló molekuláris mechanizmusok felderítése döntő fontosságú lehet a PPAR $\gamma$ -t célzó terápiák mellékhatásainak elkerüléséhez. A makrofágok a mikro környezetükben jelenlévő citokinösszetételétől függően kiváltói és gátlói

is lehetnek a szervezetben zajló gyulladós folyamatoknak. Laboratóriumunk eredményei szerint makrofágokban bizonyos PPAR $\gamma$  célgének, például az FABP4 szintjét a gyulladós folyamatokat gátló IL-4 felerősíti, míg a gyulladós folyamatokat kiváltó IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  kezelés csökkenti. Központi hipotézisünk, hogy a PPAR $\gamma$  szövetspecifitását citokinek által szabályozott folyamatok határozzák meg. Ennek vizsgálatára célul tűztük ki a PPAR $\gamma$  hatását módosító eddig ismeretlen kofaktorok azonosítását biokémiai és proteomikai módszerek kombinálásával. Ehhez kontroll, valamint PPAR $\gamma$  liganddal és IL-4-gyel kezelt Thp-1 sejtek magjából származó extraktumot inkubáltunk biotinnal kapcsolt MacPPRE (az FABP4 promotereiből származó) oligonukleotiddal, és az így nyert komplexet tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá. Kontrollként a PPAR $\gamma$  és a STAT6 kötőhelyét módosított formában tartalmazó oligonukleotidot használtunk. Számos kofaktor jelöltet azonosítottunk, ezek közül az NR2C2 nevű orphan magreceptor *in vitro* kötődését igazoltuk. További terveink között szerepel a kötődés *in vivo* jellegének igazolása ChIP-pel, valamint a komplex részét képező fehérjék PPAR $\gamma$  aktivitására kifejtett hatásának tesztelése siRNA technikával. Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a PPAR $\gamma$  maximális aktivitásának eléréséhez egyéb transzkripció faktorokkal kell kölcsönhatásba lépnie. Kutatásainkkal közelebb szeretnénk kerülni annak megértéséhez, hogyan érvényesíti a PPAR $\gamma$  sejttípusfüggő hatását egyes immunsejt csoportokban.

## E6 - Sejtorganellum biokémia

#### E6-01

##### **A citrát kör szerepe a reaktív oxigén-származékok homeosztázisában. Az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz E3 alegység mutációinak következményei a katalitikus és szabályozóképző aktivitásra**

TRETTNER László, Töröcsik B., Ádám V.  
SE, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest

A citrát kör az anyagcsere utak találkozási pontja. Jelentőségét nemcsak bioenergetikai és metabolikus szerepe adja meg, hanem a reaktív oxigén-származékok (ROS) homeosztázisában is fontos szerepet játszik. Az idegvégkészülékek mitokondriumaiiban a citrát-kör sebességmeghatározó lépése az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz ( $\alpha$ -KGDH) enzim által katalizált reakció. Enyhe oxidatív stressz körülményei között az akonitáz inaktiválódása miatt a citrát-kör legfontosabb „betáplálója” a glutamát lesz és a citrát-kör fluxusának intenzitását az  $\alpha$ -KGDH aktivitása szabályozza. Az  $\alpha$ -KGDH maga is érzékeny a ROS hatásokra. Az  $\alpha$ -KGDH azonban önmaga is ROS-képző enzim. ROS képzése az E3 alegységen keresztül valósul meg. Az enzim forward módban működve kisebb, reverz módú működés esetén nagymértékű szuperoxid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

képzésre képes. Az E3 alegység mutációi, funkciókiesése súlyos, legfőképpen az idegrendszert érintő betegségben nyilvánulnak meg. Tizenkét, betegséggel összefüggésbe hozható E3 mutánszt klónoztunk, vizsgáltuk katalitikus és ROS képző tulajdonságaikat, valamint a fehérje- szerkezeti változásokat. A szerkezeti vizsgálatok nem mutattak ki jelentős konformációs, vagy dimerizációs változásokat, de funkció vizsgálatokkal találtunk normál katalitikus aktivitását szinte teljesen elvesztett fehérjét megtartott ROS képzéssel, illetve olyant is, melyben a lipamid dehidrogenáz aktivitás csak kismértékben csökkent, ám a ROS-képzés jelentősen fokozódott. Az excesszív ROS képzés önálló patogenetikai faktorként szerepelhet, így az antioxidáns terápiának is létjogosultsága lehet. Köszönetnyilvánítás: OTKA (NK 81983), TAMOP (4.2.2./B-09/1), MTA (MTA TKI 2006 TKI88).

#### E6-02

##### **Az LXR receptor szerepének vizsgálata makrofágok apoptotikus sejt fagocitáló képességére**

SARANG Zsolt, Joós G., Fésüs L., Szondy Zs.  
DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az apoptotikus sejtek hatékony fagocita sejtek általi eltávolításának fontos szerepe van az egyedfejlődésben és a szervezet immunháztartásában. Ismert, hogy a fagocitózis során az apoptotikus sejtek membránjainak lipid tartalma az LXR magreceptoron keresztül fokozza a makrofágok RAR-alfa retinsav receptor, szöveti transzglutamináz (TG2) és Mertk receptor expresszióját és ez által a sejtek fagocitotikus képességét, de a pontos hatásmechanizmus még nem ismert. Szintetikus glükokortikoid, dexametazon oltást követően a tímuszban a CD4+CD8+ sejtek apoptózissal elhalnak és az elpusztult sejteket makrofágok veszik fel. Ezen folyamat során a tímuszban megemelkedik a retinsav szintézisben részt vevő retinaldehid-dehidrogenáz 1 enzim (RALDH1) expressziója. Béta-galaktozidáz gén promóterben retinsav válaszadó elemet tartalmazó transzgénikus egér tímuszában jelentős béta-galaktozidáz génexpressziót tapasztaltunk dexametazon oltás után, amely endogén retinsav szintézisre utal. Izolált hasüregi makrofágokban apoptotikus sejt adását követően illetve szintetikus LXR receptor agonista kezelés után megnövekedett RALDH1 és 2 enzimek expressziója. Makrofágokat LXR agonistával vagy transz-retinsavval kezelve megnőtt a sejtek TG2, RALDH2 és a Mertk, CD14 és TIM4 apoptotikus sejt felvételben szerepet játszó receptorok expressziója és ezzel párhuzamosan az apoptotikus sejt fagocitáló képességük. Eredményeink arra utalnak, hogy az apoptotikus sejt felvétele az LXR receptor aktiválásán és ezáltal a Mertk direkt indukcióján keresztül egyrészt közvetlenül másrészt a RAR-alfa receptor expressziójának és a makrofágok retinsav szintézisének indukálásával a RAR és RXR receptorok aktiválásával feltételezhetően közvetve is emeli a makrofágok fagocitotikus képességét.

#### E6-03

##### **A transzglutamináz 2 fokozhatja úgy a T sejtek apoptózisát, hogy elősegíti a mitokondrium kalcium felvételét**

<sup>1</sup>Hsieh Y.F., <sup>2</sup>Garabuczi É., <sup>2</sup>Német I., <sup>1</sup>Tsay G.,  
<sup>2</sup>SZONDY Zsuzsanna

<sup>1</sup>Chung Shan Orvosi Egyetem, Immunológiai Intézet, Taiwan; <sup>2</sup>DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Intézetünk írta le először, hogy a transzglutamináz 2 (TG2) fehérje megjelenése az *in vivo* apoptózis program része. A TG2 transzglutamináz aktivitása révén fehérjéket tud keresztkötni illetve aminosavakkal poszttranszlációban módosítani. A TG2 indukálódik az apoptózisba lépő timocitákban és a HIV fertőzött apoptotikus T sejtjeiben is. Kísérleteinkben bemutatjuk, hogy elhaló timocitákban *in vitro* nem, de *in vivo* indukálódik a TG2. A TG2 *in vivo* indukációjához az apoptotikus szignálon kívül az elhaló sejteket fagocitáló makrofágok által termelt TGF- $\beta$  és a retinoidok együttesen járulnak hozzá. Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy a TG2 fehérje rendelkezik egy potenciális BH3 doménnel, ami jelentheti azt, hogy a TG2 fokozhatja, vagy kiválthatja sejtek

apoptózisát. Jurkat T sejteket vizsgálva egy indukálható expressziós rendszert alkalmazva kimutattuk, hogy a TG2 overexpressziója a mitokondriális úton aktiválódó apoptózist eredményez. A TG2 keresztköti aktivitással nem rendelkező mutánsa is hatásos, de a vad típusú enzim kifejezése gyorsabban öl, ami arra utal, hogy keresztköti hatása is hozzájárul az apoptózis indukációjához. A TG2 kolokalizálódik a mitokondriummal, és a vad típusú enzim megjelenése magasabb mitokondriális kalcium felvételt eredményez. A magas mitokondriális kalciumról ismert, hogy hozzájárulhat az apoptózist indító citokróm c felszabadulásához. Azonosítottunk néhány TG2 által keresztköti fehérjét és ezek közül a RapGDS1 guanin kicserélő fehérje tűnik a legizgalmasabb lehetséges target molekulának. Jelenleg vizsgáljuk e fehérje lehetséges szerepét a mitokondriális kalcium homeosztázis szabályozásában. Támogatta: OTKA K77587, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, Magyar-Tajvani bilaterális TÉT.

#### E6-04

##### **Mely szénhidrát-anyagcserében végbe menő változások vezethetnek granulocita apoptózishoz?**

KARDON Tamás, Pittner R., Száraz P., Krämer S.  
SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

Munkacsoportunk az endoplazmás retikulum biokémiájával foglalkozik. Ennek egy igen fontos eleme a glukóz-6-foszfát rendszer, amelyet az elmúlt években részletesebben vizsgáltunk. Kimutattuk, hogy granulocitákban a májhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkező glukóz-6-foszfát transzporter van jelen, a transzportot funkcionálisan jellemeztük. A transzport gátlásával granulocitákban apoptózist tudunk kiváltani, mely apoptózist kortizol hozzáadásával nem jött létre. Ezzel egy időben kimutattuk, hogy a granulocitákban jelen van a glukóz-6-foszfátot metabolizáló hexóz-6-foszfát dehidrogenáz. A reakcióban keletkezett redukált NADPH-t egy oxidoreduktáz, a 11- $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-1 oxidálja el, miközben kortizonból kortizol redukálódik. A glukóz-6-foszfát transzporter szerepét 1b típusú Von Gierke kórban megfigyelhető fokozott granulocita apoptózisban igazoltuk. Az utóbbi években kiderült, hogy súlyos veleszületett neutropénia bizonyos eseteiért az endoplazmás retikulum egy másik integráns fehérjeje, a glukóz-6-foszfátáz béta funkcionális defektusa a felelős. Ez az enzim nem glukoneogenetikus szervekben, szövetekben a glukóz-6-foszfát hidrolíziséért felelős. Mivel a glukóz-6-foszfát transzporter funkcionális defektusát is kíséri neutropénia, feltételeztük, hogy létezik egy közös mechanizmus, mely mind a két fehérje esetében hasonló módon indukál apoptózist granulocitákban. Elképzeléseink szerint a glukóz-6-foszfátáz-bétának esetleg más szénhidrát is lehet szubsztrátja, amelynek metabolizmusában bekövetkezett zavar állhat a kiváltott apoptózis hátterében. Jelen prezentációban ezek-

nek a hipotéziseknek az igazolására tett kísérleteinket mutatjuk be. A kutatás a Bolyai János Kutatói Ösztöndíj támogatásával a TÁMOP-4.2.1/B keretein belül készült.

#### E6-05

##### **Molekuláris kapcsolatok az autofág és apoptotikus útvonalak között**

VELLAI Tibor, Takács K.

ELTE TTK, Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék, Budapest

Az autofágia („sejtes önmérsztés”) az eukarióta sejtek szabályozott önlebontó (katabolikus) folyamata, amely során a citoplazma részletei lizoszómákba jutnak, ahol lizoszómális savas hidrolázok által degradálódnak. Az autofág degradáció végtermékei felhasználódhatnak a felépítő folyamatokban (makromolekula turnover), illetve energiát biztosíthatnak a sejt túléléséhez éhezés során. Az autofágia kitüntetett szerepet játszik továbbá a károsodott sejtalkotók (makromolekulák, sejtservecskék) eltávolításában, azaz a sejtes homeosztázis fenntartásában, valamint a sejt anyagainak átrendezésében. Az autofágia tehát elsődlegesen a sejt túlélését biztosító (citoprotektív) folyamat. Az autofág masinéria egyik központi, evolúciósan konzervált komponense az Atg6/Beclin1 fehérje, amely esszenciális a makroautofág struktúrák (autofagoszómák) membránjának szintéziséhez. Kimutattuk, hogy az Atg6/Beclin1 fizikailag kapcsolódik a Bcl-2-szerű CED-9 anti-apoptotikus fehérjéhez a fonalféreg *Caenorhabditis elegans*-ban. Ezzel összhangban az ATG6/bec-1(-) mutáns *C. elegans* embriókban nagyszámú apoptotikus sejttest figyelhető meg, valamint a bec-1 inaktiválása a felnőtt állatok csírvonalában is masszív apoptózist generál. A bec-1 szabályozó régiójában egy konzervált bZip-szerű ATF-2 transzkripció faktor kötőhelyet azonosítottunk, amely *in vitro* (biokémiai esszéekben) és *in vivo* (génexpressziós analízisben) is funkcionálisnak bizonyult. Mivel az ATF-2 az apoptotikus útvonal upstream szabályozó faktora, az autofágia és apoptózis közös transzkripcionális kontroll alatt áll. Ezen molekuláris eredményekkel összhangban kimutattuk, hogy az autofágia és apoptózis redundáns módon szabályozzák az állat korai egyedfejlődését. Az autofágia tehát bizonyos körülmények között a sejtek eltávolításának (pusztulásának) egyik hatékony útvonala.

#### E6-06

##### **Inflammaszóma aktiválás autofágiával elhaló sejtek fagocitózisa során**

G. Ayna, G. Petrovski, Benkő Sz., Hodrea J., Mádi A., FÉSÜS László

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az utóbbi évek kutatási eredményei egyértelművé tették, hogy az autofágia a sejtek elhalási folyamataink szabályozásában is szerepet játszik. Az apoptózis és az autofágia molekuláris elemei között kölcsönhatások vannak, a sejtek elhalását kísérheti autofágia és az meghatározó is lehet az apoptózis kiváltásában. Az apoptózissal elhaló sejteket a szomszédos sejtek és a makrofágok fagocitózissal távolítják el, amely általában nem jár gyulladásos reakcióval, annak létrejöttét az apoptotikus sejtek kifejezetten gátolják. Amikor azonban az apoptózist autofágia indítja el, az így elhaló sejtek bekebelezése során a citoplazmában lévő inflammaszóma rendszer aktiválódik, aktív kaszpáz 1 keletkezik, az hasítja a pro-interleukin 1 $\beta$  citokint és az aktív IL-1 $\beta$  kiszabadulva a makrofágokból gyulladásos folyamatokat vált ki a szomszédos sejtekben. Ezt a folyamatot eddig autofágiával elhaló malignus sejtek (humán emlő karcinóma és egér leukémia) humán monocita eredetű makrofágok, illetve egér csontvelői, rezidens és gyulladásos makrofágok által történő fagocitózisa során figyeltük meg, sem autofágia nélküli apoptotikus, sem nekrotikus vagy nekroptotikus sejtek nem váltják ki. Megállapítottuk, hogy az inflammaszóma aktiváláshoz szükség van az elhaló sejtek bekebelezésére, az függ a fagocitózis során felszabaduló ATP-től és annak a P2X7 purinerg receptorhoz való kötődésétől, gátolható a katepszin B lizoszómális enzim gátlásával. Az inflammaszómák a fertőző ágenszt vagy a különböző un. veszély jeleket a NOD-hoz hasonló fehérjecsalád valamelyik tagjának segítségével érzékelik; géncsendesítési és knock-out egerekkel végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a bekebelezett, autofágia hatására elhaló sejtek a NALP-3 fehérje részvételével aktiválják az inflammaszómát. Ennek a jelenségnek a jelentőségét tumorok sejtes környezetében kialakuló, a malignus sejtburjánzást elősegítő gyulladásos folyamatokban látjuk.

## E7 - Neurobiokémia

### E7-01

#### Biomarker protein networks in the prefrontal cortex and amygdala of suicide victims

<sup>1</sup>Kékesi K.A., <sup>1</sup>JUHÁSZ Gábor, <sup>1</sup>Simor A., <sup>1</sup>Gulyássy P., <sup>1</sup>Szegő É.M., <sup>2</sup>Hunyadi-Gulyás É., <sup>2</sup>Darula Zs., <sup>2,3</sup>Medzihradzky F.K., <sup>4</sup>Palkovits M., <sup>5</sup>Penke B., <sup>1</sup>Czurkó A.

<sup>1</sup>ELTE TTK, Biológiai Intézet Proteomikai Laboratórium, Budapest; <sup>2</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; <sup>3</sup>UCSF, Berkeley, USA; <sup>4</sup>SE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest; <sup>5</sup>SZTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged

Researchers in molecular psychiatry investigate the brain mechanisms related to increased suicide risk. Gene expression studies on postmortem brains and the recently discovered ribosomal RNA gene promoter hyper-methylation indicate that there are extensive changes in protein expression prior to a successful suicide attempt; however, proteomic studies are scarce. Thus, we performed a proteomic analysis of post mortem tissue samples from the amygdalae and prefrontal cortices of suicide victims to identify protein changes and biomarker candidates of suicide. We found 96 proteins that were differently expressed in the cortex and 25 proteins that were differently expressed in the amygdala. These proteins are related to biological functions and structures such as metabolism, the redox system, the cytoskeleton, synaptic function, and proteolysis. Fourteen of these proteins (CBR1, DPYSL2, EFHD2, FKBP4, GFAP, GLUL, HSPA8, NEFL, NEFM, PGAM1, PRDX6, SELENBP1, VIM, and YWHAZ) have already been suggested to be biomarkers of psychiatric disorders at a protein or genome level. In addition, we regard 11 proteins that changed in both the amygdala and the cortex to be biomarker candidates. Of these 11 proteins, GFAP, INA, NEFL, NEFM, TUBA1, and VIM are interacting cytoskeletal proteins that have a functional connection to glutamate, GABA, and serotonin receptors. Moreover, ACTB, CTSD, GFAP, VDAC1, VDAC2 and VIM displayed opposite changes that might be suitable for brain imaging studies. Our data show that the cytoskeleton, particularly the anchoring of receptors, could be a novel target of molecular suicide research.

### E7-02

#### Gliális GABA transzporterek: funkció és modell

KARDOS Julianna, Héja L., Nyitrai G., Kékesi O., Simon Á., Bencsura Á.  
MTA KKK, Budapest

Az agy legfőbb gátló neurotranszmittere a gamma-aminovajsav (GABA), amely részt vesz a neuronális aktivitás szabályozásában. A GABA koncentrációját a szinapszisban és az extraszinaptikus térben a neuronális valamint a gliális GABA transzporterek szabályozzák, amelyek a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> ion-függő SLC6

transzporter család tagjai. A neuronális GABA transzporter altípus (GAT-1) az antiepileptikum Tiagabine célfehérjéje, míg a gliális GABA transzporterek (GAT-2 és GAT-3) szerepe még tisztázásra vár. Bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy az asztroglialis Glu felvétel előidézi a GAT-2/3 transzporterek kifelé irányuló működését. Az így felszabaduló GABA közvetlenül képes befolyásolni a neuronok aktivitását. Eredményeink arra utalnak, hogy az asztrociták a serkentő szignált gátlóvá alakítják, amely in situ negatív visszacsatolással módosítja a neuronok serkenthetőségét. GAT-2 vs. GAT-3 szelektív inhibitorok hiányában elkészítettük a bakteriális ortológ Leu transzporter kristályos szerkezetén alapuló humán GAT-2 és GAT-3 modelleket és kerestük az egyes gliális altípusokat megkülönböztető szerkezeti elemeket. A humán GAT-2 és GAT-3 összehasonlító vizsgálata alapvető különbségeket tárt fel a feltételezett dimer kapcsolódási szekvenciákban. A teljes hosszúságú gliális GAT altípusok molekuláris dinamikai szimulációja az implicit membrán környezetben, valamint a bakteriális ortológ különböző konformációs állapotainak kristályszerkezetei segítik a vektoriális transzport mechanizmusának jobb megértését és az altípus-szelektív transzport inhibitorok tervezését a jövőben. A munka a NanoSen9 (TECH-09-A1-2009-0117), a Nanotransport (CRC HAS 2009) és az ERA-Chemistry OTKA 102166 projektek keretében készült.

### E7-03

#### A P2X7 receptor szerepe a neurokémiai jelátvitelben: egy új lehetőség központi idegrendszeri betegségek gyógyszeres terápiájára

SPERLÁGH Beáta  
MTA KOKI, Budapest

A P2X7 receptor az ATP érzékeny P2X ionotróp (P2X<sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>) és P2Y metabotróp (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) receptorokat magában foglaló purinerg jelátviteli rendszer része. A receptor két transzmembrán régióval és egy nagy extracelluláris hurokkal rendelkezik és egyszeri stimulációja kationáramot indukál, míg tartós aktivációja membrán permeabilitás növekedést okoz, mely végső soron sejthalálhoz vezethet. A P2X7 receptor számos sejttípuson expresszálódik, így pl. epithel sejteken, immunsejteken, de kifejeződik idegvégződéseken és a glián is. Korábbi kutatásainkban kimutattuk, hogy a P2X7 receptor a hippocampusban a serkentő idegvégződések membránján lokalizálódik és aktivációja fokozott glutamát, majd annak következményeként GABA felszabadulást idéz elő. Mivel génpolimorfizmus vizsgálatok kimutatták, hogy a P2X7 receptort kódoló gén mutációi szignifikáns asszociációt mutatnak pszichiátriai betegségek (depresszió, bipoláris betegség) előfordulásával, P2X7 receptor géniütött egerek és P2X7 receptor antagonisták segítségével megvizsgáltuk a P2X7 receptor aktiváció szerepét pszichiátriai be-

tegségek állatkísérletes modelljeiben. A P2X7 receptor génkiütött egerek szignifikánsan csökkent választ mutattak a depresszióra (kényszeres úszás teszt, farokfelfüggesztési teszt), valamint a mániára (amfetamin indukált hiperaktivitás) jellemző magatartási tesztekben, és a viselkedésben tapasztalt változásokat reprodukálni tudtuk szubakut szelektív P2X7 receptor antagonistá (Brilliant blue G) kezeléssel. Csontvelő kiméra egerekkel végzett kísérleteink igazolták, hogy az állatok viselkedésében tapasztalt változások nem a hemopoietikus eredetű, hanem feltehetően a centrális P2X7 receptorok hiányával függnek össze. Hatásmechanizmus kutatásainkban kimutattuk, hogy a P2X7 receptorok aktivációja mélyreható változásokat okoz a limbikus rendszer génextpressziójában, az agyi monoamin szintekben és gátolja a BDNF protein expressziót a hippocampusban. A fenti neurokémiai változások rávilágítanak a P2X7 receptor szerepére és felvetik lehetséges terápiás felhasználását depresszióban és bipoláris betegségben.

#### E7-04

##### **Gén és miRNS expresszió központi idegrendszeri demyelinisatiónban**

<sup>1</sup>Molnár V., <sup>1</sup>Éder K., <sup>2</sup>Vető S., <sup>2</sup>Vince A., <sup>2</sup>Ábrahám H., <sup>3</sup>Bánáti M., <sup>4</sup>Palkovits M., <sup>2</sup>Gallyas F., <sup>3</sup>ILLÉS Zsolt

<sup>1</sup>SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup>PTE, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; <sup>3</sup>PTE, Neurológiai Klinika, Klinikai és Kísérletes Neuroimmunológiai Tanszék, Pécs; <sup>4</sup>SE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

A központi idegrendszer egyik leggyakoribb demyelinisatós kórképe a sclerosis multiplex (SM). Az SM hátterében részben autoimmun gyulladás miatt demyelinisatio, illetve degeneratív folyamatok

következtében az oligodendrocyták és az axonok pusztulása áll. Jelen előadás röviden ismerteti az SM mechanizmusában és terápiájában nyert legújabb kísérletes adatainkat. Az SM autoimmun modelljében az egyik fő autoantigén a myelin bázikus protein (MBP). Humanizált, kettős transzgén egérmódel (MBP-specifikus T sejt receptor transzgén és HLA-DRB1\*1501 transzgén IA-deficiens háttéren) alkalmazásával copolymereket terveztünk. A copolymer immunizációkísérletes agyvelőgyulladás súlyosságát csökkentette, megváltoztatta a gyulladásos plakkok sejttöszetétét, a plakkok mRNS expresszióját és a mikroglia transzgén MHCII expresszióját. Egy másik kísérletsorozatban miRNS expressziót vizsgáltunk a corpus callosum demyelinisatión indukáló cuprizone (CPZ) modell alkalmazásával központi idegrendszeri de- és remyelinisatiónban. Kimutattuk, hogy a CPZ modellezheti az SM III. patológiai altípusában zajló oligodendrocyta pusztulást: a demyelinisatión az emberi betegségben és az állatmodellben egyaránt a PARP aktivációja, MAPK aktiváció, az AIF nukleáris transzlokációja és Akt foszforiláció jellemzi. Kísérleteinkben a corpus callosumot izoláltuk 4 hét CPZ kezelést követően, illetve olyan egerekben, melyektől a CPZ kezelést megvontuk, így remyelinisatión indukáltunk. Demyelinisatio, majd 2 napos és 2 hetes remyelinisatio miRNS profilját hasonlítottuk össze kontroll csoporttal (Agilent miRNS-microarray 627 egér + 39 virális miRNS meghatározása). A differenciált expressziót real-time PCR alkalmazásával validáltuk. A miRNS-ek expresszióját megvizsgáltuk 1, 2, 3, 5 és 6 hetes CPZ kezelés és remyelinisatión követően is, és összehasonlítottuk postnatalis 1, 3, 5, 7 10 és 14 napos egerek corpus callosumában zajló fiziológiás myelinisatiónal is. Eredményeink arra utalnak, hogy a de- és remyelinisatio során részben a fiziológiás myelinisatiónak megfelelő posztranszkripció szabályozó mechanizmusok aktíválódnak.

## Poszterek

### P1 - Genom instabilitás és karcinogenezis

#### P1-01

##### Lizil oxidáz enzimek gátlószereinek összehasonlító vizsgálata

<sup>1</sup>HAJDÚ István, <sup>2</sup>Kardos J., <sup>3</sup>Major B., <sup>1</sup>Tömöri T.,  
<sup>1</sup>Lőrincz Zs., <sup>1</sup>Cseh S.

<sup>1</sup>Targetex Kft., Dunakeszi; <sup>2</sup>ELTE TTK, Biokémiai Tanszék, Budapest; <sup>3</sup>MTA SZBK Enzimológiai Intézet, Budapest

A lizil oxidáz enzimes család tagjainak (LOX, LOXL1-4) feladata az extracelluláris mátrix egyes fehérjéi lizin tartalmú láncainak deaminálása, ami lehetővé teszi, hogy azok spontán keresztkötéseket alakítsanak ki. Ez a folyamat nélkülözhetetlen a rugalmas szövetek normális működéséhez, azonban a da-ganatok áttétképződéséhez is jelentős mértékben hozzájárul. Emiatt a LOX fehérjék célzott gátlása különböző tumork esetében is terápiás jelentőséggel bír. Munkánk során célunk a LOX enzimek gátlószereinek azonosítására alkalmas eljárások kifejlesztése. Ehhez szükségünk volt a kidolgozott LOX esszék validálására alkalmas kontroll gátlószerekre. A LOX enzimek kismolekulás gátlószerei az irodalomban csak elvétve fordulnak elő, a közölt gátlási adatok hiányosak és ellentmondásosak. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az eddig leírt LOX gátlószerek hatását a családba tartozó enzimeken. Irodalomkutatás alapján a gátlószereként leírt kismolekulákat *in vitro* gátlási tesztekben megvizsgáltuk az enzimes család rendelkezésre álló tagjain. Az eredményeink szerint a LOX család prototipikus gátlószere, a béta-aminopropionitril (BAPN) a LOX enzimet nem, viszont az összes LOX-szerű enzimet gátolja. A további ismert gátlószerek, a teratogén hatású ditiokarbamátszármazékok és 2-merkaptopiridin-N-oxid az enzimes család összes tagját gátolja. Ezen gátlószerek hatásmechanizmusa feltételezhetően irreverzibilis, ezért a reverzibilis inhibitorok fejlesztéséhez kevés információt nyújtanak, ahhoz más megközelítésre (pl. homológiamodellezés és dokkolás) lesz szükség. Ettől függetlenül a vizsgált gátlószerek használhatóak lesznek a nagyátersztőképeségű szűrésben kontroll anyagokként. Poszterünkön be fogjuk mutatni a LOX enzimek biológiai aktivitásának követésére alkalmazott esszét, illetve elemezni fogjuk a vizsgált gátlószerek hatékonyságát az irodalmi adatokkal összevetve. A fenti kutatás a Baross Gábor Program keretében futó, OMF-00254/2010 szerződés számú pályázat támogatásával valósult meg.

#### P1-02

##### A dUTPáz enzim létfontosságú a tuberkulózis kórokozójának nem-fertőző modelljében, Mycobacterium smegmatisban

<sup>1</sup>Pécsi I., <sup>1</sup>HIRMONDÓ Rita, <sup>2</sup>Brown A.C., <sup>1</sup>Lopata A.,  
<sup>2</sup>Parish T., <sup>1</sup>Vértessy G.B., <sup>1</sup>Tóth J.

<sup>1</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Genom metabolizmus és DNS javítás laboratórium, Budapest; <sup>2</sup>Queen Mary University of London, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, UK

A DNS integritása nélkülözhetetlen a helyes sejt-osztódási folyamatokhoz. A megfelelő genomi építőkövek helyes arányban való előfordulása a sejtben számos enzimműködés szabályozása alatt áll. Az alacsony dUTP:dTTP arányt a sejtben a dUTPáz enzim aktivitása biztosítja, mely során a dUTPáz a dUTP hidrolízisét katalizálja dUMP-vé és szervesen pirofoszfáttá, ezáltal a DNS-be hibaként beépíthető uracil mennyiségét csökkenti, valamint előállítja a *de novo* dTTP szintézis prekurzorát, a dUMP-t. Eukariótákban 3 fő útvonal létezik a dTTP előállítására, míg mikobaktériumokban csak egy útvonal található meg, mely a dUTPáz aktivitásán alapul. A mikobakteriális dUTPáz enzimek magas szintű homológiát mutatnak egymással, illetve található bennük egy öt aminosavból álló mikobaktérium-specifikus inszert. Munkánk során a dUTPáz kódoló gén (dut) létfontosságú fiziológiai szerepét kívántuk bizonyítani *in vivo* a nem patogén *Mycobacterium smegmatis* modellben, továbbá a mikobaktérium-specifikus szerkezeti motívum fiziológiai szerepét is vizsgáltuk. Génkiütési stratégiaként a homológ rekombináción alapuló „flexibilis kazetta” módszert alkalmaztuk. *Dut* génkiütött sejt vonalat csak abban az esetben sikerült azonosítanunk, ha egy funkcionális *dut* gént biztosítottunk a sejt számára. További kísérleteink során ezen letális *dut* mutáns fenotípust szerettük volna menekíteni a specifikus inszertet nem tartalmazó, loop-deléció *dut* mutánsal. A kettős rekombinációt követő szelekció során 88 kolónia tesztelése után nem tudtunk loop-deléciót tartalmazó menekített törzset izolálni a *dut*-kiütött háttérben. Eredményeink egyértelmű genetikai bizonyítékként szolgálnak arra nézve, hogy a *dut* génkiütés mikobaktériumban letális. Továbbá igazoltuk, hogy a mikobakteriális szerkezeti motívum nélkülözhetetlen a dUTPáz-funkció komplementálásához. Mivel ez a specifikus motívum a humán dUTPázból hiányzik, ezért ezt a molekula felszín felhasználva hatékony és specifikus antimikobakteriális gyógyszer tervezhető.

#### P1-03

##### ZIZI, egy új szereplő a DNS-hibák javításában

JUHÁSZ Szilvia, Balogh D., Burkovics P., Haracska L.

MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged

Az élő sejtek örökítőanyagát sokféle károsító hatás éri. A folyamatosan keletkező DNS-hibák eltávolítására számos DNS-hibajavító rendszer alakult ki, ilyen például a bázis kivágó hibajavítás, a nukleotid kivágó hibajavítás és a mismatch repair.

A sejtciklus szintézis fázisában viszont szükség van speciális DNS-hibajavító mechanizmusokra, mivel a replikációs villában található DNS károsodás a replikációs villa megakadását okozza. A befejezetlen replikáció pedig a sejt halálához vezethet. Ennek elkerülésére alakultak ki a posztreplikációs hibajavító útvonalak, amelyek képesek az elakadt replikációs villa menekítésére. A DNS-hibajavító mechanizmusok vizsgálata során olyan még nem jellemzett fehérjék után kutatunk, amelyek részt vehetnek az elakadt replikációs villa menekítésében. Megfigyeltük, hogy az ismert DNS-hibajavításban résztvevő fehérjék egy csoportja hasonló doménszerkezettel rendelkezik. Ezért a szekvenciadatbázisban olyan fehérjék után kutattunk, amely tartalmazza ezeket a konzervált doméneket. Ennek eredményeként azonosítottuk az általunk ZIZI-nek elnevezett fehérjét. Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk ezt az ismeretlen fehérjét, hogy szerepet játszhat-e a DNS-hibák javításában. *In vivo* kísérletekkel sikerült kimutatnunk, hogy az általunk vizsgált ZIZI fehérje valóban szerepet játszik a DNS-hiba javítás során a replikációs villa menekítésében.

#### P1-04

##### **Nem hagyományos helikáz a DNS-hibajavítás szolgálatában**

<sup>1</sup>KOCSIS Zsuzsa, <sup>2</sup>Pintér L., <sup>2</sup>Haracska L.,

<sup>1</sup>Kovács M.

<sup>1</sup>ELTE, Biokémia Tanszék, Budapest; <sup>2</sup>MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged

A DNS megkettőzését végző replikációs villák gyakran megtorpannak különböző DNS-károsító körülmények következtében. Amennyiben a hiba nem javítódik, az a villa összeomlásához és a sejt apoptózisához vezet. Az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) – emberi homológokkal is rendelkező – Rad5 fehérjének az egyik legfontosabb DNS-javító mechanizmusban, a replikációs villa kifordításában van szerepe: a kifordításhoz szükséges szálszétválasztást és szálpárosítást (anellálást) is végez. A Rad5 nem rendelkezik kanonikus helikáz-aktivitással: egyszerű kétszálú DNS-en nem képes szálszétválasztásra, azonban elágazó, villaszerű struktúrákat bont. A fehérje ATP-lebontó (hidrolizáló) képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy különbség van a duplaszálú és egyszálú DNS-ek által okozott aktivitás-növekedésben. A kétszálú DNS erősebben aktiválja a Rad5-öt, és kísérleteink szerint ehhez hasonló a másodlagos szerkezetet mutató szubsztrát hatása. Eredményeinkből adódik továbbá, hogy a Rad5 körülbelül 60 bázispár hosszúságban köti a DNS-t. Határozott hosszfüggés sem a dupla, sem az egyszálú DNS hatásában nem volt észlelhető, ami sebesség-meghatározó kezdő vagy befejező lépés hiányára utal. Jelenleg egyszeri átviteles kísérleteinkben vizsgáljuk, miként vezet az ATP-hidrolízis hajtotta duplaszálú DNS transzlokáció a bonyolult DNS szerkezetek feloldásához.

#### P1-05

##### **DNAPKcs függő transzkripcionális csendesítés a kettős szálú DNS törés során**

PANKOTAI Tibor, Bonhomme C., Soutoglou E.

*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Strasbourg, France*

A DNS kettős szálú törések hibás javítása során kialakulhatnak olyan kromoszóma transzlokációk, melyek a sejtciklus szabályozás elvesztéséhez, majd rákos folyamatok kialakulásához vezethetnek. A már kialakult kettős szálú DNS törések javítása alatt a sejteknek szüneteltetni kell az adott DNS templáton már folyamatban lévő transzkripciót vagy replikációt. Munkám célja volt megérteni mi történik a transzkripcióval a kettős szálú DNS törések hibajavítása alatt. A kettős szálú DNS törés RNS polimeráz II által átírt régióban történő aktiválása során azt találtuk, hogy a transzkripció leáll az adott génen a kettős szálú DNS törés kijavításának ideje alatt, majd a javítás befejezése után újraindul. Kimutattuk továbbá, hogy a transzkripció leállításához a DNAPKcs fehérje kináz aktivitása elengedhetetlen, míg további kinázok, mint az ATM és ATR nem szükségesek. ChIP kísérletekkel igazoltuk, hogy az RNS polimeráz II eltávolításra kerül a DNS javítás során, és mind a transzkripció elongációja, mind az iniciációja gátolt. Specifikus inhibitorok és siRNS csendesítés segítségével bizonyítottuk, hogy az RNS polimeráz II proteaszómális degradáció útján kerül eltávolításra. Kimutattuk továbbá, hogy a DNAPKcs fehérje hiányában – habár a kettős szálú DNS törés megtörtént – a transzkripció folyamatos, az RNS polimeráz II templátként használja a törött DNS szálat, és a DNS törésen is képes továbbjutni. Eredményeink a DNAPKcs fehérje új, esszenciális funkciójára mutatnak rá a kettős szálú DNS törés javítása alatt aktiválódó transzkripcionális csendesítés során.

#### P1-06

##### **Oligomerek magi transzportja: NLS-importin sztöichiometria dUTPázok esetében**

RÓNA Gergely, Pálinkás H., Borsos M., Vértessy B.  
*MTA Enzimológiai Intézet, Genom Metabolizmus és Javítás Csoport, Budapest*

Élő szervezetekben a genomi integritás megőrzését számos fiziológiai folyamat látja el. Ezek között a dUTPáz enzim a dUTP-t dUMP-vé és pirofoszfáttá hidrolizálja, biztosítva ezzel az alacsony sejtbeli dUTP/dTTP arányt és a genom uracilmentességét. Az enzim több szervezetben esszenciális, hiánya sejthalálhoz vezet, ami ígéretes terápiás kiindulópont lehet számos gyakori megbetegedés és kórkép kezelésében (pl. tuberkulózis, malária vagy a tumoros elváltozások). A 40 kDa-nál nagyobb fehérjék aktív magi transzportját az importin receptorcsalád tagjai látják el, a cargo fehérje NLS szignálján keresztül. A dUTPázok általában homotimer enzimek (mint amilyen a *Drosophila melanogaster* is), melyek így három azonos NLS szignállal rendelkeznek. A *Drosophila virilis* azon-

ban egy egyedi dUTPázal rendelkezik, amit három kovalens úton összekötött monomer épít fel, egy úgynevezett pszeudo-heterotrimeret alkotva, amely azonban csak egy NLS szignált tartalmaz. Meszterséges úton előállítható ebből egy homotrimer dUTPáz is, ami ennek okán már három NLS szignált fog hordozni. Célunk az importin-cargo fehérje sztöichiometriájának vizsgálata. Ehhez különböző biofizikai (ITC, natív-gélelektroforézis) és sejtbeli módszereinkkel követjük a *D. virilis* pszeudo-heterotrimer és a homotrimer dUTPáz importin-c-vel való komplexálódását. A magi akkumuláció hatékonyságát rovar és emlős sejtvonalakon is

teszteltük, különböző fluoreszcens riporter fehérjéket alkalmazva. Az *in vitro* eredmények *in vivo* relevanciáját *D. virilis* és *D. melanogaster* rovarokban vizsgáltuk, immunhisztokémiával követve az endogén dUTPáz lokalizációját. Azt tapasztaltuk, hogy a *D. virilis* pszeudo-heterotrimer dUTPáza kevésbé halmozódik fel a magban. Az eredmények tükrében felmerül a kérdés, hogy vajon a *D. melanogaster* által kódolt két külön kompartmentumba (magba és citoplazmába) lokalizálódó dUTPáz izoformák funkcióját helyettesítheti-e a *D. virilis* egyetlen izoformával, csupán az elérhető NLS szignálszám megváltoztatásával.

## P2 - Biokémiai analitika

### P2-01

#### Investigation of protein acetylation and poly(ADP-ribosyl)ation by synchrotron FTIR microspectroscopy

<sup>1</sup>Brunyánszki A., <sup>1</sup>Szántó M., <sup>1</sup>Fodor K., <sup>2</sup>Sandt C., <sup>2</sup>P. Dumas, <sup>1</sup>BAI Péter

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

<sup>2</sup>Smis Beamline, Synchrotron Soleil, France

Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy is a vibrational spectroscopy technique which can be used as a diagnostic tool for characterising the composition and structure of cellular components within cells. We have recently described a correlation between poly(ADP-ribose) polymerases and the class III deacetylase SIRT1 that prompted us to set up a method for the simultaneous determination of poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) and protein acetylation. We utilized C2C12 myoblasts and A549 cells in our experiments. After treatment with the appropriate agents cells were fixed in 4% formaldehyde and were applied on Mirr IR low-e microscope slides. FTIR spectra of single cells were obtained and analyzed at SMIS beamline at Soleil Synchrotron by PLSDA multivariate component analysis. To assess protein acetylation trichostatin A (TSA, an inhibitor of protein deacetylases) and resveratrol (RSV, an inductor of protein deacetylases) were used. Changes in the 1100-1050 cm<sup>-1</sup> range showed good correlation with the induction, or inhibition of protein acetylation. We performed time course and dose-dependence experiments. Time course experiments with TSA and RSV have shown correlation between time elapsed and change in the respective component. We continued our experiments by investigating the dose-dependence of the signal. We performed measurements 3 and 24 hours post-treatment and for TSA we revealed reliable dose dependence. To assess PARylation we applied control, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) knockdown A549 cells as those present the two ends of the PARylation scale. Cells were challenged with 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min). The 1150-1050 cm<sup>-1</sup> range displayed characteristic changes when we compared the PARP-1 knockout unstimulated and the PARG knockout stimulated cells. However, it did not show good correlation with further samples. Supported by Bolyai fellowship (PB); NIH FR-26/2009, Baross program Seahorse grant; OTKA PD8347.

### P2-02

#### A doménzáródás mechanizmusának atomi szintű leírása a dimer thermophilus 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) esetében

<sup>1</sup>GRÁCZER Éva, <sup>2</sup>Merli A., <sup>3</sup>Singh R.K., <sup>4</sup>Karuppasamy M., <sup>1</sup>Závodszy P., <sup>5</sup>Weiss M.S.,

<sup>1</sup>Vas M.

<sup>1</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup>Pármiai Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Italy; <sup>3</sup>Nemzeti Kémiai Laboratórium, India; <sup>4</sup>Leideni Egyetemi Orvosi Központ, Molekuláris Sejtbiológia, Elektronmikroszkópia Osztály, Hollandia; <sup>5</sup>Helmholtz-Centrum Berlin, Makromolekuláris Kristallográfia (BESSY-MX), Germany

A fehérjék működése közben számos monomer és dimer fehérje esetén figyelték már meg a doménmozgásokat, de ennek mechanizmusa többnyire még felderítetlen. Az izopropilmalát dehidrogenáz két azonos alegységből felépülő enzim, melynek mindkét polipeptidlánc két doménből épül fel. Az IPMDH különböző kristályszerkezeteinek összehasonlítása alapján a domének egymáshoz viszonyított helyzete a zárt és nyitott szélső állapotok között változik. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a doménzáródásnak jelentős szerepe van az IPMDH katalitikus ciklusa során. A különböző IPMDH-szubsztrát komplexek szerkezete röntgenkristallográfias módszerrel lett meghatározva. A szubsztrát indukálta konformációs változások lehetséges molekuláris mechanizmusának, valamint az IPMDH által katalizált reakció szerkezeti hátterének leírását a molekuláris grafikai analízis tette lehetővé. A konzervatív oldalláncok kölcsönhatásai szubsztrátok jelenlétében bekövetkező megváltozásának feltérképezése két fő csukló-régió megállapításához vezetett: a csukló 1 az alfa-d és a béta-F, míg a csukló 2 az alfa-h és a béta-E szerkezeti elemek között helyezkedik el. Az analízis kimutatta, hogy a MnIPM komplexnek jelentős szerepe van ezen csukló-régiók irányításában. A NADH szubsztrát szintén részt vesz a domének záródásában, de sokkal kisebb mértékben. Mindemellett az alegységkölcsönhatások is hozzájárulnak a domének záródásához. A domének és az alegység-



gek közötti nagymértékű kooperativitás rámutat a szerkezet-funkció komplex összefüggéseire.

### P2-03

#### **Glükóz metabolizmus vizsgálata ischaemia reperfüzió után $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC NMR spektroszkópiával**

<sup>1</sup>KRISZTA Gábor, <sup>1</sup>Nagyné Kiss Gy., <sup>3</sup>Szakács Z., <sup>1</sup>Berente Z.

<sup>1</sup>PTE, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs;  
<sup>2</sup>Richter Gedeon Nyrt., Szerkezetkutatási Osztály, Budapest

A szívizomsejtek glükózfelvetele ischaemiás állapotból visszatérve jelentősen megnövekszik, mivel a fiziológias körülményektől eltérően a sejtek szubsztrátszelekciója megváltozik és nem zsírsavakból, hanem gyorsabban átalakítható glükózból fedezik a fellépő energiaigényt. Ez a jelenség az irodalomból is ismert és kísérletileg is sikerült reprodukálnunk. Korábbi kísérleteinkben Langendorff szerint perfundált patkányszívben vizsgáltuk számos PARP-gátló hatását az ischaemia reperfüzió után megnövekvő glükózfelveletre. A HO-3089 nevű vegyületnél azt találtuk, hogy a többi PARP-gátlóval szemben nem csökkentette, hanem tovább növelte a glükózfelvelet sebességét. A perfundált szívizomsejtek ischaemia utáni reperfüziós fázisban gyorsfagyasztáson estek át, majd frakcionálás és extrakció után NMR csőbe kerültek. Az értékelhető spektrumokhoz a természetesnél nagyobb koncentrációjú  $^{13}\text{C}$ -izotóp szükséges, így a reperfüzió során az alkalmazott oldathoz univerzálisan  $^{13}\text{C}$ -jelölt glükózt adtunk. A jelet adó atomok megjelennek az anyagcsere termékeiben, lehetővé téve az egyes metabolitok detektálását és félkvantitatív meghatározását. Ennek a módszernek a lényege, hogy a  $^1\text{H}$ -ok és a  $^{13}\text{C}$  atommagok térbeli kapcsoltóságát deríti fel, információt adva az adott molekula térszerkezetéről és összetételéről. A bemutatandó munka célja az volt, hogy kiderítsük a HO-3089 mely anyagcsereutak fluxusában okoz növekedést illetve csökkenést posztischaemiás szívben.

### P2-04

#### **Trp és Arg aminosavakban gazdag antimikrobiális peptidok konformációs mintáztatának tanulmányozása**

LEITGEB Balázs

MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

Az indolicidin és tritripticin antimikrobiális tridekapeptidok, amelyek széleskörű antibakteriális és antifungális hatással rendelkeznek, ugyanakkor hemolitikus aktivitást is mutatnak. Az aromás és bázikus aminosavak mellett mindkét peptid tartalmaz Pro aminosavat is, így az Xaa-Pro peptidkötések esetén fellépő cisz-transz izomériának megfelelően ezen molekulák esetében több sztereoizomert különböztethetünk meg. Az indolicidin és tritripticin sztereoizomereire vonatkozóan molekuladinamikai (MD) számításokat végeztem el, hogy tanulmányozzam a cisz-transz izomériának a peptidok térszer-

kezeti sajátságaira kifejtett hatásait, valamint hogy azonosítsam a sztereoizomerek jellegzetes konformációs mintázatait. Egyrészt azt vizsgáltam, hogy a peptidok milyen térszerkezeti tulajdonságokat mutatnak az MD szimulációk során, másrészt pedig, hogy ezek a konformációs sajátságok hogyan változnak az idő függvényében. A sztereoizomerek esetén meghatároztam az adott szekvenciaszakaszokra jellemző, különböző típusú  $\beta$ -turn struktúrákat (I, III és VI típusú  $\beta$ -turn-ök). Emellett azonosítottam a turn szerkezetek stabilizálásában fontos szerepet játszó intramolekuláris kölcsönhatásokat (H-kötések és prolin-aromás kölcsönhatások). Ezek közül a molekulagerinc NH és CO csoportjai között kialakuló  $i$ - $i+3$  H-kötések az I és III típusú  $\beta$ -turn-ök szerkezetének stabilizálásában játszanak jelentős szerepet, míg a prolin-aromás kölcsönhatások a VI típusú  $\beta$ -turn-ök szerkezeti stabilitásához járulnak hozzá. Az MD számítások alapján megállapítható, hogy az indolicidin és tritripticin sztereoizomerei jellegzetes konformációs mintázatokat mutatnak, amelyek megjelenése összefüggésben van az Xaa-Pro peptidkötések esetén fellépő cisz-transz izomériával. A munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA PD 78554) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.

### P2-05

#### **Ala-tartalmú indolicidin analógok térszerkezeti sajátságainak vizsgálata molekuladinamikai módszerekkel**

LEITGEB Balázs

MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

Az indolicidin a szarvasmarha neutrofil granulocitáiból izolált antimikrobiális peptid, amelynek antibakteriális és antifungális hatása rendkívül széles körben mutatkozik meg, emellett pedig hemolitikus és antivirális aktivitással is rendelkezik. Az indolicidin három Pro aminosavat tartalmaz, amelyeknek jelentős szerepe van a peptid térszerkezetének meghatározásában és kialakításában. A korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a Pro aminosavak Ala-nal történő cseréje következtében az Ala-tartalmú indolicidin analógok eltérő antimikrobiális hatást mutattak. Munkám során azt tanulmányoztam, hogy milyen hatást gyakorol a Pro aminosavak Ala-nal történő cseréje az indolicidin térszerkezeti tulajdonságaira. Az Ala-tartalmú analógok esetén molekuladinamikai (MD) számításokat hajtottam végre, amelyek alapján különböző konformációs sajátságok megjelenését, illetve ezek időbeli változásait vizsgáltam. Az egy vagy több Ala aminosavat tartalmazó peptidok esetében tanulmányoztam a különböző másodlagos szerkezeti elemek ( $\beta$ -turn és helikális struktúrák) előfordulását. Emellett a különféle intramolekuláris kölcsönhatások (H-kötések, aromás-aromás, prolin-aromás és kation- $\pi$  kölcsönhatások) jelenlétét is vizsgáltam, amelyek fontos szerepet töltenek be a konformációs állapotok térszerkezetének stabilizálásában. Az MD szimulációk eredményei azt mutatták, hogy az indolicidin Ala-tartalmú analógjai karakterisztikus

konformációs sajátosságokkal rendelkeznek. Továbbá az is megállapítható volt, hogy a másodlagos szerkezeti elemek és intramolekuláris kölcsönhatások jelenléte nemcsak az Xaa-Pro peptidkötések esetén fellépő cisz-transz izomériával, hanem a Pro aminosavak Ala-nal történő cseréjével is összefüggésben állt. A munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA PD 78554) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.

## P2-06

### Antimikrobiális peptidek palindrom szakaszainak konformáció-analízise és térszerkezeti jellemzése

LEITGEB Balázs, Hudoba L., Rákhely G.  
MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

Az antimikrobiális peptidek között megfigyelhető palindrom szakaszokkal rendelkező molekulák, és ezek a jellegzetes palindrom szekvenciák nemcsak a térszerkezet kialakítása szempontjából bírnak nagy jelentőséggel, hanem a biológiai hatás tekintetében is fontos szerepet tölthetnek be. Ezen antimikrobiális peptidek közé egyrészt apoláris aminosavakban gazdag (pl. decoralin, temporin C, temporin 1Pra, temporin 1TSb és temporin 1DYa), másrészt pedig Pro-tartalmú (pl. indolicidin, tritripticin, metalnikowin IIA és metalnikowin III) molekulák tartoznak. Az említett peptidek palindrom szakaszai esetén végeztünk el egy átfogó konformáció-analízist és térszerkezeti jellemzést a szimulált anelláció (SA) módszerének alkalmazásával. Az SA számításokból kapott konformerek esetében megvizsgáltuk az előforduló másodlagos szerkezeti elemeket, és különböző típusú turn struktúrákat, illetve helikális szerkezeteket azonosítottunk. Emellett meghatároztuk azokat az intramolekuláris kölcsönhatásokat (H-kötések, aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások), amelyek fontos szerepet játszanak a palindrom szekvenciák konformációs állapotainak stabilizálásában. A decoralin, az indolicidin és a tritripticin palindrom szakaszai esetén kapott eredményeink összhangban vannak a peptidek teljes szekvenciájára vonatkozó korábbi megfigyelésekkel. A temporinok és metalnikowinok palindrom szakaszai esetén kapott térszerkezeti adataink mindenféleképpen hasznosak, ugyanis ezen peptidek szerkezetére vonatkozóan eddig semmiféle adat nem állt rendelkezésre az irodalomban. A munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA PD 78554) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (L.B.), illetve a Richter Gedeon Nyrt. (H.L.) támogatásával készült.

## P2-07

### Fehérjekrisztallográfiás vizsgálatok a *Thermus thermophilus* 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) új enzim-szubsztrát komplexein

<sup>1</sup>PALLÓ Anna, <sup>2</sup>Gráczner É., <sup>3</sup>Merli A., <sup>2</sup>Závodszy P., <sup>2</sup>Vas M., <sup>4</sup>Weiss M.S.

<sup>1</sup>MTA KKK, Budapest; <sup>2</sup>MTA Enzimológiai Intézet,

Budapest; <sup>3</sup>Pármái Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Italy; <sup>4</sup>Helmholtz-Centrum Berlin, Makromolekuláris Krisztallográfia, Germany

Az IPMDH enzim fontos szerepet játszik a baktériumok és növények leucin bioszintézisében. Az enzim az izopropil-malátot (IPM) 2-izopropil-oxopiroszólósavvá oxidálja Mn<sup>2+</sup> jelenlétében, míg a NAD<sup>+</sup> kofaktort NADH-vá redukálja. A folyamat közben az enzimet alkotó domének egymáshoz képest jelentős mértékben elmozdulnak. A natív apo enzimen kívül annak Mn<sup>2+</sup> ionnal, Mn\*IPM illetve NADH-val külön-külön alkotott komplexei kristályszerkezetét már korábbi munkákban jellemezték. A kvaterner komplex és új szubsztrát/kofaktor szerkezetek leírása azonban hozzásegíthet ahhoz, hogy jobban megismerjük az enzim működési mechanizmusát és a doménmozgások funkciójában betöltött szerepét. Az új komplexeket függő csepp módszerrel kristályosítottuk. A kicsapószer és szerves adalék anyagok koncentrációjának változtatásával optimalizáltuk kristályosítási körülményeket. A kedvező fagyás érdekében a kristályokat megfelelő krio-protéktív oldatokba helyeztük, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A röntgendiffrakciós adatgyűjtést a BESSY-MX szinkrotron sugárforrásánál végeztük. A reflexiókat az XDS programmal indexáltuk, skáláztuk és integráltuk. A korábban megismert szerkezeteket kiindulási modellként használtuk a szerkezetfinomításhoz, illetve a MOLREP programmal végzett molekuláris helyettesítéshez. A szerkezetfinomításhoz a REFMAC5 programot, a manuális modellépítéshez pedig a COOT programot használtuk. A szerves adalékanyagok megváltoztatták a kristályok habitusát, ezáltal szórás képességüket. A kristályosításhoz magas koncentrációban adtuk a fehérjéhez az IPM szubsztrátot és a kofaktorokat, a Mn<sup>2+</sup> iont és a NADH-t, ezáltal kristályosítani tudtuk az IPMDH kvaterner komplexét, amely a domének zártságában jobban hasonlít az Mn\*IPM komplexre, mint a gyenge inhibitorral, a bicinnel képzett kvaterner komplexre. A 2,5 Å-nél nagyobb felbontású szerkezet lehetővé teszi a fehérje és ligandumai közti kölcsönhatások jellemzését.

## P2-08

### Fehérje interakciós hálózatok predikciója geometriai hash-selés használatával

SZERENCSE Balázs, Bánky D., Ördög R., Grolmusz V.

ELTE, Protein Information Technology Group, Budapest

A NASCENT elnevezésű, fehérje-fehérje interakciós (továbbiakban PPI) hálózatokat generáló eszközünket már korábban bemutattuk (Daniel Banky, Rafael Ordog, Vince Grolmusz: NASCENT: An automatic protein interaction network generation tool for non-model organisms, *Bioinformatics* 3/8: 361-363, 2009). Ezen szoftverünk segítségével bármely kevésbé feltérképezett organizmusnak előállíthatjuk a fehérje-fehérje fizikai interakciós hálózatát, egy már tanulmányozott és jól ismert modell élőlény hálózata-

tának felhasználásával. A fizikai interakciók feltérképezése a megegyező génnevek és/vagy szekvencia illesztés segítségével történik. Poszterünkön egy új megközelítést mutatunk be a PPI hálózatok becsléséhez, mely a krisztallográffal meghatározott fehérje térszerkezetek geometriai hash-selésén alapszik. A NASCENT a számításokhoz a PPI adatbázisokból (pl. IntAct, MINT, DIP) lekérdezett modell organizmusok fehérje interakciós adatait használja fel. A forrás és cél fajokhoz tartozó fehérje információk a SwissProt és/vagy TrEMBL adatbázisokból származnak. A fehérjék háromdimenziós szerkezetét az RCSB Protein Data Bank segítségével határozzuk meg. A UniProtKB-beli szekvenciákat megfeleltetjük a PDB adatfájloknak. A Protein Data Bankban fellelhető fehérjéket egy geometriai hash-táblává alakítjuk, melynek segítségével azonosíthatjuk a hasonló molekulákat. Egy bizonyos küszöbérték felett a fehérjéket hasonló funkciójúaknak tekintjük. Ezt kapcsolatot használjuk fel PPI predikciós módszerünk továbbfejlesztéséhez. Az interneten fellelhető adathalmazok gyors feldolgozása érdekében, a programunk képes bizonyos, gyakran használt értékeket hozzárendelni a PPI gráf fehérjéihez, úgy mint név, aminosav-szekvencia, valamint külső adatbázisokra való hivatkozások (pl. PubMed, RefSeq).

#### P2-09

##### **C60 fullerén szöveti megoszlásának és szövetkárosító hatásának vizsgálata egérben**

<sup>1</sup>Lendvai Z., <sup>2</sup>VETŐ Sára, <sup>3</sup>Csala J., <sup>2</sup>Jámbor É., <sup>2</sup>Márk L., <sup>3</sup>Pajor L., <sup>2</sup>Ohmacht R.

<sup>1</sup>PTE KK, Radiológiai Klinika, Pécs; <sup>2</sup>PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; <sup>3</sup>PTE ÁOK, Patológiai Intézet, Pécs

1985-ös felfedezésük óta a C60 fullerének biológiai és orvosi biológiai alkalmazására számos elképzelés született, azonban megfelelő, nem toxikus oldószer hiányában nem sikerült biokompatibilis, natív C60 alapú valódi oldatot előállítani, ami akadályozta mind élettani hatásainak, mind toxicitásának tanulmányozását. Korábbi munkánk során különféle növényi olajok segítségével natív C60 fullerén oldatokat állítottunk elő, most pedig C57Bl/6 egernek nagy dózisban intraperitoneálisan adott olívaolajban oldott C60 fullerén szöveti megoszlását és szövetkárosító hatását vizsgáltuk MALDI-TOF MS és szövettani módszerekkel. 5 nap kezelés után a legnagyobb mértékben az egerek tüdejében, májában, kisebb mértékben veséjében és lépében akkumulálódott a C60 fullerén, míg sem vérből, sem az állatok agyából nem sikerült azt kimutatni. Bár az olívaolajban oldott fullerén nem volt akutan toxikus hatású, az állatok májában kis- és nagy-cseppes elzsírosodás, veséjében ugyancsak zsíros degeneráció, míg tüdejében toxikus behatásra utaló hyalinmembrán képződéssel járó pneumonitis és lipidfelhalmozódás volt megfigyelhető. Az elváltozások közül a csak oldószerrel (olívaolaj) kezelt állatok esetében csak a szervek elzsírosodása alakult ki. Eredményeink arra utalnak, hogy az olívaolajban oldott natív C60 fullerén elsősorban a parenchymás

szervekben halmozódik fel, a vérből kiürül és a vér-agy gáton nem jut át. Nagy dózisban adva az olívaolaj önmagában is számos szerv elzsírosodásához vezet, a C60 fullerén hatására pedig toxikus pneumonitis alakul ki egerekben.

#### P2-10

##### **Agilent Bravo AssayMap - mikrokromatográfiás mintaelőkészítő platform fehérje, illetve proteomikai alkalmazásokhoz**

ZALKA Anna

Kromat Kft., Budapest

A mintaelőkészítés kulcsfontosságú szerepet játszik fehérje vagy proteomikai minták analitikájában. Az eddig használatos preparálási módszerek a fehérjék fizikai (molekulaméret, töltés, hidrofobicitás) vagy affinitási tulajdonságait, illetve ezek kombinációit használják ki, individuálisan kezelve a mintákat. A proteomika sajátosságából adódó lecsökkent mintatér fogat és a megnövekedett mintaszám a robotizáció felé tereli a jelenlegi fejlesztéseket. Jelen munka az Agilent Technologies Inc. legújabb fejlesztését, az AssayMap mikrokromatográfiás robot platformot mutatja be. Az AssayMap technológia, különböző, hagyományos vagy egyedi kromatográfiás töltettel ellátott, az Agilent Bravo folyadékkezelő robotra illeszthető mikrooszlopokat használ mintaelőkészítésre. A Bravo speciális AssayMap pipettázó fejében lévő fecskendők segítségével a mikrooszlopokon történő folyadék áramlás szigorúan egyirányú és széles, 1µl/perc-100µl/mp (max. 15bar) áramlási sebességtartományban szabályozható. Ezzel a megoldással valódi kromatográfiás elválasztás érhető el, szemben pl. az SPE oszlopokon, gyakran kétirányú folyadékmozgatással, történő elválasztással. Az AssayMap platformon használható mikrooszlopok 1-200µl minta, mosó oldat, eluens, stb. befogadására képesek, az oszlopok átlagos kapacitása 100µg célfehérje, vagy fehérjekeverék. A mikrooszlopok többször használhatóak. Az Agilent Bravo AssayMap robotizált platform 1-96, 1-384, illetve 1-1536 minta kezelésére alkalmas párhuzamosan, az aktuális felhasználói igényekhez igazodva. Az Agilent AssayMap mikrooszlop töltet portfolio: ProteinA, IEX, HIC, C8, C4, PS, specific antibody, specific capture molecule, IMAC, trypsin, PNGase, proteázok, glikozidázok, lipázok, Streptavidin, custom töltetek, wide pore és non porous kivitelben. Használhatók elsősorban, de nem kizárólagosan, fehérje, (pl. antitest) proteomikai mintákhoz. Tipikus alkalmazások: minta tisztítás, összfehérje kivonás, specifikus fehérje kivonás, antitest capture, antigén capture, kis molekula capture, gyors ELISA, on-column emésztés.

## P3 - Membrán és citoskeleton

### P3-01

#### **A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe a $\beta$ -catenin defoszforilációjának szabályozásában endothel sejtekben**

KÁSA Anita, Gergely P., Csontos Cs.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Az endothel sejtek barrier funkciójának szabályozásában fontos szerepe van a citoskeletonális és sejtkepcsoló fehérjék reverzibilis foszforilációjának. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az endothel monolayer integritását biztosító adherens sejtkepcsoló fehérjék, a VE-cadherin és a  $\beta$ -catenin Ser/Thr oldalláncokon foszforilálódó fehérjék, azonban defoszforilációjuk kevésbé ismert. Ezért munkánk céljából tűztük ki a PP2A regulátor B alegységének vizsgálatát a citoskeletonális fehérjék illetve a  $\beta$ -catenin defoszforilációjának szabályozásában. Marha tüdő artéria endothel sejteket (BPAEC) PP2A B konstrukttal transzfektáltunk. A regulátor alegységet overexpresszáló sejtekben jelentősen lecsökkent a foszfo- $\beta$ -catenin a Ser552 és a Ser675 oldalláncokon. Ezután sikeresen elvégeztük a Bc csendesítését az izoformára specifikus siRNS-sel, majd a csendesített sejteken különböző kezeléseket alkalmaztunk. Kimutattuk, hogy a kontroll sejtekben a forskolin erősítette a barrier funkciót, míg nokodazol és thrombin hatására rések alakultak ki a sejtek között, a sejtkepcsolatok felbomlottak. A csendesített sejtekben a  $\beta$ -catenin szintje lecsökkent a membránban, a sejtkepcsolatok már a kezeletlen sejtekben is sérültek. Ezt a hatást tovább erősítette a nokodazol illetve a thrombin kezelés. Igazoltuk, hogy a B alegység depléciója megnövelte a  $\beta$ -catenin foszforilációs szintjét a Ser552 oldalláncban, míg a Ser675 oldallánc esetében nem tapasztaltunk változást. Eredményeink szerint a PP2A B depléciója hatással van a citoskeleton elemeinek szerveződésére is. A csendesített sejtekben a tubulin destabilizálódott, illetve a kortikális aktin megerősödött, és stresszkábelek alakultak ki. Mindezekből arra következtetünk, hogy a PP2A B alegység szabályozza a  $\beta$ -catenin defoszforilációját és a citoskeletonális fehérjék szerveződését, ezáltal az endothel barrier funkcióját. Munkánkat az OTKA CNK 80709 pályázat támogatta.

### P3-02

#### **A miozin foszfatáz szabályozása kalcineurin-katalizált MYPT1 defoszforilációjával**

<sup>1</sup>KOLOZSVÁRI Bernadett, <sup>2</sup>Kiss A., <sup>1</sup>Bécsi B.,

<sup>1</sup>Erdődi F., <sup>1</sup>Gergely P., <sup>1</sup>Bakó É.

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

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

Az endotél sejtek (EC) konfluens monolayert alkotnak az erek belső falán. A citoskeleton elemeinek átrendeződése, az aktin-miozin kölcsönhatás változásai meghatározzák az EC alakját és a vascularis barrier integritását. Trombin hatására az EC kont-

rakciója figyelhető meg, ezáltal a sejtek között hézagok jönnek létre, a barrier funkció sérül. A kontrakció során a miozin könnyű láncának (MLC) foszforilációja figyelhető meg, amelyet miozin könnyű lánc kinázok (MLCK), míg a defoszforilációt a protein foszfatáz-1 (PP1) típusú miozin foszfatáz (MP) katalizálja. A MP holoenzim regulátor alegysége egy 130/133 kDa fehérje (MYPT1), amely a szubsztrát-specifitást és a PP1 katalitikus alegység (PP1c) aktivitását is szabályozza. A MYPT1 foszforilációja a Thr695 oldalláncban gátolja a PP1c aktivitást. A kalcineurin (CN)  $Ca^{2+}$ -kalmodulin függő Ser/Thr specifikus protein foszfatáz. A CN gátlószere, a cyclosporin-A (CsA), amelynek jelenlétében a trombin hatására kialakuló diszfunkció hosszabb ideig megmarad. Jelen munkánkban kimutattuk, hogy CsA kezelés után növekszik a MYPT1 okozó foszforilációs szintje a Thr695 oldalláncban. Trombin hatására a MYPT1 foszforilációs szintjének változása tranzienst, amely azonban CsA előkezelést követően fenntartott marad. A CN és a MYPT1 kölcsönhatását GST-MYPT1 „pull-down” kísérletekben is igazoltuk, valamint a két fehérje kolokalizációját fluoreszcens konfokális mikroszkópiával is kimutattuk EC-ben. A MYPT1 és a CN kölcsönhatásának szerkezeti hátterét felületi plazmon rezonancia mérésekkel tártuk fel. A CN kötődése vad típusú és rövidített rekombináns MYPT1 fragmentumokhoz arra utalt, hogy a CN a MYPT1 N-terminális régiójához kötődik. A CN defoszforilált MYPT1-gyel kialakuló komplexe meglehetősen stabil, ami arra utal, hogy ezen fehérjék kölcsönhatásának az egyszerű enzim-szubsztrát kölcsönhatáson kívül más biológiai funkciója is lehet. A kalcineurint mint a miozin foszfatáz aktivitását szabályozó enzimet azonosítottuk.

### P3-03

#### **A miozin foszfatáz sejtmagi lokalizációja és szabályozó szerepe**

SIPOS Adrienn

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A miozin foszfatáz holoenzim (MP) két fő alegysége a protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegység (PP1c) és a 110/130 kDa miozinhoz is kötődő regulátor alegység (MYPT1). A miozin foszfatázt először izomszövetben jellemezték, szerepét az izomsejtek kontraktilis folyamataiban és más, miozinhoz kötött citoskeletonális változások szabályozásában ismerték fel. A MYPT1 citoszol/citoskeleton mellett sejtmagi lokalizációt is mutat patkány aorta simaizom sejtekben és más nem-izom sejtvonalakon is, így primer idegsejt tenyészetekben és human hepatokarcinóma (HepG2) sejtekben is, ami a jelenség általános meglétére utal. Munkánk célja volt, hogy az enzim sejtmagi lokalizációjának meghatározásával és a miozin foszfatázzal kölcsönható fehérjék kimutatásával vizsgáljuk az enzim sejt-magon belüli lehetséges szabályozó funkcióit. A MYPT1 alegység jelenlétét HepG2 sejtek sejtmagi és szubnukleáris frakcióiban Western blot analízis-

sel és foszfatáz enzimaktivitás vizsgálattal is bizonyítottuk. A MYPT1 a sejtmag magvacskán kívüli állományában található, és nem kötődik a sejtmagmembránhoz. A MYPT1 szubcelluláris lokalizációjának immunfluoreszcens vizsgálatával kimutattuk jelenlétét a spliceoszómákban, ami a MP mRNS érés szabályozásában betöltött szerepére utalhat. Igazoltuk a PP1c $\delta$  és MYPT1 sejtmagi kolokalizációját, ami arra utal, hogy a MYPT ezzel az izoformával alkot holoenzimet a sejtmagon belül. A potenciális sejtmagi MYPT1-kölcsönható fehérjék kimutatását pull down módszerrel végeztük Flag-MYPT fehérjével és ezt követő tömegspektrometriás elemzéssel. Számos kölcsönható fehérjét azonosítottunk, így a metiloszóma komplex több tagját, a hiszton 1 illetve ribonukleoproteineket. A spliceoszómákkal és a metiloszóma komplexszel való kölcsönhatás behatóbb vizsgálata rávilágíthat a MP szerepére a sejtmagban lejátszódó defoszforilációs folyamatokban, így a transzkripció és az RNS érés szabályozásában betöltött szerepére. A kutatásokat a Bolyai Ösztöndíj és az OTKA K58416 pályázat támogatta.

### P3-04

#### A kapszaicin serkenti az *in vitro* porcképződést?

SOMOGYI Csilla, Takács R., Matta Cs., Juhász T., Katona É., Zákány R.

DE OEC, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Debrecen

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid (TRPV) plazma membrán kationcsatornák az érző idegvégződésekben természetes körülmények között hőingerekre, protonbekötődésre, ozmotikus- és mechanikai ingerekre válaszolnak. A csípős paprikában található kapszaicin a TRPV1 vanilloid szekvenciát kötő régiójához kapcsolódva elsősorban Ca<sup>2+</sup> beáramlást idéz elő a sejtekbe. TRPV csatornák nem ingerlékeny sejteken, pl. keratinocitákon és érett porcsejteken is előfordulnak. A legismertebb TRPV csatorna, a TRPV1 porcszöveti jelenlétéről nincsenek adatok, ezért kísérleteinkben két különböző porcdifferenciációs modellt alkalmazva vizsgáltuk a TRPV1 és TRPV4 expresszióját és porcképződésre gyakorolt hatásait. Kísérleti modellként csirkeembriók végtagtelepeiből előállított nagy sűrűségű (high density, HD) primer mezenchimális sejtkultúrát, valamint emlős kísérleti modellként BMP2-t expresszáló porcosodó egér HD-kultúrát használtunk. A csatorna expressziójának igazolását RT-PCR módszerrel végeztük, ahol pozitív kontrollként csirkeagyat használtunk. A differenciálódó csirke és egér porcsejteken TRPV1 és TRPV4 mRNS egyaránt kimutatható volt, míg az érett ízületi porcból származó mintákban csak TRPV4 mRNS-t detektáltunk. A tenyésztés eltérő időpontjaiban TRPV1 agonisták (kapszaicin, és reziniferatoxin), antagonisták (kapszazepin) jelenlétében, illetve rövid ideig tartó magas hőmérsékleten (41, 43, 45 °C, 30 perc) vagy alacsony pH-n (pH 5 illetve 6,5) tartottuk a kultúrákat, nyomon követtük a porcképződés mértékét és monitoroztuk

az ioncsatornák RNS expressziójának változását. A csirke modellben a TRPV1 agonisták és antagonisták alkalmazása nem okozott konzekvens változást a porcképződésben és a differenciálódó sejtek élet- és osztódóképességében. Ugyanakkor a 41 és 43 °C-os termikus inger és a savas pH alkalmazása kissé fokozták a porcképződést. A BMP2-t expresszáló C3H10T egér sejtek kapszaicinnal történő kezelése szignifikánsan fokozta a porcképződést. Támogatás: OTKA-CNK 80709 és ETT 022/09.

### P3-05

#### NMDA csatornák jelenléte a plazmamembránban elengedhetetlen a kondrogenikus sejtek differenciációjához

<sup>1</sup>ZÁKÁNY Róza, <sup>1</sup>Juhász T., <sup>1</sup>Matta Cs., <sup>2</sup>Fodor J., <sup>1</sup>Somogyi Cs., <sup>1</sup>Katona É., <sup>1</sup>Takács R., <sup>3</sup>Gergely P. <sup>1</sup>DE OEC, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>DE OEC, Élettani Intézet, Debrecen; <sup>3</sup>DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorok a plazmamembrán nem-szelektív kationcsatornái, melyek dominánsan Ca<sup>2+</sup>-ra permeabilisak. Nem ingerlékeny sejtek közül elsősorban a mechanikai stimulációnak is kitett keratinocitákon, oszteocitákon, valamint ízületi porcsejteken mutatták ki. Saját vizsgálataink szerint a kondrogenikus sejtek a differenciációval összefüggő intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációváltozásokat mutatnak és a mechanikai inger serkenti a porcképződést. Mivel az NMDA csatorna kapcsolatot teremthet a mechanikai ingerek érzékelése és az ic. Ca<sup>2+</sup>-szint között, ezért kísérleteinkben csirkeembriók végtagtelepeiből izolált kondrogenikus sejtekből előállított primer porcosodó high density (HD) sejtkultúrákban vizsgáltuk az NMDA csatornák jelentőségét a sejtdifferenciáció folyamatában. A HD kultúrák sejteit sajátos összetételű (NR1, NR2B, NR3B), alacsony Ca<sup>2+</sup>-konduktanciájú és elsősorban glicinnel agonizálható NMDA receptorokat expresszálóknak. A porcdifferenciációt glutamát adagolása nem, NMDA, glicin és ifenprodil (NR2B antagonisták) alkalmazása a tápfolyadékban serkentette. Ifenprodil megszüntette a porcsejtek nagyfrekvenciájú Ca<sup>2+</sup>-oszillációit, NMDA kissé felerősítette a tranzienseket, míg glicinre nem reagált a jelenség. Mechanikai ingerlés kissé csökkentette a porcosodó sejtek bazális Ca<sup>2+</sup>-szintjét a citoszólban. Az NMDA receptor funkcióképességéhez elengedhetetlen NR1 alegység siRNS-sel történő átmeneti géncsökkentése után a HD kultúrák szokásos 6 napos kultúrálása során a porcképződés, a Ca<sup>2+</sup>-oszillációk és a sejtosztódás erőteljes gátlását tapasztaltuk. A géncsökkentés megszűnését követően (kb. a 6. napon) a sejtek ismét elkezdtek a porcdifferenciáció mester transzkripció faktorának a Sox9-nek az expresszióját, majd fáziseltolódással a porcképződés is bekövetkezett, ami arra utal, hogy a kondrogenikus sejtek porcsejtté differenciálódása NMDA receptorok működése nélkül nem következik be. Támogatóink: OTKA CNK 80709, ETT 022/09.

## P4 - Pathobiokémia

### P4-01

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

BRUNYÁNSZKI Attila, Hegedűs Cs., Szántó M., Gergely P., Virág L., Bai P.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 és -2 (PARP-1 és -2) a poli(ADP-ribóz) polimerázok szupercsaládjába tartoznak. Számos gyulladási folyamatban igazolták a kapcsolatukat transzkripciós faktorokkal, amelyeken keresztül képesek befolyásolni olyan gyulladási folyamatokat, mint a kontakt hiperszenzitivitási reakció (CHS). A CHS T-sejt mediált, késői típusú hiperszenzitivitási reakció, melyet állatmodelleken lipofil vegyületekkel (pl. oxazonon) váltható ki. Célkitűzésünk a PARP-1 és -2 enzimek szerepének vizsgálata és molekuláris szerepük pontos meghatározása CHS reakció során. Kísérleteinkben vad típusú, illetve PARP-1/- és -2/- egereket használtuk fel. A PARP-1/- egerekben a gyulladás csökkent, míg a PARP-2/- egerekben a vad típusal azonos mértékű volt. Szövetvettani vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az oxazonon kezelt PARP-1/- egerekben alacsonyabb az infiltráló sejtek mennyisége. RT-qPCR vizsgálatok a kemokinek, az adhéziós molekulák, és a mátrix metalloproteináz-9 expressziós szintjének csökkenését mutatták az oxazonon indukált PARP-1/- egerekben. A gyulladás során jelentős mennyiségű peroxinitrit képződik összhangban az iNOS fokozott expressziójával, míg a PARP-1/- egerekben ezek a változások elmaradtak a vad típusúhoz képest. Ezzel összhangban a gyöktermelődés által kiváltott PARP-1 aktiváció szintén csökkent PARP-1/- egerekben. Transzaktivációs vizsgálataink alapján a PARP-1+/+ egerekben a p65 (NFκB család) és az ATF-2 transzkripciós faktorok fokozott aktivációját tapasztaltuk, ugyanakkor a PARP-1/- egerek esetében ez az indukció elmaradt. Vizsgálataink során nyert eredményeink azt mutatják, hogy a PARP-1 enzim fontos résztvevő a CHS folyamatában. Irodalmi adatok is alátámasztják eredményeinket, miszerint a PARP-1 és az NFκB, AP-1 transzkripciós faktorok kölcsönhatásának zavara állhat az általunk leírt változások mögött. Munkánkat támogatta: Bolyai ösztöndíj (BP), OTKA PD83473, IN80481, Baross program (Seahorse), NIH FR-26/2009, FEBS fellowship (BA).

### P4-02

#### Az ERD 14 rendezetlen szerkezetű chaperon fehérjeaggregáció gátló hatásának vizsgálata

<sup>1</sup>BULYÁKI Éva, <sup>1</sup>Szabó E., <sup>2</sup>Gelencsér A., <sup>2</sup>Szalai né Agoston B., <sup>2</sup>Tompa P., <sup>1</sup>Kardos J.

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

Napjainkban egyre komolyabb problémát jelentenek a fehérjék kóros aggregációjához köthető humán megbetegedések, mint például az Alzheimer-kór, 2-es típusú cukorbetegség, vagy dialízishez

kötött amiloidózis. Ez utóbbi az MHC-I molekulák β2-mikroglobulin alegységéhez köthető betegség, amely a vesedialízis késői szövődeményeként alakul ki, és a fehérjeaggregátumok izom-, illetve porc-szövetben történő lerakódásával jár. Élő szervezetben történő lerakódásával jár. Élő szervezetben az ún. kereszt-β-lemezes szerkezetű amiloid szálak képződése a résztvevő fehérjék magas lokális koncentrációja miatt, a minőségellenőrző rendszer hibájából, vagy valamilyen a fiziológiás környezettől eltérő körülmény hatására alakulhat ki. Több dajkaféhrjéről kimutatták, hogy képes a fehérjeaggregációt, illetve amiloid képződést gátolni. Az ERD14 egy 185 aminosavas, rendezetlen szerkezetű, erősen hidrofil karakterű növényi chaperon. Felfedeztük, hogy *in vitro* az ERD14 nagymértékben lassítja a β2-mikroglobulin polimerizációját, az annak kialakulására alkalmas körülmények között, mint például alacsony pH-n, vagy semleges pH-n SDS jelenlétében. Az amiloidképződés kinetikáját Thioflavin T fluoreszcencia segítségével követtük nyomon. Alacsony pH-n ekvimoláris koncentrációjú ERD14 mellett nagymértékben lecsökken a szálnövekedés sebessége, míg fiziológiás pH-n, SDS jelenlétében is jól kimutatható a chaperon hatása. CD spektroszkópiai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy az ERD14 nem a monomerre hat, hanem a képződő szálakhoz kötődik, gátolva azok elongációját. Az ERD14 hatásmechanizmusának felderítésére, valamint a funkcióért felelős régió azonosítására további vizsgálatokat folytatunk CD-, és fluoreszcencia spektroszkópia, illetve elektronmikroszkópia segítségével.

### P4-03

#### A ferulaldehid az MKP-1 aktiválásán keresztül gátolja az LPS indukálta jelátviteli útvonalakat RAW264.7 makrofág sejtekben

DEBRECENI Balázs, Tucsek Zs., Radnai B., Rácz B., Sümegi B., Veres B.

PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

A sepszis máig a vezető halálozási okok közé tartozik. A gyulladás kialakulásában meghatározó szerepet játszik a lipopoliszacharid (LPS), amely a sejtekben gyulladáshoz vezet ki a MAPK és a PI3K/Akt jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül. Kísérleteinkben egy polifenol degradációs végtermék, a ferulaldehid (FA) hatását vizsgáltuk LPS-indukálta endotoxikus sokkban. Korábbi *in vivo* eredményeink alapján a FA kiváló gyulladásgátlónak bizonyult. Jelen munkánk a FA gyulladásgátló hatásának hátterében álló molekuláris mechanizmusokat vizsgálja. Az LPS-indukálta gyulladás vizsgálatára a RAW egér makrofág modellt használtuk. Az LPS hatására bekövetkező ROS termelődést C400 fluoreszcens festékkel, a nitrit mennyiséget Griess-reagenssel határoztuk meg. Az LPS indukálta mitokondriális membrán depolarizációt JC-1 fluoreszcens festékkel detektáltuk. Az MKP-1 mennyiségét és a MAPK, valamint a PI3K/Akt jelátviteli útvonalak aktivitását Western-blot technikával, míg az NF-κB akti-

vációt Western-blot és luciferáz esszé segítségével vizsgáltuk. A FA koncentráció-függő módon csökkentette az LPS indukálta ROS és nitrit termelődést, továbbá gátolta a p38, SAPK/JNK és ERK1/2 MAPK-ok aktiválódását. A FA szintén csökkentette az anti-inflammatorikus folyamatokban fontos szerepet játszó Akt LPS kiváltotta foszforilálódását. A FA mérsékelte az NF- $\kappa$ B aktivitást, továbbá növelte a sejtekben az MKP-1 mennyiségét, és visszaállította a mitokondriumok normál polarizációs állapotát. Eredményeink azt mutatják, hogy RAW makrofág sejtekben a FA antioxidáns tulajdonságát részben az LPS indukálta mitokondriális membrán depolarizáció kivédésével, anti-inflammatorikus hatását pedig az MKP-1 mennyiségének megnövelésén keresztül a MAPK-ok defoszforilálásával, inaktiválásával fejti ki. A munka az OTKA K-73738 és F-67996 kutatási pályázatok támogatásával készült.

#### P4-04

##### **Egy tirozin-foszfataz fehérjét kódoló gén (PTPN6/SHP1) működésének hibája hozzájárulhat neutrofil dermatózis kialakulásához emberben és egérben**

GYÖRFY Zsuzsanna

*Rush University Medical Center, Chicago, USA*

Csoportunk korábban talált egy „B2 repeat” inszerciót egy tirozin-foszfataz enzimet kódoló egér génben (PTPN6). A homozigóta mutáns PTPN6 génnel rendelkező egerek olyan bőrgyulladást kaptak, amely humán páciensek neutrofil dermatózisára emlékeztetett. Emberekben a neutrofil dermatózis egy heterogén autoimmun betegségcsoport, amelyre általánosan jellemző a neutrofil granulociták megjelenése a bőrben. Ilyenek például a Sweet szindróma (SW) vagy a pioderma gangrenosum (PG). Az említett ritka bőrbetegségek esetében előfordul örökletesség, de a genetikai háttér még nem tisztázott. A PTPN6 gén, illetve az általa kódolt fehérje szerkezete és expressziója nagyfokú hasonlóságot mutat egérben és emberben. A PTPN6 génről két izoforma íródik át két különböző promóter által. Mind egérben, mind emberben az egyik izoforma csak vérsejtekben (például neutrofil granulocitákban) termelődik, és fontos szerepe van a sejtek apoptózisának/túlélésének a szabályozásában. Bebizonyítottuk, hogy egérben a PTPN6 mutációja által okozott „neutrophilic dermatosis-like disease” (NDLD) monogénesen öröklődik. Vizsgálataink során beteg és egészséges emberek fehérvérsejtjeinek totál RNS-éből cDNS-t szintetizáltunk, és megszekvenáltuk a tirozin-foszfataz enzimet kódoló cDNS, illetve genomai DNS szakaszokat is. Western analízissel összehasonlítottuk a tirozin-foszfataz enzim termelődését, és friss vérminták fehérvérsejt populációiban detektáltuk a tirozin-foszfataz aktivitást. Az általunk talált mutációk, illetve a nagy számú splice-variáns megmagyarázhatja nagy mennyiségű funkciót veszített tirozin-foszfataz enzim megjelenését a vérsejtekben. Emiatt a granulociták apoptózisa nem következik be, és így kialakulhat az autoimmun bőrgyulladás. Az abnormális splice-

variánsok kialakulásának konkrét okai egyelőre ismeretlenek. Valószínűleg ezek a betegségek emberben - ellentétben az egerekkel - nem csak egy gén hibájához köthetőek.

#### P4-05

##### **Egy új citoprotektív vegyület, az izatin azonosítása HTS vizsgálattal**

<sup>1</sup>HEGEDŰS Csaba, <sup>1</sup>Lakatos P., <sup>2</sup>Kiss A., <sup>2</sup>Patonay T., <sup>1</sup>Virág L.

<sup>1</sup>DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>DE TEK, Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen

Vizsgálataink során a DE molekulabankjának 1863 vegyületének szűrését végeztük el új citoprotektív vegyületek azonosítása céljából. 23 olyan vegyületet találtunk, melyek védelmet nyújtottak a hidrogén-peroxid citotoxikus hatása ellen, viszont ezek közül 15 önmagában citotoxikusnak bizonyult. A továbbiakban csak a nem citotoxikus vegyületekkel dolgoztunk. Öt vegyület antioxidánsnak bizonyult. Két vegyület esetében pedig azt tapasztaltuk, hogy gátolja a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim, melynek aktivációja az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásban fontos szerepet játszik. A fennmaradó vegyületek között találtunk 4 db szerkezetileg hasonló indol-származékot is, további vizsgálatainkat ezekkel végeztük. E vegyületek friss törzsoldatai már nem voltak citoprotektívek, így tömegspektrometriai analízist végeztünk a molekulabank mintáin. Mind a négy vegyület eredeti oldataiban kimutattuk az izatint, így megvizsgáltuk, hogy ez a degradációs termék lehet-e felelős a farmakológiai hatásért. Az izatin koncentráció-függő módon védelmet nyújtott Jurkat sejtekben a hidrogén-peroxid citotoxikus hatásával szemben, tehát valóban az izatin lehet felelős e vegyületcsoport citoprotektív hatásáért. Az izatin szintén citoprotektívnek bizonyult egér timocitákon és MCF-7 emlőkarcinóma sejteken. Citotoxikus hatása nagyságrendekkel a hatásos dózis felett van. Az izatin védelmet nyújtott mind az apoptózissal, mind pedig a nekrotikus sejthalállal szemben, anélkül, hogy az apoptotikus sejthalál központi végrehajtóit, a kaspázokat gátolná. Hatása valószínűleg a mitokondriális változásoktól proximálisan érvényesül, mivel gátolja a hidrogén-peroxid által kiváltott mitokondriális oxigénfogyasztás-csökkenést. Eredményeink az izatinnak egy eddig nem ismert hatását igazolják, mely új citoprotektív vegyületek kifejlesztésére nyújt lehetőséget. Támogatás: OTKA K73003, K82009, TAMOP-4.2.2-08/1-2008-0019, TAMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, NKTH (Baross program).

#### P4-06

##### **Adenozin mint szabályozó molekula az apoptotikus sejtfelvétel gyulladáscsökkentő hatásában**

KERESZTESI Edina

*DE OEC, Debrecen*

Irodalmi adatokból ismert, hogy a sejtek apoptózissal

történő elhalását nem követi gyulladáshoz vezető válasz. Korábbi kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy az apoptotikus sejteket felvett makrofágok adenozint termelnek olyan koncentrációban, amely képes mind az adenosin A2A és A3 receptorokat aktiválni. Az adenozin egy endogén gyulladáscsökkentő vegyület. Négy receptor altípusa ismert (A1, A2A, A2B, A3), melyek mindegyike G-fehérje kapcsolt. Az A2A Gs receptorhoz kapcsolódva stimulálja az adenilát-cikláz útvonalat, míg az A3 altípus Gi receptorhoz kapcsolódva gátolja azt. Korábbi kísérleteinkben A2A receptor hiányos makrofágokat vizsgálva kimutattuk, hogy az adenilát-cikláz útvonal A2A receptoron keresztüli aktivációja a nitrogén-monoxid termelés gátlásán keresztül gátolja a neutrofilek bevándorlásáért felelős citokinek makrofágok általi kiválasztását. Jelen kísérleteinkben A3 receptor hiányos makrofágokat használva azt találtuk, hogy az adenilát-cikláz útvonal erőteljesebb aktiválódása miatt e folyamat még jelentősebben gátlódik.

#### P4-07

##### A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 biokémiai jellemzése

<sup>1</sup>KOVÁCS László, <sup>2</sup>Bagossi P., <sup>1</sup>Dombrádi V.

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

<sup>2</sup>DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A *Candida albicans* egy opportunistá patogén élesztő, amely immunhiányos betegek esetében életveszélyes fertőzést is okozhat. A *C. albicans* adatbázisban található protein foszfatáz Z1 gén (CaPPZ1) jelentős polimorfizmust mutat, amelynek korábbi munkánk során 4 allélját különítettük el. Homológia modellezéssel kimutattuk, hogy a CaPpz1 fehérje katalitikus doménjének három-dimenziós szerkezete hasonlít a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységéhez. Ez alapján kísérleteink célja az volt, hogy igazoljuk a géntermék (CaPpz1) foszfatáz aktivitását és felderítsük az allélok közötti esetleges különbségeket. Ezért a CaPpz1-et *E. coli*-ban expresszáztattuk, és igazoltuk, hogy a rekombináns fehérje defoszforilálta a p-nitrofenolfoszfatát. Kimutattuk továbbá, hogy a Hal3 fehérje, a *S. cerevisiae* Ppz1 inhibitora, gátolta az enzim működését. Méréseink helyességét bizonyította, hogy az aktív centrumban létrehozott R262L pontmutációval meg tudtuk szüntetni az enzim aktivitást. Az allélspecifikus polimorfizmusok hatását *in vitro* mutagenézissel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az aktív centrum közelében lévő D261N mutáció csak kis mértékben csökkentette, míg a fehérje felszínén lévő G333E csere nem várt módon duplájára növelte a foszfatáz aktivitását. A  $\beta$ -redők központjában található C337R csere, illetve a G333E/C337R kettős mutáció inaktíválta az enzimet. Ez arra utal, hogy a C333 fontos a fehérje szerkezetének stabilizálásában. Kísérleti eredményeink szerint a CaPPZ1 gén terméke a *S. cerevisiae* Ppz1 fehérjéhez hasonló foszfatáz aktivitással rendelkezik, és az enzim egyes izoformái egymástól eltérő aktivitást mutathatnak. Munkánkat az OTKA 68765 és a TÁMOP 4.2.1/B-09/

KONV-2010-0007 pályázat támogatta.

#### P4-08

##### A töltött oldalláncok szerepe a $\beta$ 2-mikroglobulin amiloidképzésében

<sup>1</sup>MÁRIALIGETI Borbála, <sup>1</sup>Sebők J., <sup>1</sup>Pál-Gábor H., <sup>1</sup>Micsónai A., <sup>2</sup>Gyimesi G., <sup>1</sup>Kardos J.

<sup>1</sup>ELTE, Biokémiai Tanszék, Biológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup>SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A fehérjék kóros aggregációjához és amiloid formában történő lerakódásához köthető számos degeneratív megbetegedés, mint például az Alzheimer- és Parkinson kór. Jelen munkánkban a vesedialízishez kötődő amiloidózisért felelős  $\beta$ 2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) fehérje amiloidképzését vizsgáltuk. A  $\beta$ 2m a magvas sejtek felszínén található MHC-I könnyű lánc, és a vérben monomer formában is megtalálható. Célunk a  $\beta$ 2m felszíni töltéseinek a natív molekula stabilitásában és az aggregációban betöltött szerepének felderítése. A  $\beta$ 2m polimerizációját *in vitro* vizsgáltuk. Alacsony pH-n a fehérje denaturálódik és fokozott aggregációs hajlomot mutat, amely a savas oldalláncok protonálódásával magyarázható. A  $\beta$ 2m szerkezetét vizsgálva olyan felszíni töltésklasztereket azonosítottunk, melyek neutrális pH-n a szerkezetet stabilizálják, míg savas pH-n szétesésük indukálhatja a polimerizációt. Töltésmutánsokat állítottunk elő, melyek szerkezeti tulajdonságait CD spektroszkópiával, az aggregáció kinetikáját pedig Thioflavin T fluoreszcenciával vizsgáltuk. Az Asp38Ala és Asp76Ala mutánsok hőstabilitása jelentősen csökkent, a szájképzés kezdeti sebessége nőtt. A semleges pH-n történő amiloidképzéshez adalékanyagok jelenlétére van szükség. Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a lizofoszfatidsav (LPA) aggregációt indukál, és növeli a kialakult szálok stabilitását. Az LPA feltételezett kötőhelyét *in silico* dokkolással határoztuk meg és mutánsok készítésével igazoltuk. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy egyes, a natív szerkezet stabilitására közvetlenül nem ható felszíni töltött aminosavaknak kiemelkedő szerepe lehet a  $\beta$ 2m amiloidképzésének mechanizmusában.

#### P4-09

##### A hepcidin és az alfa-1 savas glikoprotein kapcsolata

<sup>1</sup>POÓR Viktor Soma, <sup>1</sup>Pandur E., <sup>1</sup>Rácz E., <sup>2</sup>Miseta A., <sup>1</sup>Sipos K.

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Igazságügyi Orvostani Intézet, Pécs;

<sup>2</sup>PTE ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs

A hepcidin egy főként a májban szintetizálódó hormon, mely a vasanyagcsere fő szabályozója. Míg a hepcidin transzkripciót befolyásoló tényező közül számosat leírtak már számos tényező befolyásolja (gyulladásos folyamatok, anémia, hipoxia), addig a posztranszlációs módosulások szabályozásáról kevés a rendelkezésünkre álló ismeret. Korábbi Kutatásaink során a hepcidin fehérje-fehérje interakcióinak feltérképezését végeztük. Előző kísérleteink



azt mutatták, hogy a hepcidin peptid több más fehérje mellett az alfa-1 savas glikoproteinhez is kapcsolódik. Feladatunk tűztük ki, hogy ezt a kötődést igazoljuk, valamint az interakció szabályozásának részleteit felderítsük az alábbi kísérletsorozatban. A két fehérje kötődését mind *in vitro*, mind *in vivo* (sejtkultúrában) sikerült bizonyítanunk. Az mRNS szinteket vizsgálva a hepcidin expresszióval azonos módon változott az alfa-1 savas glikoprotein expressziója is. Igazoltuk a két protein kötődését a szérumban is. Továbbá vizsgáltuk a hepcidin promóter régiójának aktivitás változását alfa-1 savas glikoprotein overexpresszió hatására májsejt kultúrában. Az alfa-1 savas glikoprotein már évtizedek óta ismert és kutatott plazma fehérje, biológiai szerepéről mégis kevés információ áll rendelkezésünkre. A hepcidinhez hasonlóan az alfa-1 savas glikoprotein is az akut fázis fehérjék közé tartozik, szintje jelentősen megemelkedik fertőzés esetén. Gyógyszer hatóanyag-kötő képessége miatt intenzív kutatások tárgya, friss irodalmi adatok alapján egyes fehérjék esetében chaperon funkciókat lát el. Mivel a hepcidin egy szokatlan szerkezetű, négy diszulfid kötést hordozó peptid, felmerül a lehetősége annak, hogy az ASG a hepcidin vonatkozásában is az utóbbi szerepet tölti be. Ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

#### P4-10

##### **Thymus atrófia új modellje: cuprizone indukálta caspase-függő T sejt és thymus epithelsejt apoptózis**

<sup>1</sup>SOLTI Izabella, <sup>1</sup>Vető S., <sup>2</sup>Bánáti M., <sup>1</sup>Molnár E., <sup>3</sup>Talabér G., <sup>3</sup>Kvell K., <sup>4</sup>Seress L., <sup>1</sup>Ifj. Gallyas F., <sup>2</sup>Illés Zs.

<sup>1</sup>PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>PTE KK, Neurológiai Klinika, Pécs; <sup>3</sup>PTE ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs; <sup>4</sup>PTE ÁOK, Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium, Pécs

A cuprizone kiváltotta degeneratív demielinizációs modellben a myelin pusztulás helyén mind a T sejt szám, mind a T sejt aktiváció elhanyagolható. Cuprizone adása mérsékli a kísérletesen kiváltott autoimmun gyulladást és megváltoztatja a perifériás T sejt választ. A jelenségek hátterében azonban nem ismert a thymus érintettsége, ezért célunk a cuprizone hatásra a thymusban bekövetkező változások vizsgálata volt. Kísérleteink során 4 hetes egereket kezeltünk p.o. cuprizone-nal 3 napig, illetve 1 hétig. Egy hét kezelés után a thymus jelentős atrófiáját észleltük tömegének és abszolút sejtszámának kifejezett csökkenésével. Mind flow cytometriás, mind elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a thymocyták és thymus epithel sejtek (TEC) apoptózisát figyeltük meg, már 3 nap kezelés után megamitokondriumok megjelenését mutattuk ki. Immunhisztokémiával mind a kortikális, mind a medulláris TEC megfogyatkozását, a thymus struktúrájának megbomlását, illetve a cellularitás általános csökkenését mellett elsősorban a kortexben található CD4 és CD8 kettős pozitív thymocyták el-

tűnését tapasztaltuk. Flow cytometriás mérések a T és TEC sejtek arányát megtartottnak mutatták, azonban a T sejtek közül a CD4, CD8 kettős pozitív, CD low éretlen sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent a többi thymocytá populációhoz képest. Kvantitatív PCR analízissel a TEC által kifejezett MHCII, és az AIRE transzkripció faktor expressziójának csökkenését találtuk. Immunoblot módszerrel már 3 nap cuprizone kezelés után fokozott procaspase-3 hasítást figyeltünk meg. Kimutattuk, hogy már egy hét cuprizone kezelés súlyos thymus atrófiát váltott ki, ahol a thymocyták és a TEC caspase-függő apoptózissal pusztultak el, a legérzékenyebbek a CD4, CD8 kettős pozitív, CD3low thymocyták voltak. Eredményeink hozzájárulnak a cuprizone modell jobb megértéséhez, másfelől elképzelhetővé teszik a jövőben az akut thymus involúció és az azt kísérő károsodott perifériás immunválasz új állatmodelljeként történő alkalmazását is.

#### P4-11

##### **Coeliákia rizikófaktorú endotélsejtek primer életteni defektusai**

<sup>1</sup>TÓTH Boglárka, <sup>1</sup>Simon-Vecsei Zs., <sup>1</sup>Király R., <sup>2</sup>Gyimesi J., <sup>2</sup>Nemes É., <sup>3</sup>Lindfors K., <sup>3</sup>Mäki M., <sup>1</sup>Fésüs L., <sup>2</sup>Korponay-Szabó I.R.

<sup>1</sup>DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen; <sup>2</sup>DE OEC, Gyermekklinika, Debrecen; <sup>3</sup>University of Tampere, Paediatric Research Centre, Finland

A coeliákia komplex genetikai hátterű autoimmun kórkép, a HLA-DQ2 vagy -DQ8-allél jelenléte szükséges, de nem elégséges feltétele a betegség kialakulásának, viszont nem-HLA-jellegű, a tünetek létrejöttében szerepet játszó egyéb gének még felfedezésre várnak. A coeliákia örökölhető, 20-40%-ban fordul elő az utódokban, 10%-os gyakorisággal a rokonság körében. A betegség egyik legfontosabb tünete a villus atrófia, melyet a gliadin-specifikus T-limfociták, a szöveti transzglutamináz (TG2)-ellenes antitestek és a gyulladási folyamatok együttesen alakítanak ki. Munkánk során coeliákiás családok újszülöttjeinél HLA-DQ tipizálást végeztünk és köldökzsinórból endotélsejteket (human umbilical venule endothel cells, HUVEC) izoláltunk, majd ezeket prospektív módon, az antigén-inger előtt vizsgáltuk sejtszintű eltérések keresésére. Az újszülöttek 77%-a hordozza a HLA-DQ2 és/vagy DQ8-allélt. Eddig 4 olyan sejtvonalat találtunk (ezekből 3 esetben mindkét szülő coeliákiás, illetve homozigóta), mely lassabban növekszik, és eltérő morfológiát mutat a normál sejtekkel összehasonlítva, illetve csökkent a migrációs képessége is (12-52%). Néhány sejtvonal esetén szintén találtunk kisebb mértékű eltéréseket („intermediér” fenotípus). Egyes sejtvonalak a vizsgált sejtparaméterekben jelentős eltéréseket mutattak, melyek nem minden esetben álltak arányban a DQ2 hordozásból eredő genetikai kockázattal. Ez non-HLA kockázati tényezők jelenlétét támasztja alá. Ennek jelentőségét a továbbiakban prospektív módon a betegség későbbi kialakulása szempontjából vizsgáljuk. Az eredmé-

nyek indokolják további mérések elvégzését olyan kísérleti rendszerekben, ahol coeliákias betegekből származó antitestek is jelen vannak, illetve a Ras proteincsalád tagjai és interakciós partnereik körében is tervezünk genetikai és fehérje-expressziós vizsgálatokat.

#### **P4-12**

##### **Az LPS/TLR4-indukált TRAF6 jelátviteli út funkcionális gátlása rezverattal**

Jakus P.B., Kálmán N., Antus Cs., Sümegi B., VERES Balázs

*PTE ÁOK, Biokémia és Orvosi Kémia, Pécs*

A toll-like receptorok (TLR) fontos szerepet játszanak a patogén asszociált molekuláris mintázat felismerésében. A TLR4 ligandja a Gram negatív baktériumok sejtfalában található lipopoliszcharid (LPS). Az LPS-TLR4 kötődés két útvonalat aktivál, melyek az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor aktivációját idézik elő. A TRAF6 egy ubiquitin ligáz adaptor fehérje, ami ubiquitináció révén aktiválódik és képes a jelátviteli folyamatban alatta elhelyezkedő TAK1, IKK illetve a p38 és JNK MAP kinázok aktiválására. A rezverattal számos gyümölcsben megtalálható polifenol, melynek gyulladáscsökkentő hatását ismerjük. Makrofágokban csökkenti a reaktív oxigén

és nitrogén gyökök termelődését, ugyanakkor különböző gyulladásos jelátviteli útvonalakra is hatással van. A rezverattal gátolja az NF- $\kappa$ B aktivációt és a molekuláris célpontok közül néhányat már sikerült azonosítani: a rezverattal az IKK gátlása mellett az MyD88 független útvonalat is gátolja a TRIF komplexen keresztül. Habár a TRAF6 kulcsszerepet játszik a TLR4 és az NF- $\kappa$ B közötti jelátvitelben, szerepe a rezverattal gyulladáscsökkentő hatásában még nem tisztázott. Munkánkban a rezverattal TRAF6-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk LPS-indukált RAW 264.7 makrofág sejteken. Eredményeink azt mutatják, hogy a rezverattal az általunk vizsgált időpontokban gátolta az LPS hatására bekövetkező TRAF6 mRNS és fehérje expressziót illetve a fehérje ubiquitinációját is. Mivel a TLR4-TRAF6 útvonal képes szelektíven aktiválni a MAP kinázokat, megvizsgáltuk ezen kinázok foszforilációját is. Míg a TRAF6-független Erk aktivációját nem, addig a TRAF6-függő p38 és JNK LPS okozta aktivációját csökkentette a rezverattal kezelés. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a rezverattal gyulladáscsökkentő hatásában a TRAF6 fontos szerepet játszik és ezen adaptor fehérje gátlásán keresztül a rezverattal képes a gyulladásos jelátviteli folyamatok mediálására.

## **P5 - Genomika és génműködés szabályozása**

#### **P5-01**

##### **A SMRT/NCoR korepresszor komplexet felépítő fehérjék kifejeződésének vizsgálata a neuronális differenciáció során**

BEREGI Tímea, Czimmerer Zs., Simándi Z., Nagy L.

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

Ligand aktiválta magreceptorok központi szerepet játszanak az embrionális fejlődés illetve szöveti differenciáció különböző folyamataiban, így zsírsejtek (PPAR $\gamma$ ), és neuronok (RAR $\alpha$ ) differenciálódásának szabályozásában. Ezen magreceptorok RXR-rel heterodimert képezve kapcsolódnak a DNS-en található válaszadó elemeikhez, ligandkötés nélkül korepresszor fehérjéket kötve gátolják célgénjeik átíródását. Magreceptorokhoz kapcsolódó korepresszor komplex a SMRT/NCoR komplex, melynek főbb elemei SMRT/NCoR, GPS2, TBL1/TBRL1 és HDAC3 fehérjék. A komplex magreceptorokkal történő kölcsönhatásáért a SMRT/NCoR fehérjék felelősek. Korepresszor komplex génkifejeződésre gyakorolt gátló hatását a hisztonfehérjék megfelelő lizin oldalláncairól történő acetil csoportok eltávolításával, ezáltal a kromatin kondenzált állapotának fenntartásával éri el, melyben kulcsszerepet játszik a HDAC3. A komplex jelentőségét a génkifejeződés szabályozásában a SMRT illetve NCoR knockout egerek embrionális fejlődése során fellépő, többek közt a neuronális

differenciálódást is érintő, letális fejlődési zavarok mutatják. Munkánk során a SMRT/NCoR komplex egyes tagjainak kifejeződését térképeztük fel RNS és fehérje szinten az egér embrionális őssejtből és p19 egér embrionális karcinóma sejtekből történő neuronális differenciáció során. Eredményeink azt mutatják, hogy a SMRT/NCoR, GPS2, TBL1/TBRL1, és HDAC3 kifejeződése RNS szinten egyaránt indukálódott az általunk használt neuronális differenciálódást modellező rendszerekben. SMRT-ot fehérje szinten tovább vizsgálva szintén megfigyelhető volt a magasabb szintű kifejeződés a differenciálódott neuronokban a kiindulási sejtekhez képest. A jövőben fel szeretnénk térképezni a komplex további felépítő tagjainak fehérje szintű kifejeződését az általunk használt modell rendszerekben, valamint vizsgálni kívánjuk a komplex neuronális differenciációban betöltött szerepét az egyes tagokra specifikus knockdown egér embrionális őssejt és p19 sejtvonalak létrehozása után.

#### **P5-02**

##### **Az ATAC hiszton acetiltransferáz komplex szteroidkonverzióban szerepet játszó génekre kifejtett hatásának vizsgálata**

BORSOS Barbara Nikolett, Kovács D., Boros I.M. *SZTE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged*

Az Sf-1 (szteroidogénikus faktor 1) fontos szerepet játszik a szteroidhormonokat szintetizáló sejtek

génexpressziójában és az adrenogonadalis fejlődés során. Az Sf-1 Drosophila homológja az ftz-f1 transzkripció faktor, mely a sejtmagi receptorok családjába tartozik. Transzkripció aktivitása különböző poszttranszlációs módosításokkal szabályozható. A Ser203-on történő foszforiláció és a GCN5 illetve a p300 általi acetiláció az Sf-1 funkcióját erősíti. Az Sf-1 számos szövetben expresszálódik, így a mellékvesekéregben, herében, a petefészekben, az agyalapi mirigyben, a ventromediális hipotalamuszban, a bőrben és a lépben is. Az Sf-1 transzkripció faktor mutációja, hiánya vagy egyes esetekben a túltermelődése tumorok kialakulásához vezethet. Korábbi megfigyelésünk, hogy az ATAC hiszton acetiltranszferáz komplex funkció vesztese Drosophila-ban a szteroid szintézist befolyásolja. Ebből adódóan elsődleges kérdésfeltevésünk, hogy az ATAC komplex hogyan befolyásolja a szteroid hormonok bioszintézisét. Erre két lehetséges magyarázat van: az egyik, hogy a szteroid hormonok bioszintézisében résztvevő gének transzkripcióját hiszton acetilációval módosítja, a másik, hogy ezeknek a géneknek a transzkripcióját szabályozó FTZ-F1-et/SF1-et acetilálja. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy a Drosophila szteroid hormonjainak szintézisében részt vevő gének (Halloween gének) expressziója acetilációtól függ-e, a hiszton oldalláncon hiperacetilációját kiváltó hiszton deacetyláz inhibitorral (TSA-val) kezeltünk Drosophila S2 sejteket. A kezelés hatására a Halloween gének expressziója megnövekedett, jelezve, hogy a Drosophila szteroidkonverziójában részt vevő gének működése acetilációtól függ. Kimutattuk, hogy az FTZ-F1 TSA kezelés hatására stabilizálódik. Továbbá, hogy az ftz-f1 overexpressziója Drosophila embrionális S2 sejtvonalban a Halloween gének expressziójának emelkedését eredményezi. A továbbiakban vizsgáljuk, hogy kimutatható-e az ATAC komplex jelenléte a Halloween gének promóterén.

#### P5-03

##### **A genomredukció hatása az Escherichia coli baktérium energiahasznosítására**

DRASKOVITS Gábor, Pósfai Gy., Fehér T.  
MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A szintetikus biológiai kutatások egyik fő célja, hogy élő sejtek egyszerűsítésével és optimalizálásával egy átláthatóbb felépítésű, tervezhetően működő biológiai entitást hozzon létre. Egy ilyen organizmus kiváló modellként szolgálhat az alap-kutatásban és ígéretes szereplője lehet a közeljövő biotechnológiai iparának. Az egyszerűsítés egyik formája lehet a standard körülmények között szükségtelen gének eltávolítása. Laboratóriumunkban az Escherichia coli baktérium genomredukciója zajlik, ezáltal annak genomja eredeti méretének kevesebb, mint 80%-ára csökkent. Egy esetleges ipari alkalmazás esetén igen releváns információ a sejtek energiafelhasználási hatékonysága. A „maintenance energy” azt az energiamennyiséget jelenti, ami a sejtek életben maradásához, biokémiai apparátusuk működtetéséhez szükséges, de a

növekedéshez, sejtosztódáshoz már nem elegendő. Az feltételeztük, hogy a redukált genomú törzseket kisebb „maintenance energy” jellemzi, köszönhetően célirányosabb működésüknek. Egy kisméretű kemosztátot használva, állandó osztódásban lévő baktériumkultúrák biomassza-termékumának mérésére révén megállapítottuk a „maintenance energy” értékét többféle E. coli törzs esetében. Az összehasonlításban a vad típusú K-12 MG1655 általános laboratóriumi törzs mellett az MDS12, MDS42 és MDS69 redukált genomú törzsek szerepeltek, melyek genomja rendre 8, 14, illetve 20%-kal csökkent. Várakozásainktól eltérően, az MDS12 nem mutatott eltérést a vad típushoz képest, míg az MDS42 és MDS69 esetén jelentős „maintenance energy” növekedést tapasztaltunk. Az utóbbi két törzsnél a biomassza hozam is alulmaradt a vad típuséhoz képest. Munkánk további részében a tapasztalt változások hátterében álló genetikai faktorkon azonosítását tűztük ki célul.

#### P5-04

##### **A protein foszfatáz 2A B” alegysége kölcsönhatásba lép a rizs retinoblasztóma-szerű fehérjével**

<sup>1</sup>FARKAS Ilona, <sup>2</sup>Ábrahám E., <sup>2</sup>Yu P., <sup>1</sup>Dombrádi V., <sup>2</sup>Dudits D., <sup>2</sup>Horváth V. G.

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

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

Magasabbrendű eukariótákban a retinoblasztóma fehérje és homológjainak foszforilációs szintje az Rb/E2F jelátviteli láncon keresztül kulcsszerepet játszik a sejtosztódás G1-S fázisátmenetének szabályozásában. Emlősökben a retinoblasztóma fehérjét ciklin-függő kináz komplexek foszforilálják, defoszforilációjukat pedig a protein foszfatáz 1 (PP1) és 2A (PP2A) katalizálja. A növényekben is megtalálhatók az Rb/E2F jelátviteli útvonal elemei, de nem ismertek a retinoblasztóma-szerű fehérjéket defoszforiláló foszfatázok. Oryza sativában két retinoblasztóma-szerű fehérje található, az OsRBR1 és OsRBR2. A lucerna PP2A B” regulátor alegysége és az OsRBR1 élesztő kéthibrid rendszerben talált kölcsönhatása alapján tanulmányozni kezdtük a rizs PP2A B” lehetséges szerepét az OsRBR fehérjék defoszforilációjában. Baktériumban expresszált hexahisztidin-fúziós rizs PP2A B” ellen nyúlban poliklonális antitestet termeltettünk, amellyel rizs szuszpenziós sejtek kivonatából aktív formában immunprecipitáltuk a PP2A holoenzimet. Az immunprecipitált PP2A defoszforilálta a ciklinfüggő (PSTAIRE) kináz komplexszel gamma-32P-ATP jelenlétében foszforilált OsRBR1 és OsRBR2 C-terminális peptidokat. Az Rb egyik foszfo-szerin oldallánca specifikus antitest, valamint OsRBR1 ellenanyag segítségével igazoltuk, hogy a pull down módszerrel izolált PP2A-nak a teljes hosszúságú foszfo-OsRBR1 is szubsztrátja. Glutathion-S-transferáz (GST) fúziós PP2A B” segítségével rizs szuszpenziós sejt kivonatból pull down kísérlettel izolálni tudtuk nemcsak a PP2A katalitikus alegységét, hanem az OsRBR1-et is. Kimutattuk, hogy

a hexahisztidin-fúziós OsRBR fehérjék asszociálódnak a GST-PP2A B"-vel. A fentiek alapján a PP2A szabályozhatja a rizs retinoblasztóma-szerű fehérje (fehérjék) foszforilációs állapotát, és működésében fontos szerepe lehet a B" regulátor alegységnek. Munkánkat az OTKA NK-69227 pályázata támogatta.

#### P5-05

##### **A dtl gén *Drosophila melanogaster* oogenezisében betöltött szerepének vizsgálata**

GRÉZAL Gábor, Villányi Z., Boros I.M.  
*SZTE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged*

A *Drosophila melanogaster* és közeli rokon fajok kromoszómáinak végét, az eukariótákra általában nem jellemző módon, retrotranszpozon elemek sorozata építi fel. A telomeráz elvesztésével párhuzamosan új gének jelentek meg, melynek termékei részt vesznek a telomer fenntartásában, hiányukban a kromoszómavégeket DNS sérülésként érzékeli a sejt. A hibajavító rendszer működése kromoszómafúziók kialakulását eredményezi, melynek végzetes következményei vannak. A csoportunk által azonosított dtl gén szerepet játszik a kromoszóma végi struktúra fenntartásában. Az eukarióták között kivételnek számító, két ORF-el rendelkező dtl génről egy mRNS íródik át. Az upstream irányban elhelyezkedő ORF a DTL (*Drosophila* Tat-like) fehérjét kódolja, melynek hiánya kromoszómafúziót okoz. A második ORF-ről átíródó TGS1 (Trimethylguanosine synthase 1) fehérje funkciója a Trimetilguanozin-cap struktúra kialakítása az sn- és snoRNS-ek 5' végén. A dtl deléciós állatokon végzett menekítési kísérletek alapján elmondható, hogy míg a DTL fehérje hiánya a kromoszómafúziók kialakulása miatt okoz letalitást a báb-és a kelés fázisában, addig a TGS1 fehérje hiánya az aberráns RNS érés miatt végzetes a vándorló lárva/bábozódás stádiumában. Transzgén formájában külön-külön visszajuttatott ORF1-et és ORF2-et kódoló szakaszok meglepő eredménnyel szolgáltattak: bár az F1 generáció egyedei életképesek voltak, a nőstényeknél sterilitás volt megfigyelhető. A peték ventralizációs fenotípust mutatnak, a dajkasejtek sejtmagjai rendezetlen, lebenyes szerkezetet vesznek fel, a TMG-cap-el rendelkező RNS-ek jellegzetes, gömb alakú struktúrákba rendeződnek a sejtmagban. Az eredmények arra utalnak, hogy a dtl fehérjeterméke(i) alapvető fontosságúak az oogenezisben, és bicisztronikus kódolásuk fontos biológiai jelentőséggel bír.

#### P5-06

##### **A *Drosophila* CG9238 gén funkcionális vizsgálata**

<sup>1</sup>KEREKES Éva, <sup>2</sup>Pop F., <sup>2</sup>Ádám G., <sup>2</sup>Gausz J., <sup>3</sup>Friedrich P., <sup>1</sup>Dombrádi V., <sup>1</sup>Kókai E.

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

<sup>2</sup>MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged; <sup>3</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Budapest

A *Drosophila* genomban azonosítottuk a CG9238 jelű gént, az általa kódolt fehérje elsődleges szerkezete hasonlóságot mutat egy emlősökben előforduló glikogénkötő alegységgel (R5). Az R5 a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységnek (PP1c) egyik regulátor fehérjéje, a holoenzim az emlős glikogén metabolizmusban játszik szerepet. A szerkezeti jóslat szerint a *Drosophila* R5h két konzervált domént tartalmaz: egy glikogénkötő-, és egy PP1c kötő motívumot. A fehérje glikogénkötő képességét szedimentációs kísérlettel igazoltuk. Élesztő két-hibrid módszerrel bizonyítottuk, hogy az R5h képes kölcsönhatást kialakítani az összes *Drosophila* PP1c izoformával. Az R5h további jellemzése céljából rekombináns GST-R5h fehérjét hoztunk létre bakteriális expresszióval. A GST-R5h csökkentette a PP1c aktivitását mind foszforiláz a mind miozin könnyűlánc szubsztrát alkalmazásával. A rekombináns fehérjét poliklonális szérum előállítására használtuk még fel. Az R5h-ot kódoló gén szerkezete alapján két mRNS íródhat át róla, viszont a két lehetséges mRNS közül csak a rövidebbet tudtuk kimutatni RT-PCR kísérlettel, embriókban és kifejlett nőstényekben. Az R5h elleni antitest segítségével viszont a fehérjét felnőtt hím és nőstény *Drosophila*-ban tudtuk kimutatni, valamint immunfestés alkalmazásával az oocytá granulumaiban is megtaláltuk. A gén funkciójának meghatározására felhasználtunk egy P-elemt hordozó törzset, amelyből transzpozázal mobilizáltuk a P-elemt. A 10816/81 jelű törzsből 2kb-os deléció jött létre a CG9238 génben, melynek pozícióját szekvenálással, méretét PCR segítségével határoztuk meg. A gén sérülése ellenére kis mennyiségű mRNS mégis kimutatható RT-PCR kísérlettel, valamint az R5h fehérje is megtalálható a mutáns nőstényekben. Különbséget a vad típusú és a hipomorf mutáns törzsek között az oocyták tartaléktápanyagának, a yolk fehérjének az eloszlásában tapasztaltunk. Munkánkat az OTKA 060723 számú pályázata támogatta. Kókai Endre Bolyai János Kutatási Ösztöndíjban részesült.

#### P5-07

##### **Az USP5 és az apoptózis kapcsolata *Drosophila melanogaster* ben**

<sup>1</sup>KOVÁCS Levente, <sup>1</sup>Nagy O., <sup>1</sup>Pál M., <sup>2</sup>Popescu O., <sup>1</sup>Deák P.

<sup>1</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; <sup>2</sup>BBTE, Bio-Nano Interdiszciplináris Kutatóközpont, Molekuláris Biológiai Intézet, Romania

Az ubikvitiláció a fehérjék ubikvitinekkal történő poszttranszlatív módosítása. E folyamat mechanizmusa és funkciója behatóan ismert a génexpresszió, a fehérjelebonthatás és a különböző jelátviteli utak szabályozásában. Ezzel ellentétes folyamat a dezubikvitiláció, amelyet a dezubikvitiláló enzimek (DUB-ok) katalizálnak. Ezek az enzimek eltávolítják az ubikvitin szignált a módosított fehérjékről, ám e folyamat részleteiről és funkciójáról kevés információ áll rendelkezésre. Kutatócsoportunk célja a dezubikvitiláló enzimeket kódoló gének azonosítása és szerepük tisztázása a *Drosophila melanogaster*

modellorganizmusban. Ezeket az evolúciósan konzervált szerkezetű enzimeket bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk. A homológia szűrés alapján megállapítottuk, hogy 40 *Drosophila* fehérje nagymértékű szekvencia homológiát mutat ismert élesztő és humán DUB-okkal. A mutáns és géncsendesített vonalak fenotípusának elemzése arra utal, hogy a DUB-ok közül 24 nélkülözhetetlen a *Drosophila* egyedfejlődéséhez. Ezek az eredmények a potenciális DUB gének további funkcionális vizsgálatát ösztönözhetik ebben a modellorganizmusban. A CG12082 *Drosophila* DUB gén nagymértékű szekvencia homológiát mutat a humán Usp5-el és az élesztő Ubp14-el. E gén csendesítése az állatok pusztulását okozza bábállapotban. A hipomorf mutáns lárvák agyából készített mikroszkópi preparátumokban jelentősen megemelkedett az apoptotikus sejtek száma. A null mutánsok lárvastádiumban elpusztulnak, felhalmozódnak bennük a poliubikvitin láncok, erős az apoptotikus fenotípusuk és az agyukban megemelkedik a p53, a reaper és a hid apoptotikus marker gének expressziója. Az Ubp6 gén expressziója is megemelkedik, ami az ubikvitin stresszválasz indukciójára utal. Az élesztő UBP14 és a *Drosophila* USP5 fehérje közötti funkcionális homológiát heterológ komplementációs kísérlettel igazoltuk. Kísérleteink alapján az CG12082 gén az *Drosophila* USP5 enzimet kódolja és szerepet játszik az apoptózis szabályozásában.

#### P5-08

##### **Az anafázis promoting komplex (APC/C) katalitikus alkompexe *Drosophila melanogaster*-ben**

<sup>1</sup>NAGY Olga, <sup>1</sup>Pál M., <sup>1</sup>Udvardy A., <sup>1</sup>Boros I.M.,  
<sup>2</sup>Shirras A.D.

<sup>1</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged; <sup>2</sup>Lancaster University, Lancaster, Department of Biological Sciences, UK

Az eukarióta sejtek osztódási folyamatainak szabályozásában kulcsszerepe van az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszernek. Ennek központi eleme az anafázis promoting komplexnek, vagy APC/C-nek nevezett nagy, ubikvitin-protein ligáz, amely poliubikvitin láncok kialakulását katalizálja mitotikus szabályozó fehérjéken. APC/C szerkezetét alkotó legfontosabb alegységeket sikerült azonosítani több fajban is, az egyes alegységek szerepéről azonban keveset tudunk. *Drosophila melanogaster*-ben izoláltuk és jellemeztük a lemming (lmg) gén alléljeit. A lmg mutánsok jellegzetes fejlődési rendellenességeket mutatnak. A homozigóta lárvák agyából készített preparátumok citológiai vizsgálata során túlkondenzálódott kromoszómákat, magas mitotikus indexet és metafázis – anafázis arányt, valamint nagyszámú aneuploid és poliploid sejteket figyeltünk meg. Ezek a sejtosztódás metafázis-szerű gátlására utalnak. A lmg gén szekvenciájának vizsgálata alapján egy ~2.0 kb-os transzkriptet kódol, amely két ORF-et tartalmaz tandem elrendezésben. Az 5'-végi ORF1 egy 10 kDa-os, RING-finger motívumot tartalmazó polipeptidet kódol, amely

80% feletti homológiát mutat a humán APC/C Apc11 alegységével. A 3'-végi ORF2 transzlációs terméke nem tartalmaz ismert fehérje doméneket. Genetikai komplementációs kísérletekben kimutattuk, hogy a lmg mutánsok mitotikus fenotípusának kialakulásáért kizárólag az ORF1 hiánya felelős, a ORF2 pedig nem esszenicális. Ugyancsak az ORF1 expressziója képes komplementálni a sarjadzó élesztő APC11-myc9 hőérzékeny mutáns letális és mitotikus fenotípusát. Az ORF1 által kódolt fehérje genetikai és fizikai interakciót mutat az Apc2/Mr alegységgel, valamint egy ismert E2 enzimmel, a Viharral, és egy újonnan azonosított E2-vel, amely nagyfokú homológiát mutat a humán Ube2S-el. Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy a lmg gén az Apc11 alegységet kódolja, amely az Apc2/Mr-vel, Viharral és DmUbe2S-el együtt az APC/C katalitikus alkompexét alkotják *Drosophila melanogaster*-ben.

#### P5-09

##### **A TAF10 szerepe *Drosophila melanogaster*-ben**

PÁHI Zoltán Gábor, Pankotai T., Boros I.M.

SZTE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A TAF-ok (TBP associated factor) a transzkripció iniciációs komplex kialakításában szerepet játszó, tíznél több tagból álló fehérjék csoportja. Egyes TAF fehérjék a TFIID alap transzkripció komplexen kívül a kromatin módosításában résztvevő fehérje komplexekben is előfordulnak. Ez felveti szerepüket a transzkripció kezdés két fontos lépésének összehangolásában. A *Drosophila*-ban található két GCN5 hiszton acetiltransferáz (HAT) tartalmú kromatin módosító komplexek közül a dSAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetil transferáz komplex) tartalmazza a TAF10 fehérjét, az dATAC (Ada2a-t tartalmazó komplex) azonban nem. Ennek ellenére mutáns állatok transzkriptóm analízise azt mutatja, hogy a TAF10 és az ATAC komplex alegységeinek (ADA2a, ADA3) hiánya azonos génműködés változásokat eredményez. Az adatok szerint tehát az ATAC komplex vagy közvetlenül szabályozza a TAF10 működését vagy közvetve, valamelyik TAF10-et tartalmazó komplexen keresztül. Ennek tisztázására célul tűztük ki az ATAC hiszton acetiltransferáz komplex, valamint a TAF10 közötti kölcsönhatás vizsgálatát. ATAC mutánsokban az állatok az ekdizon hormon hiánya miatt késői L3-as stádiumban elpusztulnak. Ebben a fejlődési stádiumban az ekdizon szintézis a gyűrűmirigyben történik. A TAF10 expresszióját a gyűrűmirigyben lecsökkentve, az ATAC mutánsokban megfigyelhető hasonló, késői L3 letalitást okoz. Hasonló fenotípust eredményez a TFIID komplex másik két alegységének a TAF5 és a TAF8 fehérjéknek az expresszió csökkenése a gyűrűmirigyben. Ezek alapján feltételezzük, hogy az ATAC komplex működése szorosan kapcsolódik a TFIID, vagy egy hasonló, a TAF10-TAF5-TAF8 fehérjéket tartalmazó komplex működéséhez.

## P5-10

### **A BMP2-t konstansan expresszáló vektorral stabilan transzfektált C3H10T, egér mesenchimalis sejtvonal high density kultúráiban zajló sejtdifferenciáció vizsgálata**

TAKÁCS Roland Ádám, Matta Cs., Papp Á., Juhász T., Katona É., Somogyi Cs., Zákány R.  
*DE OEC, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, Debrecen*

Korábbi kísérleteink alapján tudjuk, hogy a C3H10T, egér mesenchimalis eredetű sejtvonalból előállított high density (HD) kultúrák BMP4 hozzáadásának hatására porccá differenciálódnak. Másik porcdifferenciálódási modellünkön nyert eredményeink szerint az eddig elsősorban ingerlékeny sejtek jelátviteli folyamataiban leírt NMDA-receptorok fontos szereplői a porcképződés szabályozásának. Bemutítani kívánt vizsgálataink során a BMP2-t konstansan expresszáló vektorral transzfektált C3H10T sejtvonal HD-kultúráinak porcdifferenciációs folyamatát, illetve azok esetleges egyéb irányú differenciációs potenciálját analizáltuk, valamint az NMDA-receptoralegységek kimutatását és azok porcképződésre gyakorolt hatásainak tanulmányozását tűztük ki célul. Kísérleteink során a porcosodó HD-kultúrák

előállítására alkalmazott sejtenyésztési eljárásainkat alkalmaztuk. A génexpressziós vizsgálatainkat RT-PCR reakció segítségével végeztük, a porcképződést savas dimetil-metilénkéssel végzett festéssel, a metakromázia megfigyelésével követtük nyomon. A HD-kultúrák 9. tenyésztési napról származó mintái esetében már jelentős mennyiségű metakromáziás porcmátrixot sikerült detektálnunk. A chondrogenesis markereinek tekintett aggregán tengelyfehérje, II. típusú kollagén és Sox9 transzkripciós faktor kifejeződése alátámasztja a porcképződés tényét. Ugyanakkor itt a primer kondrogenikus sejtekből álló csirke HD-kultúrákban tapasztaltaknál lényegesen lassabb a differenciáció és a matrix kialakulásában megfigyelhető egy ortokromáziás kezdeti fázis, ami hialuronsav megjelenésére utal. Az RT-PCR kísérletek több NMDA-receptoralegység esetében is pozitív eredménnyel szolgáltak. Az egyéb mezenchimális differenciációs markergénekre (Runx2, FABP4 stb.) tervezett RT-PCR reakciók eredményei arra utalnak, hogy a BMP2-expresszió és a HD tenyésztési körülmények ellenére, a sejtvonal sejtjei megtartják csont- és zsírszövet irányba történő differenciálódási képességüket. Támogatás: OTKA CNK 80709, ETT 022/09.

## P6 - Sejtorganellum biokémia

### P6-01

#### **A miozin-foszfataz szerepe az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz aktivitásának szabályozásában**

BÁTORI Róbert, Bécsi B., Lontay B., Erdődi F.  
*DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) által termelt nitrogén-monoxid (NO) a simaizom relaxáció mellett számos fiziológiai folyamatban szerepet játszik. Az eNOS aktivitása a Ser1177 aminosav foszforilációjával növekszik, míg a Thr495 aminosav foszforilációja az enzim aktivitásának gátlását eredményezi. A foszforilált Thr495 defoszforilációját a PP2A, PP2B és PP1c is katalizálhatja, azonban a defoszforilációt végző protein foszfataz holoenzim/ek nem ismert/ek. Az eNOS-t nem expresszáló HEK293 sejteket vad típusú eNOS-t kódoló plazmiddal transzfektáltuk és kemilumineszcenciás nitritméréssel határoztuk meg a felszabaduló NO mennyiségét. PMA és foszfatazgátló calyculin-A kezelés hatására a Thr495 aminosav foszforilációja 3-4-szeresére növekedett, ami a felszabaduló nitrit mennyiségének csökkenésével járt. Kísérleteinkben a PP1c katalitikus alegységből és a regulátor alegységből (MYPT1) álló miozin foszfataz (MP) holoenzim szerepét vizsgáltuk az eNOS-Thr495 defoszforilációjában. A MYPT1 és eNOS közötti kölcsönhatást endotél sejtekben immunprecipitációval és pull-down módszerrel, valamint felületi plazmon rezonancián (SPR) alpoló módszerrel is kimutattuk. A pM11-Flag-MYPT1 és pcDNA3.1-myc-

eNOS plazmiddal kotranszfektált HEK293 sejtek lizátumából a két fehérje koprecipitációját detektáltuk. A tisztított myc-eNOS *in vitro* foszforilációját a Thr495 aminosavon Rho-kinázzal végeztük és PP1c-MYPT1 komplexel defoszforiláltuk. A konfokális mikroszkópos felvételek a MYPT1 és eNOS kolokalizációját mutatták az endotél sejtek nyúlványaiban és részleges kolokalizáció volt megfigyelhető az osztódó sejtekben az aktomiozin gyűrű mentén. Eredményeink arra utalnak, hogy a MP és eNOS kölcsönhatnak az endotél sejtekben és a MP holoenzim az, amely a foszfo-eNOS Thr495 aminosav defoszforilációjáért felelős és ezáltal szerepe lehet az enzim aktivitásának szabályozásában. A kutatásokat az OTKA K68416 és CNK80709, valamint a TÁMOP 4.2.2-08/1-2008-0019 DERMINOVA projekt támogatták.

### P6-02

#### **Leánysejtek öröksége**

BORSOS Máté, Róna G., Vértessy B.  
*MTA Enzimológiai Intézet, Genom metabolizmus és javítás csoport, Budapest*

A magi proteom összetétele a sejtciklus során dinamikusan változik. Ennek kialakításában jelentős szerepe van a citoplazma és mag között fennálló transzportfolyamatoknak, melyek szabályozása elengedhetetlen sejtjeink megfelelő működéséhez. Osztódást követően a maghártya úgy szerelődik össze, hogy a makromolekulák, a kromatin-asszociált fehérjék kivételével, kirekednek a magból. A 40

kDa-nál nagyobb molekulák később kizárólag aktív transzporttal juthatnak a magba, melyhez NLS szignál szükséges. Ezen aktív transzportfolyamatok regulációja számos módon történhet, többek közt foszforilációval. Fehérjék egy csoportjáról (SV40, SWI6, APC, CDC6) már leírták, hogy a sejtciklusfüggő CDK1 szubsztrátjai és NLS közeli foszforilációjuk gátolja magi akkumulációjukat. További, igen hasonló karakterű NLS-el rendelkező CDK1 szubsztrátokon (UNG, UBA1, p53) is bizonyított a szignál közeli foszforiláció, ellenben ennek funkciója még nem ismert. Ennek vizsgálatára fluoreszcens riporterhez kötött, foszforilációt mimikáló mutánsokat hoztunk létre. A sejtes eredmények azt mutatják, hogy ezen fehérjék transzportját a foszforiláció nem gátolja, ezért érdemes elgondolkozni, vajon milyen funkcionális illetve szerkezeti különbségek lehetnek felelősek a látszólag hasonló NLS szerkezetű, mégis eltérően regulált két fehérje csoport között. Felmerülhet egy sejtciklus függő, NLS környéki foszforilációs esemény általános előfordulása, ami számos fehérje magi akkumulációját késleltetni fogja a leánysejtekben, jelentősen befolyásolva azok magi proteomját a G1 fázisban. Ettől a sémától eltérően viselkednek az általunk vizsgált fehérjék. Érdekes kérdés, hogy vajon ezen fehérjék esetleg egyéb szerkezeti motívumainak, vagy kölcsönható partnereknek köszönhetően esnek-e ki ezen szabályozás alól. Ennek tesztelésére kidolgoztunk egy, az NLS-t az eredeti fehérje kontextustól függetlenül vizsgálni képes riporter assay-t, melynek alkalmazása folyamatban van.

#### P6-03

##### **Szöveti transzglutamináz kimutatása különböző eredetű humán mezenhimális őssejtekben, és szerepének vizsgálata differenciálódásuk során**

<sup>1</sup>BUCHAN Gyöngyi, <sup>2</sup>Mádi A., <sup>1</sup>Fésüs L.

<sup>1</sup>DE OEC, *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*; <sup>2</sup>MTA-Debrecen, *Apoptózis és Genomika Kutatócsoport, Debrecen*

A primer mezenhimális őssejtek (MSC) olyan multipotens sejtek, melyek a szervezet számos szövetéből izolálhatóak, mint például csontvelőből, zsírszövetből és köldökzsinórból. Jellemző tulajdonságuk, hogy képesek többek között zsír-, csont-, és porcszöveté differenciálódni. Az immortalizált MSC-ék (iMSC) könnyebben tenyészthetők, mint a primer sejtek, így klinikai alkalmazásuk óriási lehetőségeket rejt magában. Az MSC-ék alkalmazásának egyik fontos eleme differenciálódási hatékonyságuk növelése a rendelkezésre álló módszerek tökéletesítésével. A szöveti transzglutamináz (TG2) expressziós mintázata alapján bizonyítottan részt vesz klinikailag fontos sejtípusok differenciálódásának szabályozásában. Korábban kimutatták, hogy a TG2, hasonlóan más sejtípusokhoz, szükséges az MSC-ék integrin-közvetített túléléséhez, de génműködést szabályozó szerepe még nem ismert differenciálódási folyamataik során. Munkánk célja, hogy kimutassuk és megvizsgáljuk a TG2 szerepét

ezekben a folyamatokban, hogy így hozzájáruljunk az MSC-ék differenciálódási hatékonyságának és klinikai alkalmazhatóságának növeléséhez. Eddigi munkánk során sikerült kimutatni a humán TG2 jelenlétét csontvelőből, zsírszövetből és köldökzsinórból izolált primer MSC-ékben, valamint a rendelkezésünkre álló immortalizált sejtvonalakban is. Eredményeink szerint jelentős mennyiségű TG2 található a differenciálatlan sejtekben, melynek differenciálódási folyamatokban betöltött szerepét jelenleg vizsgáljuk.

#### P6-04

##### **Protein foszfatáz-1 gátló toxinok és foszforilálható gátló fehérjék hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára.**

DEDINSZKI Dóra, Kiss A., Gergely P., Erdődi F.  
*DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

A kemoterápiás szerek, mint pl. daunorubicin (DNR), által kiváltott sejthalálban fontos szerepe van a fehérje foszforiláció változásoknak. Célkitűzésünk az volt, hogy protein foszfatáz-1 és -2A (PP1 és PP2A) enzimek hatását tanulmányozzuk leukémiás sejtek (THP-1) DNR-el szembeni érzékenységére. Kísérleteinket Tautomycin (TM, 1 µM), és Kalikulin-A-val (CLA, 50 nM) végeztük, amelyek a PP1 és PP2A szelektív gátlószerei az alkalmazott koncentrációban. A CLA kezelés megnövelte az Erk1/2, PKB/Akt és a retinoblasztóma (pRb) fehérje foszforilációs szintjét és csökkentette a DNR által kiváltott kaszpáz-3 aktivitást THP-1 sejtekben. A TM, habár megemelte a pRb foszforilációt, nem volt hatással a kaszpáz-3 aktivitásra. Akárcsak a CLA, a TM kezelés is megnövelte a sejtek túlélését DNR-el szemben, ami rámutat a pRb foszforiláció fontos szerepére ebben a folyamatban. A PP1c izoformák csendesítése HeLa sejtekben megnövekedett pRb foszforilációt eredményezett, ami szintén a PP1 szerepére utal a pRb fehérje defoszforilációjában. A KEPI (kinase-enhanced PP1 inhibitor) egy, a CPI-17 családba tartozó foszforiláció függő PP1 inhibitor fehérje. FLAG-KEPI plazmid MCF-7 sejtekbe (amelyek nem tartalmazzák a KEPI fehérjét) történő transzfektálásával modelleztük a PP1 inhibitorok hatását a pRb foszforilációjára. Kimutattuk a transzfektált KEPI kezeléseknélküli és foszfatázgátló hatására megnövekedett foszforilációját, amit a pRb foszforiláció fokozódása kísért. Bizonyítottuk, hogy a PKC képes a KEPI-t foszforilálni a gátló szekvencián és ez megnövekedett foszfatáz gátlást eredményezett. Eredményeink arra utalnak, hogy a PP1 által szabályozott pRb fehérje foszforilációjának fontos szerepe van a sejtek életképességének szabályozásában. A kutatásokat az OTKA K68416 és CNK 80709, valamint a TÁMOP 4.2.2-08/1-2008-0019 DERMANOVA pályázatok támogatták.

## P6-05

### ComPPI: kompartmentalizált fehérje-fehérje kölcsönhatási adatbázis

VERES Dániel, Csermely P.

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

A fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok nagyban segítik az ép és a beteg sejt szerveződésének és funkcióinak rendszer szintű megértését. E hálózatok elemei a sejtet alkotó fehérjék, kapcsolatai pedig a fehérjék közötti fizikai kapcsolatok. Az interaktómokban a sejtben belüli lokalizációt eddig nem vettük figyelembe, így számos kölcsönhatás fals-pozitív volt, hiszen a kölcsönható fehérjék a sejtben belül a valóságban nem tartózkodtak azonos helyen. Az interaktómok szűrésének egyik módszere a szubcelluláris lokalizáció hozzárendelése a fehérjékhez. Ezzel számos hamis kapcsolat eltűnik a hálózatból, ami növeli a biológiai relevanciát. Négy modell szervezet interakciós adatbázisát készítettük el. Az adatbázis alapját a fehérje-fehérje kölcsönhatási adatok adták, amelyek kapcsolatait több adatbázis összegzéséből származó lokalizá-

ciós információk alapján korrigáltuk. Az elkészült kompartmentalizált fehérje-fehérje kölcsönhatási adatbázist ComPPI-nak neveztük el. Az adatbázis A) alkalmas azon kapcsolatok kiszűrésére, melyek eltérő kompartmentek között jönnek létre; B) több forrásból származó lokalizációs adatokat összegez; C) a felhasználó számára szabadságot biztosít az adatbázisok kiválasztásában, és a kívánt kölcsönhatások összeállításában. Az adatbázis később könnyen bővíthető, frissíthető. Az adatbázis elérése egy web-szerveren keresztül történik, amelynek felületén egyszerűen kiválaszthatóak a kívánt tulajdonságok, így a letöltendő adatbázisok struktúrája a későbbi vizsgálatokhoz optimalizálható. A kompartmentalizált fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok használatának fontosságát egy, a sejt-kompartimentumok öregedéssel fokozódó áteresztőképességét figyelembe vevő, *in silico* öregedési modellen is teszteltük. Az itt kapott eredmények rávilágítottak arra, hogy a fehérjék lokalizációs térképe az eddig használt interaktómok tulajdonságait alapvetően megváltoztatja, így az eddig használt hálózatokon kompartmentalizációs szempontból a kvázi „öreg” állapotot vizsgálták.

## P7 - Neurobiokémia

### P7-01

#### A CB1 receptor antagonist SR141716 (rimonabant) CB1 receptor-independens hatásai

Cinar R., SZŰCS Mária

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716-ről többen kimutatták, hogy nagy koncentrációban gátolja a G-protein alapaktivitást, vagyis inverz agonista hatással rendelkezik. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon ez a hatás a CB1 receptorokon keresztül mediálódik-e. A ligandum stimulált [<sup>35</sup>S]GTPγS funkcionális mérést használva, amely bármely GPCR aktiváció első lépését detektálja, azt találtuk, hogy az SR141716 mikromólos koncentrációkban szignifikánsan csökkentette a bazális [<sup>35</sup>S]GTPγS kötést vad típusú és CB1 receptor knock-out egér cortex és parentális CHO sejt membránban, utóbbi két rendszer nem tartalmaz-

va a vizsgált receptort. Ezek az adatok arra vallanak, hogy az SR141716 inverz agonista hatása CB1 receptor-independens. μ-opioid receptorokkal stabilan transzfektált CHO sejtekben a specifikus μ-opioid receptor agonista DAMGO 501 ± 29% stimulálta a G-protein aktiváció alapaktivitását, melyet 456 ± 22% értékre gátolt 10 μM SR141716. Amennyiben a sejteket pertussis toxinnal (PTX) előkezeltük, hogy szétkapcsoljuk a receptorokat a Gi/Go proteinektől, a DAMGO-nak magában nem volt hatása, a várakozásnak megfelelően. Azonban DAMGO és SR141716 kombinációja 215 ± 25% stimulációt eredményezett, amelyet teljes mértékben kivédett az opioid antagonist naloxon. Ezek az eredmények egy új, PTX-inszenzitív opioid signaling felszínre kerülését mutatják, amikor a μ-receptorok aktiválva vannak DAMGO és SR141716 együttes jelenlétében. A jelenség molekuláris mechanizmusának feltárása további vizsgálatok tárgya.



## P8 - Egyéb

### P8-01

#### **Karnitinészter profil dialízis indukálta változásainak vizsgálata L-karnitin szupplementációban részesült végstádiumú vesebetegekben**

<sup>1</sup>BENE Judit, <sup>2</sup>Csiky B., <sup>3</sup>Wittmann I., <sup>3</sup>Sulyok E.,  
<sup>1</sup>Melegh B.

<sup>1</sup>PTE KK, Orvosi Genetikai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>PTE KK, II. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum, Pécs; <sup>3</sup>PTE ETK, Egészségtudományi Intézet, Pécs

Rendszeres hemodialízis kezelésben részesülő végstádiumú vesebetegeknél gyakran megfigyelhető karnitin deplécio és az acilkarnitinek akkumulációja. Munkánk során az L-karnitin szupplementáció acilkarnitin profilra gyakorolt hatását vizsgáltuk, továbbá jellemeztük az egyes acilkarnitinek változásának dinamikáját dialízis alatt karnitin visszapótlást követően. 20 nem diabéteszes beteget és 37 egészséges kontrollt vontunk be a tanulmányba. Mintavétel karnitin szupplementáció előtt, a 12 hetes szupplementáció végén, a dialízis alatt óránként és fél órával a dialízis után történt. A szabad karnitin és az egyedi acilkarnitinek plazmabeli szintjét elektropray tandem tömegspektrometriás méréssel határoztuk meg. A dialízises kezelésben részesülő betegek alacsonyabb szabad és összkarnitin, és emelkedett acilkarnitin szintet mutattak a szupplementáció előtt a kontrollokhoz képest. Az L-karnitin szupplementáció az összes észter drámai emelkedését eredményezte. A dialízis a szabad karnitin, rövid szénláncú- és dikarbonsavas karnitinészterek szintjében egy progresszív és folyamatos csökkenést indukált (a dialízis előtti érték ~80%-a kimosódott), a közepes szénláncú észterek esetében egy mérsékelt csökkenést eredményezett (~60%-a mosódott ki), míg a hosszúszenláncú észterekre nem volt hatással. Már 30 perccel a dialízis után lényeges emelkedést figyeltünk meg a szabad karnitin koncentrációjában (a dialízis előtti érték 26%-át elérte) és az acilkarnitinek is elkezdtek visszatöltődni (a dialízis előtti érték 21-52%-ára) külső karnitin bevitele nélkül. A dialízis indukálta kimosódás a rövid-, közepes- és hosszúszenláncú észterek különböző mértékű eliminációját eredményezte a karnitin kezelt betegekben, a keringő karnitinészterek visszanyerése a szöveti raktárakból gyors, melynek hatása már 30 perccel a dialízis abbahagyását követően megmutatkozik.

### P8-02

#### **A retinoidok befolyásolhatják a szöveti transzglutamináz keletkezését az elhaló timocitákban**

Garabuczai Éva, Fésüs L., Szondy Zs.  
DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A timociták csontvelői őssejtekből származó sejtek. Érésük és differenciálódásuk a tímuszban tör-

ténik 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. Azonban a timociták elhalását *in vitro* glükokortikoid kezeléssel kiváltva, a TG2 indukálódását nem tudtuk kimutatni. Kísérleteink során arra keressük a választ, hogy mely anyagok működhetnek közre a timociták *in vivo* apoptózisa során, melyek a timociták szöveti környezetében megtalálhatóak és szükségesek a TG2 *in vivo* termelődéséhez. Laborunk korábbi adatai azt mutatják, hogy a timociták elhalását a tímuszban jelenlévő retinoidok és az apoptotikus sejteket eltakarító makrofágok által termelt transforming-growth-factor-béta (TGF-béta) is befolyásolhatja. Mind retinsav, mind TGF-béta kötőhely létezését leírták a TG2 promóterében. Kísérleteinkben – a TGF-béta mellett – a retinoidok hatását vizsgáljuk a TG2 megjelenésére, a timociták apoptózisa során. Adataink azt mutatják, hogy a TGF-béta és a retinsav, valamint az apoptózist kiváltó glükokortikoid együttes hatása szükséges a TG2 mRNS hatásos indukciójához *in vitro* elhaló timocitákban. A retinsav szintézis gátlása csökkenti a TG2 indukcióját *in vivo* apoptózis kiváltását követően, mely arra utal, hogy a retinoidok hozzájárulhatnak a TG2 expresszióhoz. Továbbá, a tímuszban *in vivo* apoptózis kiváltását nagymértékű retinsav indukció követi. A megjelenő retinsavat az apoptotikus sejtek eltakarítását végző makrofágok termelhetik. Adataink azt mutatják, hogy az apoptotikus sejtek felvétele retinoidok szintézisét váltja ki az őket felvevő makrofágokban, mely retinoidok hozzájárulhatnak a TG2 indukcióhoz az elhaló timocitákban.

### P8-03

#### **Monoklonális antitestek biotiniláltságának meghatározása különböző eljárásokkal**

KÁDAS János, Lázár J., Pál A., Lestár Zs., Takács L., Kurucz I.

BioSystems International Kft, Debrecen

A biotin-streptavidin specifikus kötés kihasználása nagyon szerteágazó molekuláris biológiai és immunológiai módszerekben és azokkal összefüggő fejlesztésekben. Ezen fehérje alapú módszerek közé tartoznak az ELISA, immunprecipitáció, Western blot és egyéb biológiai eljárásokban felhasznált immobilizálási és detektálási technikák. A különböző módszerekben alkalmazott biotinilált fehérjék kereskedelmi forgalomban többnyire beszerezhetőek, de bizonyos esetekben szükség van háziilag biotinilált fehérjékre is. Fontos kérdés egy biotinilálási eljárás során a célfehérje biotiniláltsága, és az ehhez a megfelelő fehérje – biotin arány beállítása, illetve a biotiniláltság sikerességének és mértékének ellenőrzése. Rossz biotinilálási hatások a tervezett eljárás működését veszélyezteti, túlbiotinilálás esetén precipitáció, aktivitás- és funkcióvesztés következhet

be. Az ilyen veszélyek elkerülésére több módszert is kidolgoztak, melyek segítenek a biotinilátság mértekének meghatározásában. Ezek az általánosan használt módszerek vagy streptavidin kötődésen alapulnak (pl. HABA), vagy önmagában a beépített biotin járulékos tulajdonságát használják ki (pl. kromogén biotin). Problémát jelenthet az eljárás járulékos költsége, a szükséges felszerelés hiánya, a felhasznált fehérje mennyisége. Tapasztalataink szerint ezek a konvencionális eljárások az említett problémákon túlmenően bizonyos esetekben alulreprezentálják a beépített biotin mennyiségét, illetve az általuk meghatározott biotin nem teljes mennyisége hozzáférhető a jelölt mintán a mérés körülményei között, vagy egyáltalán nem képesek meghatározni azt, illetve nem adnak elégséges információt az esetleges funkcióvesztésről vagy aktivitás csökkenésről. Biomarker kutatásainkhoz használt monoklonális antitestek vizsgálata során számos olyan technikát használunk, ahol a résztvevő partnerek egyike biotinilált. A biotinilátság hatásfokának ellenőrzésére alkalmazott módszereink egyike streptavidin-HRP0 próbát használ, amelynek segítségével így, a próba által hozzáférhető (funkcionális) beépített biotin mennyisége határozható meg. Ez az adat sem a HABA sem pedig a kromogén biotin alkalmazásával nem mérhető. A kutatásokat a Nemzeti Innovációs Hivatal NKTH pályázati alapja (TECH-09-A1-2009-0113) támogatta.

#### **P8-04**

##### **A TRIB1 gén polimorfizmusa 2-es típusú cukorbetegségben és metabolikus szindrómában**

<sup>1</sup>KISFALI Péter, <sup>1</sup>Szabó Gy., <sup>1</sup>Baricza E., <sup>1</sup>Duga B., <sup>2</sup>Hetyésy K., <sup>1</sup>Melegh B.

<sup>1</sup>PTE KK, Orvosi Genetikai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>Győri Petz Aladár Megyei Kórház, Központi Laboratórium, Győr

A 2-es típusú cukorbetegség (T2DM) és a metabolikus szindróma (MS) poligénes, komplex betegségek. Mindkét betegségre jellemző a gén- és környezet kölcsönhatások hangsúlyos szerepe, a felnőttkori 40 és 60 év közötti megjelenés. Penetranciájuk változó, 10% és 40% közé tehető. A humán tribbles-1 gén (TRIB1) a 8q24-es kromoszóma régióban helyezkedik el. Az általa kódolt TRIB1 fehérje májban történő overexpressziója a plazma triglicerid- és összkoleszterin-szinteket csökkenti a VLDL képződés korlátozása révén. Az rs17321515 variánsról korábban kimutatták, hogy összefüggésben áll a hipertrigliceridémiával és a hiperlipoproteinémia 2B, 3, 4 és 5 típusaival egy ázsiai maláj populációban. Továbbá, ez a TRIB1 lókuszon található polimorfizmus összefüggést mutatott emelkedett össz- és LDL-koleszterin értékekkel és iszkémiás szív- valamint szív-és érrendszeri megbetegedések kialakulásának emelkedett kockázatával, valamint egy japán tanulmányban ez a polimorfizmus szignifikáns asszociációt mutatott triglicerid- és LDL-koleszterin koncentrációkkal is. Összesen 426 T2DM, 489 MS és 253 kontroll sze-

mély genotípusát vizsgáltuk PCR-RFLP módszerrel. A triglicerid-értékek és a genotípusok között kapcsolatot találtunk mindkét betegcsoportban. A triglicerid-szintek magasabbak voltak a minor allélna homozigóták körében, mint a másik két genotípussal rendelkezők esetében (T2DM: AA:2.12±0.28; AG:1.79±0.12; GG:1.99±0.21; MS: AA:2.49±0.18; AG:2.10±0.09; GG:2.15±0.16; p<0.05). A szérum össz-koleszterin és HDL-koleszterin szintek a különböző genotípusú alcsoportok között nem mutattak szignifikáns eltérést. A logisztikus regressziós analízis eredményei alapján az AA genotípus a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával szemben védő faktornak bizonyult (OR=0.495; 95% CI:0.292-0.827; p=0.007). A vizsgált rs17321515 polimorfizmus tehát eredményeink alapján a minor allélna homozigóták esetében összefüggést mutatott az emelkedett plazma triglicerid szintekkel mind T2DM mind MS betegekben, és védő faktornak bizonyult a 2-es típusú cukorbetegséggel szemben.

#### **P8-05**

##### **A retinoidok által kiváltott NUR77-függő apoptózis egér tímuszsejtekben**

Kiss Beáta, Tóth K., Sarang Zs., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A Nur77 egy transzkripciós faktorként funkcionáló ún. árva receptor, mely meghatározó szerepet játszik a T-sejt receptor indukálta timocita sejthalál közvetítésében. Az apoptózis kiváltásához a transzkripciós szabályozáson felül, a mitokondriumba jutva is hozzájárul, a antiapoptotikus Bcl-2 fehérje proapoptotikus molekulává történő konverziója révén. Előzetes kutatások kimutatták, hogy az egér tímuszban endogéne képződnek retinoidok, melyek transzkripció-függően képesek kiváltani a timociták apoptózisát. Kimutattuk, hogy a T-sejt receptoron keresztül ható szignálokhoz hasonlóan a retinsavak is képesek kiváltani a Nur77 kifejeződését dózis-függő módon, mely folyamatban a 9-cisz retinsav hatékonyabbnak bizonyult az ATRA-hoz képest. A retinoid-kiváltotta timocita sejthalál Nur77-függő folyamat, mivel Nur77 KO sejtek esetében retinsavakkal nem indukálható apoptózis. A retinoidok öt sejthalálban szerepet játszó gén kifejeződését fokozzák Nur77 függő módon (FasL, TRAIL, NDG1, Gpr65 and Bid), melyek együttesen járulnak hozzá a mitokondriális Bid fehérje kaspáz-8 függő hasításához. Továbbá kimutattuk, hogy a Nur77 fehérje mitokondriumba történő bejutása a Bcl-2 BH3 doménjének felszabadulásához vezet. A retinsav indukálta apoptózis mind kaspáz-8, mind kaspáz-9 függő folyamat. Adataink azt mutatják, hogy a retinoidok a mitokondriális útvonalat aktiválva egy Nur77-függő apoptotikus folyamatot indítanak egér tímuszsejtekben.

## P8-06

### Az adenosin A<sub>2A</sub> receptor szerepe az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatásában

Köröskényi Krisztina, Duró E., Pallai A., Sarang Zs., Fésüs L., Szondy Zs.  
DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az apoptotikus sejtek makrofágok általi hatékony és gyors eltakarítása kulcsfontosságú folyamat az immunhomeosztázis fenntartásának szempontjából. Az eltakarítás három szakaszra bontható: (1) fagociták mobilizálása szolubilis „find me” szigálok közreműködésével, sejt felszíni „eat me” motívumok általi felismerését követő fagocitózis, gyulladási válasz gátlása direkt módon, illetve gyulladáscsökkentő mediátorokon keresztül. Vizsgálatainkkal a főként gyulladásgátló jelet közvetítő adenosin A<sub>2</sub> (A<sub>2A</sub>) receptor részvételét vizsgáltuk a makrofágok apoptotikus sejtekre adott immunválaszában. Munkánk során azt találtuk, hogy a makrofágok egyrészt adenosin termeléssel, másrészt az A<sub>2A</sub> sejt felszíni és génextpressziós szintjének megemelésével reagálnak az apoptotikus sejtekre. Ez utóbbi sejt felvétel-függőnek bizonyult és valószínűleg két, az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatását közvetítő magreceptor a PPAR $\delta$ , és az LXR aktivációján keresztül valósul meg. Emellett apoptotikus sejtekkel kezelt vad típusú makrofágokban az A<sub>2A</sub> stimulációja a NO-termelés gátlásán keresztül csökkenti a neutrofil kemoattraktáns MIP-2 és KC szekrécióját. Ennek megfelelően A<sub>2A</sub> hiányában mindkét kemoattraktáns szintje emelkedett, melynek eredményeként fokozott neutrofil migráció figyelhető meg apoptotikus sejtekkel injektált A<sub>2A</sub> knock out egerekben *in vivo*. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az adenosin egyike azon, makrofágok által termelt szolubilis mediátoroknak, melyek részt vesznek az apoptotikus sejtek gyulladásgátló hatásában.

## P8-07

### A Plasmodium falciparum CTP: foszfokolin citidililtranszferáz szerkezeti vizsgálata

<sup>1</sup>Nagy Gergely N., <sup>2</sup>Maheshwari, S., <sup>2</sup>Cerdan, R., <sup>2</sup>Vial, H., <sup>1</sup>Vértessy G.B.

<sup>1</sup>MTA Enzimológiai Intézet, Genom Metabolizmus és Javítás Csoport, Budapest; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Université Montpellier II, Franciaország

A Plasmodium malária kórokozó fajok foszfolipid szintézise kulcsfontosságú a parazita vörösvértestbeli életszakasza során, emiatt ígéretes új gyógyszerfejlesztési célpontnak tekinthető. A *P. falciparum* CTP: foszfokolin citidililtranszferáznak (PfCCT) lényeges szabályozási szerepe van a szintézisútván, mivel a *de novo* foszfatidilkolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizálja. Célunk a PfCCT enzim hatásmódjának mélyebb megismerése, enzim- ligandum kölcsönhatások vizsgálata által. Vizsgálatainkhoz a katalitikus domént is tar-

talmazó PfCCT konstruktot *E. colival* termeltettük. Igazoltuk a termelt fehérje dimerizációját és enzim aktivitást. Izotermális titrációs kalorimetriás mérés során a PfCCT:CDP-kolin termékkel alkotott komplex disszociációs állandója 50  $\mu$ M-nak adódott. Ez az érték jóval kisebb, mint a kolin-foszfát és CTP szubsztrátok irodalomban közölt Michaelis állandói. A termék hozzáadása a szubsztrátokénál jóval erősebb védelmet biztosított hődenaturálással szemben Thermofluor mérés során. A nagyobb PfCCT-CDP-kolin affinitás okát abban véljük, hogy a termék mind a CTP-, mind a kolin-foszfát kötő konzervált motívumokkal kölcsönhatásban van. A mechanizmus jobb megértéséhez folytonos fotometriás enzim aktivitás assayt alkalmaztunk. A PfCCT triptofán fluorofórok fluoreszcenciája jelentősen csökkent CTP, illetve CDP-kolin hozzáadására, ami a ligand bekötéssel járó konformációs változásokat jelez a fluorofór környezetében. CDP-kolin jelenléte elősegítette fehérje kristályosítás során a kristálynövekedést. A kristályok röntgendiffrakciós vizsgálata folyamatban van. Független biofizikai módszerekkel igazoltuk, hogy a PfCCT a szubsztrátoknál jóval erősebben köti a CDP-kolin terméket. Ennek hatása lehet nem csupán az enzim konformációjára, hanem a katalitikus egyensúlyra is. Az enzim dinamikájának mélyebb megismerését gyorskinetikai mérések alapján tervezzük.

## P8-08

### Transzglutamináz által létrehozott Glutamil-Lizin izodipeptid gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

Pallai Anna, Sarang Zs., Szondy Zs.

DE OEC, Biokémia és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A transzglutaminázok a fehérjék poszttranszlációs módosítását katalizáló enzimek, amelyek  $\epsilon$ ( $\gamma$ -glutamil)lizin keresztkötéseket hoznak létre a fehérjék vagy polipeptid láncok glutamin és lizin oldalláncai között. Az apoptózis során a szöveti transzglutamináz (TG2) szintje és aktivitása megemelkedik. Az enzim glutamil-lizin izopeptid kötéseket hoz létre a célfehérjéi között ezzel stabilizálva az apoptotikus testeket. Amikor az apoptotikus testeket felveszik a makrofágok a glutamil-lizin izopeptid kötés ellenáll a lizoszómális emésztő enzimeknek és a fagocita sejt N-epszilon-(gamma-glutamil)-lizin izodipeptidet bocsájt ki. Az izodipeptid molekula plazma szintjének megemelkedése jelzi a szervezetben zajló apoptózis mértékét, ugyanakkor ez idáig nem folyt kutatás a lehetséges fiziológiás hatásának vizsgálatára. Kísérleteink során azt találtuk, hogy ez a dipeptid potenciális gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik. Primer egér makrofágokban és RAW264 egér makrofág sejtvoalban képes csökkenteni a lipopoliszacharid (LPS) indukált TNF- $\alpha$ , IL-6, MIP-2 citokinek és indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) expresszióját. További kísérleteinkben szeretnénk karakterizálni a molekula gyulladásra, migrációra és fagocitotikus képességre gyakorolt lehetséges hatását.

## P8-09

### A GALNT2 gén lipid-szintekkel összefüggést mutató variánsa nagy mértékben növeli a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázatát

<sup>1</sup>POLGÁR Noémi, <sup>1</sup>Kisfali P., <sup>1</sup>Maász A., <sup>1</sup>Baricza E., <sup>1</sup>Duga B., <sup>2</sup>Mohás M., <sup>2</sup>Wittmann I., <sup>1</sup>Melegh B.  
<sup>1</sup>PTE KK, Orvosi Genetikai Intézet, Pécs; <sup>2</sup>PTE KK, II. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum, Pécs

Az UDP-N-acetil-alfa-D-galaktózamin:polipeptid N-acetilgalaktózaminiltranszferáz 2 (GALNT2) fehérje a közelmúlt kutatási eredményei alapján az angiopietin-szerű 3-as fehérje (ANGPTL3) aktivitását befolyásolja O-glikoziláción keresztül. A GALNT2 tehát a plazma triglicerid szintek változásaihoz is közvetve hozzájárul, hiszen az ANGPTL3 a triglicerid hidrolízisért felelős lipoprotein lipáz inhibitora. Emellett a GALNT2 rs4846914-es variánsát több genomai asszociációs tanulmány is a plazma lipid szintek eltéréseivel hozta összefüggésbe. Mivel ezek a genomai asszociációs tanulmányok nem szolgálnak funkcionális információval, az rs4846914-es polimorfizmus metabolikus szindrómával (MS) és 2-es típusú cukorbetegséggel (T2DM) való feltételezett összefüggését vizsgáltuk betegeinkben. Összesen 308 2-es típusú diabéteszes és 394 metabolikus szindrómás beteget valamint 246 egészséges kontrollt genotipizáltunk PCR-RFLP módszer alkalmazásával. A minor G allélra homozigóták számát mindkét betegcsoportban szignifikánsan gyakoribbnak találtuk, mint a kontroll csoportban. Ezen felül a testtömeg indexre, triglicerid- és összkoleszterin-szintekre, korra és nemre korrigált regressziós analízis alapján a GG homozigóta genotípus a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával mutatott összefüggést igen magas, 5.218-as esélyhányados mellett (CI [95%] 2.811-9.683;  $p < 0.001$ ), míg a G allél hordozása kisebb kockázatot jelentett a T2DM kialakulására 1.659-es esélyhányadossal ([CI95%] 1.027-2.678,  $p = 0.038$ ). Eredményeink alapján tehát a plazma lipid profil befolyásoló rs4846914-es polimorfizmus esetében metabolikus szindrómás betegeink körében a betegség kialakulásának kockázatával nem tudtunk összefüggést kimutatni. Ugyanakkor a polimorfizmus hetero- és homozigóta formában a 2-es típusú diabétesz kialakulására jelent kockázatot, mely összefüggés a rendelkezésre

álló irodalomban eddig nem volt ismert.

## P8-10

### Studying human adipocyte cell death *in vitro*

<sup>1</sup>SÁRVÁRI Anita Kinga, <sup>1</sup>Balajthy, Z., <sup>2</sup>Doan M., <sup>2</sup>Bacsó Zs., <sup>1</sup>Fésüs L.

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

Obesity is an epidemic health problem worldwide, enhancing the risk for metabolic disorders such as type 2 diabetes (T2DM), nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), metabolic X syndrome and cardiovascular diseases. Hypertrophic adipose tissue is associated with a rise of free fatty acids (FFA), adipokines and proinflammatory molecules, such as interleukin-6 (IL-6) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the serum and in the adipose tissue. Weight gain correlates with adipocyte size expansion and an increased number of dying adipocytes. TNF- $\alpha$  is known to inhibit adipocyte differentiation and lipogenesis, stimulates lipolysis and induces apoptosis. The elevated levels of FFA and proinflammatory cytokines attract monocytes into the hypertrophic adipose tissue. These recruited monocytes differentiate to activated macrophages, which are situated around dead adipocytes, in a „crown like” structure, release more proinflammatory cytokines, which cause an inflammatory vicious cycle in white adipose tissue (WAT). The types of adipocyte cell death and their connection with macrophages is not completely characterized yet. Our aim is to create a human *in vitro* model for adipocyte cell death and a phagocytosis assay involving human adipocytes and macrophages. We intend to characterize the cell death types of adipocytes, and to determine the cytokine profile of adipocytes during differentiation and the cytokines released during phagocytosis of adipocyte corpses. As an adipocyte source, we use human SGBS preadipocyte cell line. SGBS preadipocytes were differentiated *in vitro* into adipocytes. The lipid content of differentiating adipocytes has been measured on a time curve by laser scanning cytometry (LSC), to identify the stages of differentiation, and their cell death profile has been analyzed. The ideal timepoint for interaction of adipocytes with macrophages has been determined.

## A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke

ÁOK:	Általános Orvostudományi Kar	MTA:	Magyar Tudományos Akadémia
BBTE:	Babes-Bolyai Tudományegyetem	OEC:	Orvos- és Egészségtudományi Centrum
DE:	Debreceni Egyetem	PTE:	Pécsi Tudományegyetem
ELTE:	Eötvös Lóránd Tudományegyetem	SE:	Semmelweis Egyetem
ETK:	Egészségtudományi Kar	SZBK:	Szegedi Biológiai Kutatóközpont
KK:	Klinikai Központ	SZTE:	Szegedi Tudományegyetem
KKK:	Kémiai Kutatóközpont	TEK:	Tudományegyetemi Karok
KOKI:	Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet	TTK:	Természettudományi Kar

## Szerző szerinti mutató

<b>A</b>		Buchan Gy.	P6-03		
Antus Cs.	P4-12	Bulyáki É.	P4-02	<b>F</b>	
Arányi T.	E4-03	Burkovich P.	E1-03, P1-03	Farkas I.	P5-04
Auwerx J.	E4-01			Fazekas D.	E5-02
Ayna G.	E6-06			Fehér T.	E5-04, P5-03
		<b>C</b>		Fekete Zs.	E5-03
<b>Á</b>		Canto C.	E4-01	Fenyőfalvi Gy.	E1-06
Ábrahám E.	P5-04	Cerdan, R.	P8-07	Fésüs L.	E3-02, E6-02, E6-06, P4-11, P6-03, P8-02, P8-06, P8-10
Ábrahám H.	E7-04	Chinopoulos C.	E4-05		
Ádám G.	P5-06	Cinar R.	P7-01	Fodor J.	P3-05
Ádám V.	E4-05, E6-01	Costanzo M.	E0-01	Fodor K.	P2-01
		Crul T.	E3-01	Földi I.	E2-01
<b>B</b>		Czikora Á.	E4-02	Friedrich P.	P5-06
Bacsó Zs.	P8-10	Czimmerer Zs.	E5-06, P5-01	Fülöp K.	E4-03
Bagdy Gy.	E5-01	Czurkó A.	E7-01		
Bagossi P.	P4-07			<b>G</b>	
Bai P.	E4-01, E4-02, P2-01, P4-01	<b>Cs</b>		Gallyas F., Ifj.	E4-04, E7-04, P4-10
Bakó É.	P3-02	Csala J.	P2-09	Garabuczi É.	E6-03, P8-02
Baksa A.	E3-04	Cseh A.	E3-03	Gausz J.	P5-06
Balajthy Z.	P8-10	Cseh S.	P1-01	Gelencsér A.	P4-02
Balogh D.	E1-03, P1-03	Csermely P.	E5-02, P6-05	Gergely P.	E2-07, E3-05, E4-02, P3-01, P3-02, P3-05, P4-01, P6-04
Balogh G.	E3-01	Csiky B.	P8-01		
Baricza E.	P8-04, P8-09	Csortos Cs.	E3-05, P3-01	Gibson G.E.	E4-05
Bánáti M.	E7-04, P4-10	Csörgő B.	E5-04	Glatz A.	E3-01
Bánky D.	P2-08			Gombos I.	E3-01
Bátori R.	P6-01	<b>D</b>		Gráczér É.	P2-02, P2-07
Beal F.	E4-05	Darula Zs.	E7-01	Grézal G.	P5-05
Bencsura Á.	E7-02	Dániel B.	E5-06	Grolmusz V.	E5-05, P2-08
Bene J.	P8-01	Deák P.	E1-01, P5-07	Gulyássy P.	E7-01
Benkő Sz.	E6-06	Debreceni B.	E4-04, P4-03	Gungor B.	E3-01
Beregi T.	P5-01	Dedinszki D.	P6-04		
Berente Z.	P2-03	Doan X.Q.M.	E1-06, P8-10	<b>Gy</b>	
Besztercei B.	E3-04	Dobirta G.	E0-03	Gyimesi G.	P4-08
Bécsi B.	E2-07, P3-02, P6-01	Dombrádi V.	E4-07, P4-07, P5-04, P5-06	Gyimesi J.	P4-11
				Gyimesi M.	E1-05
Bonhomme C.	P1-05	Doró Z.	E3-02	Györfy Zs.	P4-04
Boone C.	E0-01	Draskovits G.	P5-03		
Boratkó A.	E3-05	Dudits D.	P5-04	<b>H</b>	
Boros I.M.	P5-02, P5-05, P5-08, P5-09	Duga B.	P8-04, P8-09	Hajdú I.	P1-01
Borsos B.N.	P5-02	Dumas, P.	P2-01	Haracska L.	E1-03, P1-03, P1-04
Borsos M.	P1-06, P6-02	Duró E.	P8-06	Harami G.	E1-05
Bóna Á.	E2-08			Hegedűs Cs.	E4-02, P4-01, P4-05
Böddi K.	E2-02	<b>E</b>		Hegedűs É.	1-06
Brampton C.N.	E4-03	Erdődi F.	E2-07, P3-02, P6-01, P6-04		
Brown A.C.	P1-02				
Brunyánszki A.	E4-01, P2-01, P4-01	<b>É</b>			
		Éder K.	E7-04		

Hetyésy K.	P8-04	Kiss G.	E4-05	Merli A.	P2-02, P2-07
Héja L.	E7-02	Kiss R.	E2-04	Micsonai A.	P4-08
Hévér H.	E2-03	Kocsis Zs.	P1-04	Miseta A.	E4-06, E5-03, P4-09
Hirmondó R.	P1-02	Kolozsvári B.	P3-02	Mohás M.	P8-09
Hocsák E.	E3-03, E4-04	Konrád C.	E4-05	Molnár E.	P4-10
Hodrea J.	E6-06	Korcsmáros T.	E5-02	Molnár V.	E7-04
Honti F.	E0-01	Korponay-Szabó I.R.		Módos D.	E5-02
Horváth I.	E3-01		P4-11		
Horváth V. G.	P5-04	Kovács D.	P5-02		
Hsieh Y.F.	E6-03	Kovács K.	E0-01	<b>N</b>	
Hudoba L.	P2-06	Kovács L.	P4-07, P5-07	Nagy G.N.	P8-07
Hunyadi-Gulyás É.	E7-01	Kovács M.	E1-05, P1-04	Nagy J.	E4-06, E5-03
		Kókai E.	P5-06	Nagy L.	E0-02, E5-06, P5-01
<b>I</b>		Köröskényi K.	P8-06	Nagy O.	P5-07, P5-08
Iliás A.	E4-03	Krämer S.	E6-04	Nagy T.	E4-06
Illés Zs.	E7-04, P4-10	Kristóf E.K.	E3-02	Nagy Zs.	E5-06
Imre L.	E1-06	Kriszta G.	P2-03	Nagyné Kiss Gy.	P2-03
		Kurucz I.	P8-03	Nemes É.	P4-11
<b>J</b>		Kvell K.	P4-10	Német I.	E6-03
Jakus P.	E4-04, P4-12	<b>L</b>		Nyitrai G.	E7-02
Janáky T.	E2-01	Lakatos P.	P4-05		
Jámbor É.	E2-08, P2-09	Lázár J.	P8-03	<b>O</b>	
Jelascity M.	E0-01	Le Saux O.	E4-03	Ohmacht R.	P2-09
Joós G.	E6-02	Leitgeb B.	P2-04, P2-05, P2-06		
Jójjárt B.	E2-06	Lendvai Z.	P2-09	<b>Ö</b>	
Juhász G.	E7-01	Lenti K.	E5-02	Ördög R.	P2-08
Juhász Sz.	E1-03, P1-03	Lestár Zs.	P8-03		
Juhász T.	P3-04, P3-05, P5-10	Leveles I.	E1-04, E2-06	<b>P</b>	
		Liliom K.	E3-04	Pajor L.	P2-09
<b>K</b>		Lindfors K.	P4-11	Palkovits M.	E7-01, E7-04
Kádas J.	P8-03	Lontay B.	P6-01	Pallai A.	P8-06, P8-08
Kardon T.	E6-04	Lopata A.	E2-06, P1-02	Palló A.	P2-07
Kardos J. KKK	E7-02	Lőrincz Zs.	P1-01	Pandur E.	E4-06, E5-03, P4-09
Kardos J. ELTE	P1-01, P4-02, P4-08			Pankotai T.	P1-05, P5-09
Karuppasamy M.	P2-02	<b>M</b>		Papp Á.	P5-10
Katona É.	P3-04, P3-05, P5-10	Maász A.	P8-09	Papp B.	E0-01
Kawamata H.	E4-05	Maász G.	E2-08	Parish T.	P1-02
Kálmán N.	E4-04, P4-12	Mádi A.	E6-06, P6-03	Patonay T.	P4-05
Kása A.	P3-01	Maheshwari, S.	P8-07	Páhi Z.G.	P5-09
Kerekes É.	P5-06	Major B.	P1-01	Pál A.	P8-03
Keresztesi E.	P4-06	Manfredi G.	E4-05	Pál C.	E0-01
Kékesi K.A.	E7-01	Matta Cs.	P3-04, P3-05, P5-10	Pál M.	P5-07, P5-08
Kékesi O.	E7-02	Mayer M.	E5-03	Pál-Gábor H.	P4-08
Király R.	P4-11	Márialigeti B.	P4-08	Pálinkás H.	P1-06
Kisfali P.	P8-04, P8-09	Márk L.	E2-08, P2-09	Penke B.	E7-01
Kiss A.	P3-02, P4-05, P6-04	Mäki M.	P4-11	Petrovski G.	E6-06
Kiss B.	E4-01, P8-05	Medzihradzsky F	E7-01.K.	Pécsi I.	E1-04, P1-02
		Melegh B.	P8-01, P8-04, P8-09	Péter M.	E3-01
				Pintér L.	P1-04

Pirger Zs.	E2-08	Starkov A.A.	E4-05	Töröcsik, B.	E6-01
Pittner R.	E6-04	Sulyok E.	P8-01	Török Zs.	E3-01
Polgár N.	P8-09	Sümegei B.	E3-03, E4-04, P4-03, P4-12	Tóke O.	E2-05
Pomozi V.	E4-03			Tretter L.	E6-01
Poór V.S.	E4-06, E5-03, P4-09	<b>Sz</b>		Tsay G.	E6-03
Pop F.	P5-06	Szabó A.	E3-03	Tucsek Zs.	P4-03
Popescu O.	P5-07	Szabó E.	P4-02	<b>U</b>	
Pósfai Gy.	E5-04, P5-03	Szabó G.	E1-06	Udvardy A.	P5-08
		Szabó Gy.	P8-04		
<b>R</b>		Szabó Z.	E2-01, E4-03	<b>V</b>	
Radnai B.	P4-03	Szakács Z.	P2-03	Varga A.	E3-04
Rapp J.	E5-03	Szalaiiné Ágoston B.		Vas M.	P2-02, P2-07
Rácz B.	E3-03, E4-04, P4-03		P4-02	Váradai A	E4-03
		Szamecz B.	E0-01	Vellai T.	E6-05
Rácz E.	P4-09	Szappanos B.	E0-01	Veres B.	P4-03, P4-12
Rákhely G.	P2-06	Szántó A.	E0-02, E5-06	Veres D.	P6-05
Roos N.	E2-09	Szántó M.	E4-01, E4-02, P2-01, P4-01	Vető S.	E7-04, P2-09, P4-10
Roy D.	E1-05			Vértessy G.B.	E1-04, E2-06, P1-02, P1-06, P6-02, P8-07
Róna G.	P1-06, P6-02	Szárász P.	E6-04		
Rózsahegyi M.	E4-02	Szegő É.M.	E7-01	Vial, H.	P8-07
Rutkai I.	E4-02	Szeliné Szomor J.	E2-01	Villányi Z.	P5-05
		Szerencsi B.	P2-08	Vince A.	E7-04
<b>S</b>		Székvölgyi L.	E1-06	Virág L.	P4-01, P4-05
Sandt C.	P2-01	Szigei A.	E3-03	Viskolcz B.	E2-06
Sarang Zs.	E6-02, P8-05, P8-06, P8-08	Szondy Zs.	E6-02, E6-03, P8-02, P8-05, P8-06, P8-08	Vígh L.	E3-01
Sarlós K.	E1-05			<b>W</b>	
Sárvári A.K.	P8-10	Szüts D.	E1-02	Weiss M.S.	P2-02, P2-07
Schreiber V.	E4-01	Szűcs M.	P7-01	Wittmann I.	E2-02, P8-01, P8-09
Schwabe J.	E5-06	<b>T</b>			
Sebők J.	P4-08	Takács E.	E2-06	<b>Y</b>	
Seress L.	P4-10	Takács K.	E6-05	Yamaguchi Y.	E4-03
Shirras A.D.	P5-08	Takács L.	P8-03	Yu P.	P5-04
Simáncsi Z.	P5-01	Takács R.	P3-04, P3-05		
Simon Á.	E7-02	Takács R.Á.	P5-109	<b>Z</b>	
Simon-Vecsei Zs.	P4-11	Takács R.Á.	P5-109	Zahuczky G.	E3-02
Simor A.	E7-01	Takátsy A.	E2-02	Zalka A.	P2-10
Singh R.K.	P2-02	Talabér G.	P4-10	Zákány R.	P3-04, P3-05, P5-10
Sipos A.	P3-03	Tímár E.	E5-04		
Sipos K.	E4-06, E5-03, P4-09	Tompá P.	P4-02	Závodszy P.	P2-02, P2-07
		Tóth A.	E4-02	Zhang S.F.	E4-05
Solti I.	E4-04, P4-10	Tóth B.	P4-11		
Somogyi Cs.	P3-04, P3-05, P5-10	Tóth J.	E1-04, E2-06, P1-02		
Soutoglou E.	P1-05	Tóth K.	P8-05		
Sperlágh B.	E7-03	Tömöri T.	P1-01		



## Kutatóegyetemi program a Debreceni Egyetemen

A Debreceni Egyetemen 2010. július 1.-én indult el a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 jelű projekt, amely „**A felsőoktatás minőségének javítása a kutatás-fejlesztés-innováció-oktatás fejlesztésén keresztül a Debreceni Egyetemen**” címet kapta. Az intézmény keretein belül kutatóegyetemi projektként közismert program célja, hogy a Debreceni Egyetem elérje a vezető európai elitegyetemek tudományos teljesítményét, színvonalát és elismertségét. Öt kiemelt területen belül azok a kutatók és kutatócsoportok, belső kiválósági helyek kerülnek támogatásra, akik optimális feltételek között dolgozva képesek a kutatási területük nemzetközi élvonalában jelentős tudományos eredmények, nemzetközi díjak elnyerésére, továbbá széleskörű együttműködésre a hazai és külföldi kutató társintézményekkel. A projekt költségvetése **3 015 145 578 Ft, melyből önerőként a Debreceni Egyetem 5%-ot, azaz 150 757 279 Ft-ot biztosít.**

A projekt keretében **öt kiemelt alapkutatási témakörben 118 kutatócsoport végez különböző kutatásokat.** A programot felügyelő Kutatóegyetemi Koordinációs Tanács meghatározta a kutatók kétéves projektben történő alkalmazásának feltételeit és a projekt megvalósításának belső eljárásrendjét, belső szerződést kötött a kutatócsoportokkal, mely tartalmazza a kutatási tervet, költségvetést és a két évre tett vállalásokat. Egyetemi szinten a két év alatt a szellemi kapacitás **73 fő kutatóval bővül, további 70 jelenlegi dolgozó tehermentesítése** is megtörténik az oktatási feladatok alól. A projekt keretében **22 fiatal kutató kap lehetőséget önálló kutatócsoport irányítására.**

A Kutatóegyetemi program legfelső irányító és ellenőrző szerve a **Kutatóegyetemi Koordinációs Tanács**, melynek elnöke, **Fésüs László akadémikus, a projekt szakmai vezetője.** Minden területért külön szakmai vezető felelős, a Debreceni Egyetem öt tekintélyes akadémikus professzorai: **Joó Ferenc** (Molekulatudomány), **Trócsányi Zoltán** (Fizikai-, Számítás- és Anyagtudomány), **Nagy László** (Molekuláris Medicina), **Gergely Pál** (Egészség- és Környezettudomány) és **Kertész András** (Nyelvtechnológia és Bioetika). A Tanács tagja a fent említettek mellett az egyetem tudományos rektorhelyettese, **Dr. Páles Zsolt.** A Tanács tartósan beépül az Egyetem működési rendszerébe, a kétéves támogatási projektet az Egyetem hosszú távú kutatóegyetemi programja első lépésének tekinti.

### A projekt szakmai alprojektjeinek bemutatása:

**Objektív adatok alapján az öt kiemelt szakmai terület a Debreceni Egyetem legversenyképesebb alapkutatási területe:** ezekben összesen 12 akadémiai kutatócsoport, 21 doktori iskola és hét korábbi TÁMOP pályázaton támogatást elnyert innovatív kutatói team működik.

A **Dr. Joó Ferenc** vezette **Molekulatudomány**, mint kiemelt kutatási terület a kémiai és biológiai kutatások, valamint a gyógyszerkutatás szoros együttműködését valósítja meg. Kiemelt kutatási irányt képvisel a biológiai makromolekulák és a kis molekulák közötti kölcsönhatások vizsgálata, kiválasztott hatással rendelkező molekulák tervezése, a szénhidrát-fehérje szerkezetek vizsgálata, fehérjekrisztallográfia, fehérjék aktív állapotának tanulmányozása.







A **Dr. Trócsányi Zoltán** vezette **Fizikai számítás- és anyagtudomány** alprojekt összefogja az egyetemen folyó, a fizika, a számítás- és az anyagtudomány területén a világ élvonalához tartozó alap- és alkalmazott kutatásokat. Számítástudományban a függvény- és a diofantikus egyenletek elméletében, illetve a számítógépes titkosítási eljárások kidolgozásában vannak kiemelkedő eredményeik. Az anyagtudományokban az orvosi és gyógyszerészeti célra alkalmas polimerbázisú nanokompozitok előállítása, valamint a kifejlesztett anyagok fogászati felhasználása hozott átütő újításokat.

Az **Egészség- és Környezettudomány** terület vezetője **Dr. Gergely Pál**. A népesség egészségi állapotának javítását célzó népegészségügyi kutatások kiterjednek a népbetegségek (szív-érrendszeri, daganatos, anyagcsere, mozgásszervi) kockázati tényezőinek felismerését, a szűrővizsgálatok keretében történő korai kimutatását és a rehabilitációs tevékenység hatékonyságát javító kutatásokra. A természettudományok területén további, tekintélyes előzményekkel és alapkutatói potenciállal rendelkező területet képeznek a mikroorganizmusokkal kapcsolatos kutatások. Az egyetem mindhárom nagy egységében (az AMTC, OEC és TEK nyolc tanszékén és a Bioinkubátorházban) folyik ilyen tevékenység, ami összességében olyan széles alapkutatói profilt jelent, ami egyedülálló az országban.

A **Nyelvtechnológia és Bioetika** terület vezetője **Dr. Kertész András**. A **nyelvtechnológia terület** napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő, a nyelvtudomány és az informatika interdiszciplináris együttműködésére épülő tudománya. Eredményei például a beszédszintézisben, a beszédfelismerésben, nyelvi adatbázisok létrehozásában vagy a gépi fordításban hasznosulnak közvetlenül. A **bioetika** a nemzetközi érdeklődés homlokterében álló alkalmazott filozófiai diszciplína, mely az élettudományok által felvetett etikai kérdésekkel foglalkozik.

A **Molekuláris Medicina** terület vezetője **Dr. Nagy László**. A terület lefedi a DE Orvos- és Egészségtudományi Centrum számos elméleti és klinikai intézetét, melyek 2000-ben létrehozták a Molekuláris Medicina Kutatóközpontot (angolul: Research Center for Molecular Medicine). Ebben a kutatói egységben világszínvonalú kutatások folynak a sejtek, szövetek működésének molekuláris részleteit illetően, különös tekintettel fontos betegségek kialakulásának jobb megértése érdekében. A kutatók **26 munkacsoport és 5 központi laboratórium bevonásával vizsgálják az emberi genom kifejeződésének szabályozását és rendellenességeit, a sejtek differenciálódásának és elhalásának szabályozását, bizonyos immunfolyamatokban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat és az érrendszer integritását elősegítő mechanizmusokat**. Az itt folyó munka közelebb vihet a szív és érrendszeri, daganatos, krónikus gyulladáshoz és a cukorbetegség megértéséhez, diagnózisához és kezeléséhez is. A pályázat lehetőséget biztosít a kutatómunka elmélyítésére, ugyanakkor **6 fiatal munkacsoport indítására** és a központi laboratóriumok műszerezettségének javítására.

A hatodik alprogram a **Tudás- és technológiatranszferért**, valamint a projektben létrehozott infrastruktúra hatékony hasznosításáért felelős, melynek vezetője **Balogh Judit**, a Debreceni Egyetem Tudás- és Technológiatranszfer Iroda igazgatója. Ezen belül folyik a kutatások szervezése és a nemzetközi kapcsolatrendszer bővítése, mélyítése az öt kiemelt területen. Az alprojekt a teljes egyetemi vertikum kutatási eredményeinek hasznosítását is támogatja.





A projekttel kapcsolatban további információkat, valamint a kutatócsoportok részletes bemutatkozó anyagait megtalálhatják a kutatóegyetem hivatalos honlapján:

[kutatoegyetem.unideb.hu](http://kutatoegyetem.unideb.hu)

**Infoblokk a cikkhez:**

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
[www.ujszecsenyiterv.gov.hu](http://www.ujszecsenyiterv.gov.hu)  
**06 40 638 638**



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.





## Nagyteljesítményű TA Instruments műszerek a biokémia/biológia, a fehérje – és enzimkutató, a makromolekulák vizsgálata számára

	<h3>NANO KALORIMÉTEREK</h3> <p>nano ITC: Isothermal Titration Calorimetry (nano izotermikus titrálós kalorimetria) Kötési reakciók energetikai jellemzése, entalpia változások mérése (fehérje-fehérje, fehérje-kismolekula kölcsönhatások stb.) Konformáció-változások nyomonkövetése.</p>
<p>nano ITC</p>	
<h3>NANO DSC</h3> <p>Fehérjék, makromolekulák szerkezetének, termikus stabilitásának jellemzése, ligandum kötések, hígítások energetikai viszonyának vizsgálata</p>	
<p>nano DSC</p>	
	<h3>TAM IZOTERMIKUS NANO-, MIKRO-, MINI és MULTI TITRÁLÓS KALORIMÉTEREK</h3> <p>Receptorfehérjék – (gyógyszer)kismolekulák sejttényészetek – gyógyszerkölcsönhatások termodinamikai vizsgálata. Mikrobális aktivitás, mikroorganizmus detektálása.</p>
<p>TAM III.</p>	
<p>■ MC DSC: Multicellás DSC igen változatos biológiai/biokémiai alkalmazásokhoz</p>	

A fenti rendszerek kizárólagos magyarországi forgalmazója a LABOREXPORT Kft.