

## A CAVEOLÁK, CAVEOLA-MEDIÁLT ENDOCITÓZIS. A CAVEOLÁK SZEREPE A GYULLADÁSOS FOLYAMATOKBAN

L. Kiss Anna

Semmelweis Egyetem, Anatómiai Szövet és fejlődéstani Intézet, Budapest

A caveolák a palzمامembrán omega ill. palack alakú befűződése, különleges összetételű, erősen hidrofób, caveolin tartalmú, detergensekben oldhatatlan plazmamembrán domének, lipid raftok, amelyeknek lipid- és fehérje-összetétele jelentősen eltér a környező membrán összetételétől. A caveolákban kimutatható fehérjék a caveolinhoz való specifikus kölcsönhatás, kötődés eredményeként akkumulálódnak a caveolákban.

Jelen ismereteink szerint a caveolák meglehetősen heterogén, sejtenként változó feladatot láthatnak el. A sejtek életfolyamataiban alapvetően kétféle szerepet töltenek be: i) a hozzájuk időszakosan kapcsolódó molekulák aktivitásának befolyásolása révén jelátviteli központként szabályozzák (szabályozhatják) a sejtek jelátviteli folyamatait, differenciálódását, osztódását; ii) a clathrin-burkos vezikulák mellett részt vesznek a sejtek különböző transzportfolyamatainak lebonyolításában.

A caveolák makrofágok felvételi folyamataiban betöltött szerepét a folyadék fázisos és receptor-mediált endocitózis vizsgáltával igazoltam *rezidens* és *elicitált* makrofágokban. Számos irodalmi adatot sorakoztattak fel amellett, hogy a caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai eltérnek a clathrin-burkos felvétel útvonalától. A kérdés az, hogy a caveolák által felvett ligandok célállomásai valóban a caveoszóma néven leírt struktúrák, avagy a caveola-mediált endocitózis is elvezethet a klasszikus, késői endoszóma-lizoszóma degradációs útvonalhoz? Munkám során a caveolák, és jellegzetes fehérjék, a caveolin-1 sejten belüli útjának nyomon követésével igazoltam, hogy a rövid idejű felvételi folyamat során ligandot és caveolin fehérjét egyaránt tartalmazó membránnal határolt, multivezikuláris testek keletkeznek, amelyek CD63 (LIMP-1) antitesttel jelölődnek. Igazoltam, hogy a multivezikuláris testek a klasszikus endocitotikus útvonal degradációs vonalát követve, lizozómával fúzionálnak.

A hám/mesenchyma átalakulás (EMT) kiemelt fontosságú biológiai folyamat, amelynek során a polarizált hámsejtek elveszítik hám jellegüket, és mesenchymális fenotípussal rendelkező sejtekké alakulnak át. Az EMT számos fiziológias és patológias folyamatban (pl. a tumor sejtek metasztatikus képességének kialakulása) játszik szerepet, de gyulladás is kiválthatja. A hasüregbe injektált Freund adjuváns kezelés akut peritonitist indukál, amelynek hatására a hashártya laphám (mesothel) jelentős morfológiai változásokon mennek keresztül: köb alakú sejtekké alakulnak, elveszítik polaritásukat, leválnak a bazális membránról, a bazális membrán degradálódik és a citoszkeleton átrendeződik. Ezen morfológiai változásokkal párhuzamosan a mesothel sejtek makrofág markereket (ED1, OX43, CD63) is expresszálnak, jelezvén, hogy makrofág jellegű sejtekké differenciálódnak. Kísérleteink eredményei azt igazolják, hogy a mesothel sejtek caveolái, a caveola-mediált endocitózis kitüntetett szerepet játszik a Freund adjuváns által kiváltott gyulladás (EMT), hám-makrofág átalakulás, valamint a gyulladást követő regeneráció szabályozásában.

**T-SEJT ALTÍPUSOK IMMUNOLÓGIAI ÉS ELEKTROFIZIOLÓGIAI  
KARAKTERIZÁLÁSA GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGEKBEN**

Tajti Gábor<sup>1</sup>, Szántó G. Tibor<sup>1</sup>, Balajthy András<sup>2</sup>, Palatka Károly<sup>3</sup>, Panyi György<sup>1</sup>

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet<sup>1</sup>  
Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Intézet<sup>2</sup>, Debreceni Egyetem  
Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet, Gastroenterológiai nem önálló Tanszék<sup>3</sup>

A Crohn-betegség (CD) és colitis ulcerosa (CU), mint gyulladással járó bélbetegségek (IBD) jellemzője az érintett bélszakaszok masszív T-sejtes infiltrációja, CD esetén Th1-Th17, míg az CU-ban Th2-Th17 domináns patomechanizmus jellemző az irodalmi adatok alapján.

Ismeretes továbbá, hogy egyes ioncsatornák fontos szerepet játszanak a T-sejtek fiziológiájában, illetve expressziós szintjük különbözhet az egyes altípusok között. Ezen eltérő expresszió az autoimmun kórképek ioncsatorna-specifikus terápiás megközelítését is lehetővé teszi (pl.: psoriasis).

Ezen ismeretektől motiválva célul tűztük ki IBD-s betegek szöveti és keringő T-sejt eloszlásának jellemzését, illetve az altípusok ioncsatorna expressziójának mRNS szintű és funkcionális karakterizálását.

Vizsgálatainkhoz terápia naiv IBD páciensek biopsziás- és vérmintáiból T-sejteket izoláltunk (etikai engedély iktatószáma: 17966-11/2017/EÜIG). Enzimátikus (0,5mg Kollagenáz, 250 IU/ml DNÁz I) és mechanikus disszociációt, illetve a vérminták esetén sűrűségi gradiens centrifugálást követően a T-sejteket sejtfelszíni markereik jelölésével citometriás módszerrel szeparáltuk. Előzetes eredményink alapján a szöveti T-sejt eloszlások az alábbiak szerint alakultak (A CD4<sup>+</sup> sejtek százalékában): 22,3% Th1, 16,0% Th2 és 25,1% Th17 CD-ben, míg 17,0% Th1, 19,1% Th2 és 16,4% Th17 CU-ban. Mindezek mellett kifejtésre és adaptálásra került a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák szimultán elektrofiziológiai mérésére alkalmas módszer, illetve a CRAC, TRPA1 és TRPV1 csatornák funkcionális expressziójának karakterizálására alkalmas módszerek.

A vizsgálatainkba beválogatott páciensek követését is tervezzük, terápiájuk hatékonyságának monitorozása céljából: A T-sejt altípusok eloszlását és az ioncsatorna funkciók változását is követni kívánjuk. Vizsgálataink fő célja a terápiás hatékonyság követésére alkalmas objektív módszer kifejlesztése, valamint új terápiás célpontok azonosítása IBD-ben, mely igen fontos kérdés, különösen, ha figyelembe vesszük a jelenlegi kezelési lehetőségek csúcsát jelentő biológia terápia során gyakran jelentkező vagy kialakuló terápiás hatástalanságot vagy hatásvesztést.

Rövidítések: CD: Crohn-betegség, CU: colitis ulcerosa, IBD: gyulladással járó bélbetegség, Th1: T-helper 1, Th2: T-helper 2, Th17: T-helper 17, IU: nemzetközi egység, Kv1.3: feszültségfüggő kálium csatorna 1. alcsoport 3. tag, KCa3.1: kalcium-aktivált kálium csatorna N-alcsoport 4. tag, CRAC: Kalcium felszabadulás aktivált kalcium csatornák, TRPA1: tranziens receptor potenciál kation csatorna ankyrin 1, TRPV1: tranziens receptor potenciál kation csatorna vanilloid 1.

OXIDATÍV FEHÉRJE FOLDINGRA KÉPES *IN VITRO* TRANZSLÁCIÓS RENDSZER  
KIFEJLESZTÉSE PROTEIN DISZULFID IZOMERÁZOK FELHASZNÁLÁSÁVAL

Nagy Szilvia Krisztina<sup>1,2</sup>, Mészáros Tamás<sup>1</sup>, Taichi E. Takasuka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest, <sup>2</sup>Hokkaido University, Faculty of Agriculture, Sapporo, Japan

Az *in vitro* transzláció napjainkban széles körűen alkalmazható alternatívát jelent az eukarióta sejttes fehérjetermelő rendszerekkel szemben, így a molekuláris biológia és az *in vitro* funkcionális vizsgálatok egyik leghatékonyabb fehérjetermelő módszerévé vált. Előnyei, hogy élő rendszerekben nem termeltethető toxikus fehérjék, membránfehérjék, radioaktívan vagy fluoreszcensen jelölt fehérjék is előállíthatók, emellett lehetséges nem fehérjealkotó aminosavak hozzáadása is. A búzacsíra alapú, sejtmentes fehérjeszintézissel a legtöbb eukarióta fehérje natív és aktív formában termeltethető, munkacsoportunk mindeddig több mint 200 funkcionális humán, növényi, állati fehérjét szintetizált. Bizonyos fehérjék megfelelő működéséhez elengedhetetlenek az intra- vagy intermolekuláris diszulfid kötések, ide tartozik számos membránfehérje és szekretált fehérje is. Az irodalomban fellelhetőek diszulfid hidat tartalmazó fehérjék *in vitro* előállítására tett kísérletek, viszont jelenleg még nem létezik általánosan alkalmazható módszer. Jelen munkánkban célul tűztük ki, hogy kifejlesztünk egy oxidatív fehérje foldingra alkalmas, eukarióta, sejtmentes fehérjetermelő rendszert protein diszulfid izomerázok (PDI-k) hozzáadásával. Első kísérleteink során a kereskedelembe kapható búzacsíra kivonatban (CellFree Sciences Co., Ltd.) három PDI-t azonosítottunk tömegspektrometriás analízissel. További 5 búza (*Triticum aestivum*) és 7 lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) PDI-t választottunk ki és cDNS könyvtárból történő amplifikálás után pEU transzlációs plazmidba klónoztunk. A fehérjéket *in vitro* transzlációval állítjuk elő, majd affinitás tisztítást követően különböző, a diszulfid kötés meglétét ellenőrző PDI assay-t végzünk PDI szubsztrátokkal és tömegspektrometriás vizsgálatnak vetjük alá a fehérjéket. A megfelelő PDI-k azonosítása után arra törekszünk, hogy kidolgozzunk ki egy univerzálisan alkalmazható, nagy áteresztőképességű, hatékony, oxidatív fehérje foldingra képes *in vitro* transzlációs módszert a diszulfid hidat tartalmazó fehérjék előállítására, mely megoldást nyújthat a fehérjekutatás ezen szűk keresztmetszetére.

PDI: protein diszulfid izomeráz

**A MITOKONDRIÁLIS FÚZIÓ AKTIVÁLÁSA: ÚJ TERÁPIÁS CÉLPONT A  
MITOKONDRIÁLIS KÁROSODÁSSAL ÖSSZEFÜGGŐ BETEGSÉGEKBEN?**

ifj. Gallyas Ferenc<sup>1,3,8</sup>, Szabó Alíz<sup>1</sup>, Sümegi Katalin<sup>1</sup>, Fekete Katalin<sup>1</sup>, Hocsák Enikő<sup>1</sup>,  
Debreceni Balázs<sup>1</sup>, ifj. Sétáló György<sup>2,3</sup>, Kovács Krisztina<sup>1</sup>, Deres László<sup>3,4</sup>, Kengyel András<sup>5</sup>,  
Kovács Dominika<sup>1</sup>, Mandl József<sup>6</sup>, Nyitrai Miklós<sup>5</sup>, Mark A Febbraio<sup>7</sup>, Sümegi Balázs<sup>1,3,8</sup>

<sup>1</sup>PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet; <sup>2</sup>PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet;  
<sup>3</sup>Szentágothai Kutató Központ, Pécs; <sup>4</sup>PTE KK 1. Belgyógyászati Klinika; <sup>5</sup>PTE ÁOK  
Biofizikai Intézet; <sup>6</sup>SE ÁOK Orvosi Kémiai Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet  
Budapest; <sup>7</sup>Cellular and Molecular Metabolism Laboratory, Garvan Institute of Medical  
Research, Darlinghurst, Sydney, Australia; <sup>8</sup>MTA-PTE Nukleáris-Mitokondriális Interakciók  
Kutatócsoport, Pécs

A mitokondriális fragmentáció destabilizálja a mitokondriális membránrendszereket, oxidatív stresszt okoz és sejthalálhoz vezet; mindezek által hozzájárul számos mitokondrium-károsodással összefüggő betegség kialakulásához és progressziójához. Ennek megfelelően, a mitokondriális fragmentáció folyamatok visszafordítására képes molekulák terápiás potenciállal bírnak ezekben a betegségekben.

A hidroxilamin derivatív BGP-15 megakadályozza a human inzulin rezisztencia kialakulását, valamint védelmet nyújt számos oxidatív stresszel összefüggő betegség állatmodelljében. Jelen vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a BGP-15 fokozta a mitokondriális fúziót azáltal, hogy aktiválta a mitokondriális belső membrán fúzióját kiváltó dinamin-szerű GTPáz fehérjét, az OPA1-et. Az óriás GTPáz Mfn1, Mfn2 vagy OPA1 szupressziója megakadályozta a BGP-15 indukálta mitokondriális fúziót. A BGP-15 aktiválta az Akt, S6K, mTOR, ERK1/2 és AS160, míg gátolta a JNK foszforilációját, amely hatások hozzájárulhattak a vegyület védőhatásához. Továbbá, a BGP-15 megvédte a tüdőstruktúrát, aktiválta a mitokondriális fúziót és elektromikroszkópos vizsgálatok szerint stabilizálta a kriszta membránokat *in vivo* egy pulmonáris artériás hipertenzió modelben.

Ezek az adatok elsőként szolgáltatnak kísérletes bizonyítékot arra, hogy egy mitokondriális fúziót elősegítő ágens csökkenti, vagy megakadályozza egy mitokondrium-károsodással összefüggő betegség progresszióját.

**Rövidítésjegyzék** (az előfordulás sorrendjében): OPA1 – optikai atrophia fehérje1; Mfn1 – mitofuzin1; Akt – protein kináz B; S6K – S6 kináz; mTOR – rapamicin emlős célpontja; ERK – extracelluláris szignál regulálta kináz; AS160 – Akt 160 kDa-os szubsztrátja; JNK – c-jun N-terminális kináz

BETWEEN ENERGY CONSERVATION AND ENERGY DISSIPATION: THE DUAL LIFE OF F-ATP SYNTHASE

Paolo Bernardi

University of Padova, Department of Biomedical Sciences, Via Ugo Bassi 58/B, 35131 Padova, Italy, [bernardi@bio.unipd.it](mailto:bernardi@bio.unipd.it)

Mitochondria can undergo an increase of inner membrane permeability (the permeability transition, PT) causing inner membrane depolarization,  $\text{Ca}^{2+}$  release and cessation of ATP synthesis. Prolonged openings may cause matrix swelling and outer membrane rupture with release of intermembrane proteins. The PT requires matrix  $\text{Ca}^{2+}$ , is favored by oxidative stress and inhibited by matrix  $\text{H}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}(\text{ADP})$ . The PT is mediated by opening of a high-conductance channel, the PT pore (PTP) or mitochondrial megachannel (MMC) [1]. Cyclophilin D (CyPD) is the best characterized protein modulator of the PTP and the receptor for its inhibitor cyclosporin A (CsA). The pursuit of the PTP has taken a new course after the discovery that CyPD interacts with, and modulates, the  $\text{F}_1\text{F}_0$  (F)-ATP synthase as well [2]. The subsequent demonstration that bovine, human, yeast and drosophila F-ATP synthases form  $\text{Ca}^{2+}$ -activated channels set the foundation for the hypothesis that the PTP originates from specific conformations of F-ATP synthase, an issue that is the subject of controversy and of a lively debate [3]. The debate is open as to whether and how F-ATP synthase can undergo a transition from key energy-conserving enzyme to energy-dissipating channel that favors or causes cell death. We will discuss recent advances in this rapidly moving field based on reconstitution of channel activity with highly purified preparations and site-directed mutagenesis of selected residues of F-ATP synthase.

1. Bernardi P, Rasola A, Forte M & Lippe G (2015) The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev* **95**, 1111-1155.
2. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P & Lippe G (2009) Cyclophilin D modulates mitochondrial  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem* **284**, 33982-33988.
3. Bernardi P & Lippe G (2018) Channel Formation by F-ATP Synthase and the Permeability Transition Pore: An Update. *Curr Opin Physiol* **3**, 1-5.

**A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ-2, EGY DNS REPAIR FEHÉRJE, ÚJ SZEREPE A LIPID  
METABOLIZMUSBAN ÉS A MITOKONDRIÁLIS OXIDATÍV MŰKÖDÉS  
SZABÁLYZÁSÁBAN**

Márton Judit<sup>1</sup>, Péter Mária<sup>5</sup>, Balogh Gábor<sup>5</sup>, Bódi Beáta<sup>2</sup>, Vida Andras<sup>1,4</sup>, Szántó Magdolna<sup>1</sup>,  
Bhattoa Harjit Pal<sup>3</sup>, Jankó Laura<sup>1</sup>, Gombos Imre<sup>5</sup>, Uray Karen<sup>1</sup>, Horváth Ibolya<sup>5</sup>, Török Zsolt<sup>5</sup>,  
Papp Zoltán<sup>2,7</sup>, Vígh László<sup>5</sup>, Bai Péter<sup>1,4,6</sup>

<sup>1</sup>Orvosi Vegytani Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Debreceni Egyetem, Debrecen;

<sup>2</sup>Klinikai Fiziológiai Tanszék, Általános Orvostudományi Kar, Debreceni Egyetem, Debrecen;

<sup>3</sup>Laboratóriumi Medicina Intézet Általános Orvostudományi Kar, Debreceni Egyetem,  
Debrecen; <sup>4</sup>MTA-DE Lendület Sejtmetabolizmus Kutatócsoport, Debrecen;

<sup>5</sup>Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged; <sup>6</sup>Molekuláris Medicina Kutatóközpont, Debreceni  
Egyetem, Debrecen; <sup>7</sup>MTA-DE Vaszkuláris Biológiai és Miokardiális Patofiziológiai  
Kutatócsoport, Debrecen.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-2 (PARP2) enzimet eredetileg a DNS repair rendszer tagjaként írták le, azonban úgy tűnik, a PARP2 enzimnek fontos metabolikus regulátor szerepe is lehet. A PARP2 deléciója a SIRT1 fehérje indukcióján keresztül megemeli a mitokondriális oxidációt, illetve a zsírsav oxidációt. A zsírsav oxidáció emelkedésével párhuzamosan a lipidom jelentős átalakulását tapasztaltuk, ezen belül a membránalkotó lipidek, a koleszterin és az androgének szintjének változását. A PARP2 deléciója a mitokodriális hálózat fragmentálódást okozta, illetve autofágiát indukált. A leírt változásoknak fiziológias vagy gyógyszerhatástani jelentősége lehet, ugyanis kimutattuk, hogy steroid típusú vegyületek képesek a PARP2 expressziót modulálni és így a fenti jelenségeket előidézni.

Munkánkat támogatta: NKFIH K123975, PD121138, K120669, GINOP-2.3.2-15-2016-00006, EFOP-3.6.2-16-2017-00006 és az ÚNKP-17-3-IV-DE-96 (BB) pályázatok. SzM az MTA Bolyai ösztöndíjában részesül.

THE MOLECULAR PATHOMECHANISMS OF LIPOAMIDE DEHYDROGENASE DEFICIENCY AND THE CONCLUSIONS OF THE FIRST PATHOGENIC MUTANT CRYSTAL STRUCTURE

Ambrus Attila, Szabó Eszter, Mizsei Réka, Ádám Veronika

MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport, Orvosi Biokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

A lipoamid-dehidrogenáz enzim (LADH) az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex, a piruvát-dehidrogenáz komplex, az elágazó szénláncú alfa-ketosav-dehidrogenáz komplex és a glicinhasító komplex közös alegysége. Az enzim alulműködése számos központi metabolikus utat gátol egyszerre, amelynek általában súlyos neurológiai, kardiológiai, ill. hepatológiai manifesztációi vannak. A LADH-deficiencia egy ritka genetikai betegség, amely gyakran korai halállal végződik. 14 aminosav cseréjéről mutatták eddig ki, hogy az a LADH működését gátolja és klinikai tüneteket is okoz. Bizonyos mutánsokra egyéb biokémiai változásokat is jelez az irodalom illetve saját eredményeink, többek között a FAD kofaktor (részleges) elvesztését, a LADH reaktív oxigénszármazék képzésének erősödését, illetve a multienzim komplexekhez való csökkent affinitást. Munkacsoportunk számos biofizikai és biokémiai technika felhasználásával vizsgálja a LADH mutánsok molekuláris tulajdonságait. Legfontosabb eredményünk, hogy elsőként sikerült nagyfelbontású kristályszerkezetet meghatároznunk egy patogén LADH mutáns esetében. A munkacsoport tevékenyen részt vesz a betegséghez kapcsolódó első (enzimpótló) terápia kifejlesztésében is.

THE ROLE OF MITOCHONDRIAL CYCLIC AMP PRODUCTION IN MITOCHONDRIAL  
CALCIUM HOMEOSTASIS AND STEROIDOGENESIS

<sup>1,2</sup>Gergő Szanda, <sup>1</sup>Éva Wisniewski, <sup>2</sup>Anikó Rajki & <sup>1,2</sup>András Spät

<sup>1</sup>Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>MTA-SE Laboratory of Molecular Physiology, Semmelweis University and Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

Mitochondria take up  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol and the resulting mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulates, amongst others, the reduction of pyridine nucleotides, the synthesis of synthesis and also regulates cell type specific functions such as steroid or insulin secretion. It has been recently recognized that mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  elevations also trigger the production of *intramitochondrial* cAMP (mt-cAMP) by the matrix soluble adenylyl cyclase (sAC) and we have demonstrated that this mt-cAMP formation supports aldosterone production in human adrenocortical H295R cells. Since steroidogenesis is dependent on intramitochondrial  $[\text{Ca}^{2+}]$  we sought to determine whether mt-cAMP boost steroidogenesis via the fine-tuning of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism.

We found that knocking down sAC decelerates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in both intact and permeabilized H295R cells. Conversely, addition of a membrane-permeable cAMP analogue, inhibition of the matrix phosphodiesterase (PDE2A) or mitochondrial overexpression of sAC all augmented  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into the organelle. The enhancing effect of mt-cAMP on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was present also in HeLa cells and was not dependent on mitochondrial membrane potential or  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. Significantly, the mt-cAMP effect on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was blocked by the inhibition of the guanine nucleotide exchange factor Epac1. Lastly, mitochondrial expression of wild-type sAC potentiated aldosterone production.

Altogether, our observations show that the formation of intramitochondrial cAMP favours further  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into the organelle and this feed-back loop has the potential to support steroidogenesis.

NKFI-6/FK\_124038; OTKA 108382 and K116954; Hungarian Academy of Sciences (MTA);  
János Bolyai Research Scholarship (MTA)



LIZOFOSZFOLIPID MEDIÁTOROK SZEREPE A VÉRKERINGÉSI RENDSZER ÉLETTANI ÉS KÓRÉLETTANI FOLYAMATAIBAN

Benyó Zoltán, Ruisanchez Éva, Tigyi Gábor

Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató Intézet

A biológiai membránok foszfolipidjeiből és szfingolipidjeiből foszfolipázok hatására képződő lizofoszfolipidekre sokáig csak mint a lipid bioszintézis közti termékeire tekintettünk, azonban az elmúlt negyed század kutatásai feltárták, hogy igen fontos biológiai mediátor funkciókat látnak el. A lizofoszfolipidek közös strukturális jellemzője az egy zsírsavláncból álló hidrofób farok és a poláris fejcsoport. Közülük a két leginkább tanulmányozott mediátor a lizofoszfatisav (LPA) és a szfingozin-1-foszfát (S1P), melyeknek jelenleg 11 G-fehérjéhez kapcsolt receptorát (LPA<sub>1-6</sub> és S1P<sub>1-5</sub>) ismerjük. Közülük az LPA<sub>1-3</sub> és S1P<sub>1-5</sub> jelentős mértékű homológiát mutatnak és együtt az „endothelial differentiation gene” (EDG) receptorcsaládot alkotják, míg az LPA<sub>4-6</sub> receptorok a purinerg receptorokhoz hasonló strukturájúak. Az LPA-n és S1P-n kívül több más lizofoszfolipid (pl. lizofoszfadilkolin, lizofoszfadilszerin, lizofoszfadiletanolamin, stb.) biológiai hatásainak közvetítésében feltételezik G-fehérjéhez kapcsolt receptorok szerepét, így a lizofoszfolipid receptorok száma akár a duplájára is emelkedhet a következő évtizedekben.

Az LPA és az S1P, valamint receptoraik egyaránt megtalálhatók a vérkeringési rendszerben így nem meglepő, hogy számos élettani és kórélettani folyamatban vesznek részt. Mindkét mediátornak szerepe van az érfejlődésben és érújdonképződésben valamint az érpermeabilitás szabályozásában. További közös tulajdonságuk, hogy jelentős mennyiségben vannak jelen atheroszklerotikus plakkokban és felszabadulásuk fokozódik a vérlemezkék aktivációja során. Ez utóbbi folyamatot a LPA esetében a foszfolipáz D aktivitású autotaxin enzim katalizálja, mely ennek következtében ígéretes farmakológiai célpontnak ígérkezik kardiovaszkuláris kórképekben.

Annak ellenére, hogy az akkor még szójaolajból izolált LPA első, 40 évvel ezelőtt leírt biológiai hatása a vérnyomás befolyásolása volt, a mai napig számos fontos kérdés tisztázatlan a lizofoszfolipidek értónus-szabályozásban betöltött szerepével kapcsolatban. Irodalmi adatok és saját kutatásaink alapján azonban leszűrhető néhány következtetés:

1. Mind az LPA, mind pedig az S1P kettős hatást fejt ki az értónusra, mégpedig egy endotheliális NO által közvetített vazodilatációt, valamint közvetlen simaizom-hatással vazokonstrikiót.
2. A két ellentétes hatás erőssége jelentősen különbözik az érpálya különböző részein és a LPA esetében függ a zsírsavlánc hosszától és telítettségi fokától.

A hatások közvetítéséért döntően az LPA<sub>1-6</sub> és S1P<sub>1-5</sub> receptorok felelősek, de bizonyos folyamatokban a lizofoszfolipidek intracelluláris receptorokkal vagy más jelátviteli fehérjékkel közvetlenül kölcsönhatásba lépve fejtik ki hatásukat. (Kutatási támogatás: OTKA K-112964 és K-125174.)

AZ ARHGAP25 HIÁNYA ENYHÍTI A RHEUMATOID ARTHRITIS TÜNETEIT

Csépányi-Kömi Roland, Pusztai Réka, Svanya Tim, Lévay Petra, Wisniewski Éva, Ella Krisztina, Sűdy Ágnes, Ligeti Erzsébet  
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

**Bevezetés**

A munkacsoportunk kutatásainak középpontjában álló ARHGAP25 egy, a fehérvérsejtekben kifejeződő, a Rac kis G-fehérjét szabályozó GTPáz-aktiváló fehérje. Eddigi eredményeink szerint fontos szerepet tölt be a fagocita sejtek alapvető effektor funkcióinak szabályozásában, úgy, mint a fagocitózis, a szuperoxid termelés, illetve az extravazáció. Ezen sejtműködéseket az aktin-citoszkeleton szabályozásán keresztül befolyásolja.

Eddigi eredményeink felvetik, hogy az ARHGAP25-nek jelentős szerepe lehet a gyulladási folyamatokban, így jelen munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk ezen fehérje szerepét egy komplex, gyulladással járó betegségmodellben.

**Módszerek**

A fenti kérdés vizsgálatára a szérumszűrés arthritisszerű egérmódellet alkalmaztuk. A kísérletekhez használt *Arhgap25* KO egértörzset a *Knockout Mouse Project (KOMP)*-től vásároltuk. Az arthritisszerű indukciójához a K/BxN egértörzsből nyert szérumszűrés használtuk. Az azonos korú hím KO és vad típusú egerek intraperitoneális oltását (150 µl szérumszűrés/állat) követően 10 napon keresztül mértük az állatok bokavastagságát, valamint klinikai pontszámmal jellemeztük a gyulladási mértékét. A betegség okozta funkcióvesztést a rácson történő kapaszkodás képességével vizsgáltuk. A gyulladási helyére vándorló leukociták számát, illetve az ezen sejtekben mérhető filamentáris aktin mennyiségét áramlási citométerrel vizsgáltuk.

**Eredmények**

Az ARHGAP25 hiánya esetén azt tapasztaltuk, hogy a gyulladási mértékét jellemző klinikai pontszám, valamint a betegség mértékével arányos boka-megvastagodás szignifikánsan csökkent a vad típusú állatokhoz képest. Hasonlóan alakult az állatok kapaszkodó készsége is: a KO egerek hosszabb ideig voltak képesek fent maradni a rácson, mint az ugyanolyan szérumszűrésrel oltott vad típusú állatok. Az ARHGAP25 hiányában csökkent a gyulladt ízületbe történő leukocita bevándorlás a vad típusú állatokhoz képest. Ugyancsak csökkent a filamentáris aktin mennyisége a gyulladt ízületből kinyert KO leukocitákban a vad típusúhoz képest.

**Következtetések**

Eredményeink arra utalnak, hogy az ARHGAP25 az elemi fagocita funkciók mellett elengedhetetlen résztvevője a komplex, gyulladással járó betegségeknek is, illetve hiánya befolyásolja az aktin-átrendeződést, ezen keresztül a leukociták gyulladt ízületbe vándorlását, így végeredményben a betegség súlyosságát.

Támogatás: OTKA K108382

**Rövidítések:** KO: knockout; KOMP: Knockout Mouse Project;

A SYK ÉS CARD9 JELÁTVITELI KOMPONENSEK SZEREPE A CANDIDA PARAPSILOSIS  
ÁLTAL KIVÁLTOTT IMMUNVÁLASZBAN

Gácser Attila, Zajta Erik<sup>1</sup>, Csonka Katalin<sup>1</sup>, Csepregi Janka Zsófia<sup>2</sup>, Németh Tamás<sup>2</sup>, Vágvolgyi Csaba<sup>1</sup>,  
Mócsai Attila<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék, Szeged,  
<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet, MTA-SE „Lendület”  
Gyulladásélettani Kutatócsoport, Budapest

A *Candida parapsilosis* opportunistá humánpatogén gomba egyre gyakrabban okoz invazív fertőzéseket világszerte, amelyek fokozott veszélyt jelentenek az újszülöttek körében. Ezen megbetegedések halálozási aránya elfogadhatatlanul magas, azonban kevés ismerettel rendelkezünk a gomba ellen kialakuló immunválaszról. A C-típusú lektin receptorok által aktivált Syk/CARD9 jelátvitel kiemelten fontos szerepet játszik az ismertebb *Candida albicans*-szal szembeni immunitásban. Több kutatás rámutat, hogy a különböző *Candida* fajok eltérő immunválaszt válthatnak ki. Célul tűztük ki a Syk és a CARD9 jelátviteli komponensek szerepének vizsgálatát *C. parapsilosis* fertőzés során. Munkánk során Syk hiányos és CARD9 hiányos egér csontvelői kimerákat használtunk fel. Vad típusú (Wt) és Syk vagy CARD9 hiányos állatokból származó peritoneális makrofágokat és csontvelőből differenciáltatott makrofágokat fertőztünk *C. parapsilosis* vagy *C. albicans* sejtekkel, majd a felülúszókból ELISA és „proteome profiling” módszerekkel citokineket határoztunk meg. A makrofágok károsodását a felülúszókban mért LDH aktivitás mérésével vizsgáltuk. A makrofágok *C. parapsilosis* sejteket fagocitáló és elimináló képességét áramlások citometriával, valamint élő csíraszám meghatározással tanulmányoztuk. A *C. parapsilosis*-szal vagy *C. albicans*-szal intravénásan fertőzött Wt illetve mutáns egerek különböző szerveiben (lég, vese, máj, agy) meghatároztuk a gombakolonizáció mértékét. A Syk és CARD9 hiánya csökkent gyulladáshoz citokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) és kemokin (KC) termelést eredményezett *in vitro*. A *C. parapsilosis*-szal fertőzött CARD9 KO makrofágok hasonló mértékű fagocitózist, sejtkárosodást és ölési hatékonyságot mutattak, mint a Wt makrofágok. A Wt állatokhoz képest mind a Syk hiányos, mind a CARD9 hiányos egerek jelentős érzékenységet mutattak a *C. albicans*-szal szemben. A *C. parapsilosis* fertőzéssel szembeni érzékenységük azonban jóval kisebb mértékű volt. Eredményeink szerint a Syk/CARD9 útvonal hatással lehet a makrofágok *C. parapsilosis* ellen kialakuló válaszára *in vitro*. Azonban ellentétben a *C. albicans* esetével, ezen fehérjék kevésbé jelentősek a *C. parapsilosis* okozta szisztémás fertőzéssel szembeni védekezésben. Mivel a nem *albicans* *Candida* fajok klinikai jelentősége emelkedőben van, az általuk kiváltott immunválasz megismerése egyre sürgetőbbé válik, amely új gyógymódok kifejlesztéséhez is hozzájárulhat.

Syk-spleen tyrosine (Y) kinase, CARD9-kaspáz aktiváló/kötő domén 9, LDH- laktát-dehidrogenáz

## A GLUKÓZ-6-FOSZFATÁZ-BÉTA SZEREPE AZ ANYAGCSERÉBEN

Dr. Lédeczi Zsigmond, Dr. Pittner Rebeka, Karancsi Borbála, Dr. Bögel Gábor, Dr. Legeza Balázs, Dr. Kardon Tamás

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Ritka anyagcsere-betegségek kutatócsoport

A glukóz-6-foszfátáz- $\beta$  (G6PC3) az endoplazmás retikulum (ER) membránjában elhelyezkedő, ubikviter megjelenésű, foszfohidroláz aktivitással rendelkező enzim, melynek fiziológias működéséhez szükség van glukóz-6-foszfát transzporterre (G6PT) is. A G6PT mutációja glikogéntárolási betegséget hoz létre - Von-Gierke 1b típusú glikogéntárolási betegség (GSD1B) -, amelyre a hipoglikémiás jellegzetes tünetek mellett súlyos neutropénia is jellemző. A G6PC3 mutációja esetében a metabolikus tünetek hiányoznak, viszont jellegzetes a súlyos neutropénia, amelyhez különböző fokú fejlődési rendellenességek is társulnak – ez a súlyos kongenitális neutropénia egyik típusa (SCN4). A G6PC3 nem játszik szerepet a vércukorszint szabályozásában. A G6PC3 a glukóz-6-foszfátáz- $\alpha$ -hoz (G6PC) nagyban hasonlít, szekvenciájuk 36%-ban azonos. A glukóz-6-foszfátot (G6P) mindkét enzim hasonló affinitással képes kötni, kinetikai jellemzőik kevésbé térnek el egymástól. Mind a két G6P metabolizmusában szerepet játszó fehérje funkcionális defektusa neutropéniához vezet. G6PC3 hiányában nem metabolikus, hanem generalizált tünetek is kísérik a betegséget. Feltételezzük, hogy az ER lumenében történő szénhidrát-anyagcsere megváltozása indirekt módon vezet a fejlődési rendellenességek kialakulásához.

Az ER lumenében a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak (H6PD) szintén a G6P a szubsztrátja, sőt az enzim ubikviter módon szintén minden sejtben megtalálható. Kinetikailag sokkal kisebb a  $K_M$ -je a G6P-re nézve. Megvizsgáltuk, hogy a G6PC3-nak esetleg vannak-e egyéb foszfát tartalmú szubsztrátjai is a G6P-n kívül.

Méréseinkhez patkányhere mikroszómákat, humán fehérvérsejteket és G6PC3 overexpresszált HEK293 sejteket használtunk. Az enzimaktivitást különböző szubsztrátok mellett a hidrolizált foszfát mérésével határoztuk meg.

Kísérleteink alapján a G6PC3-nak a glukóz-6-foszfáton kívül több terminális szénhidrát-foszfát is szubsztrátja. A foszforilált szénhidrátokkal enzimkinetikai méréseket végeztünk a  $K_M$  és  $v_{max}$  meghatározására. Az eredmények ismeretében transzportmérésekkel igyekeztünk arra is választ kapni, hogy az új szubsztrátok vajon mennyire fiziológiasak, azaz beilleszthetőek-e az endoplazmás retikulum anyagcsere folyamataiba.

A kísérletek az OTKA 101226 pályázat és a Báró Münchhausen program támogatásával készültek.

## A SYNDECAN-4/RAC1 GTP-ÁZ ÚTVONAL HATÁSA A MYOBLASTOK MIGRÁCIÓJÁRA ÉS FÚZIÓJÁRA

Szabó Kitti<sup>1\*</sup>, Becsky Dániel<sup>1\*</sup>, Bálint Árpád<sup>2</sup>, Horváth Péter<sup>2</sup>, Dux László<sup>1</sup>, Keller-Pintér Anikó<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Szegedi Tudományegyetem ÁOK Biokémiai Intézet

<sup>2</sup> MTA SZBK Biokémiai Intézet

\* egyenlő hozzájárulás

Fokozott fizikai igénybevételt, sérülést követően a vázizomzat regenerációra képes, melynek javításával a sportsérülések, mozgásszervi betegségek rehabilitációja gyorsítható. A regeneráció során az izomban jelen levő nyugvó szatellita (ős)sejtek aktiválódnak, a képződő myoblastok proliferálnak, differenciálódnak, migrálnak, majd csőszerű, sokmagvú myotubulusokká fuzionálnak. A fúzióhoz szükséges, hogy a prekursor sejtek a sérült izomrost, illetve egymás mellé migráljanak. A sejtmozgás az aktinváz átépülésével és a sejtek polarizációjával jár, melynek fontos szabályozója a kis GTP-áz Rac1, valamint az aktív Rac1 szükséges a fúzióhoz. Ismert, hogy a szindekan-4 (SDC4) proteoglikán hiánya megemeli a Rac1 aktivitását. Mivel a SDC4 génkiütött egerekben megfigyelhető vázizom regenerációs zavar pontos mechanizmusa nem ismert, így célunk volt a SDC4 és a Rac1 myoblast migrációban és fúzióban betöltött szerepének vizsgálata. Eredményeink alapján a SDC4 expresszió shRNS-sel történő csendesítése csökkenti a myoblastok migrációját, az élősejtes mikroszkópia során csökken a sejtek által megtett távolság, a maximális sebesség és az átlagsebesség értéke random és irányított migráció esetén is. *In vitro* a migráció és a fúzió elkülönített vizsgálata lehetséges, mivel a konfluens tenyészet differenciáltatásával indukáljuk a sejtek fúzióját. A SDC4 csendesítés a myoblastok *in vitro* differenciációja során megemelte a MyoD myogenikus transzkripciós faktor mennyiségét, fokozta a dezmin pozitív myotubulusok képződését, a sejtek fúzióját, megemelte a fúziós (myotubulus sejtmag/összes sejtmag) és differenciációs (multinukleáris/összes sejtszám) indexet, megnövelte a képződött myotubulusok területét és hosszát. A Rac1 gátló NSC23766 kezelés hatására a SDC4 csendesítés fúziót fokozó hatása elmaradt. Modellünk alapján az *in vivo* regeneráció és az *in vitro* differenciáció előrehaladtával a SDC4 expresszió csökkenése teret enged a Rac1 aktivációjának, amely a myoblastok fúzióját eredményezi.

Támogatások: GINOP 2.3.2-15-2016-00040. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

## AZ ILLÉKONY ANESZTETIKUMOK GÁTOLJÁK A TRPM3 IONCSATORNÁT

Kelemen Balázs<sup>1</sup>, Vladár Anita<sup>1</sup>, Lisztes Erika<sup>2</sup>, Posta János<sup>3</sup>, Kulin Flóra<sup>1</sup>, Thomas Voest<sup>4</sup>, Bíró Tamás<sup>2</sup>, Tóth István Balázs<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet

<sup>2</sup>Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem Klinika Központ, Igazságügyi Toxikológia Labor, Igazságügyi Orvostani Intézet, Debrecen

<sup>4</sup>Laboratory of Ion Channel Research, Department of Cellular and Molecular Medicine and TRP Research Platform Leuven (TRPLe), KU Leuven, Leuven

Az illékony anesztetikumok (IA-k) a legelterjedtebben használt szerek az általános anesztézia fenntartására humán sebészeti beavatkozások és állatkísérletek során egyaránt. Habár hatásmechanizmusuk nem minden részlete ismert, általánosan elfogadott, hogy a reverzibilis tudatvesztéssel járó hatásukat részben a központi idegrendszer egyes ioncsatornáin (pl. GABA<sub>A</sub>, NMDAR, K2P csatornák) keresztül fejtik ki, de más ioncsatornák működését is befolyásolják. Hatással vannak egyes nociceptív és termoszenzitív tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák (TRPV1, TRPA1, TRPM8) működésére is, ami szerepet játszhat az IA-k egyes mellékhatásainak (pl. légúti irritáció) kialakulásában is. Jelen vizsgálataink során az IA-k hatását vizsgáltuk a nocicepcióban szintén szerepet játszó hőérzékeny TRPM3-ra.

Különböző kémiai szerkezetű IA-k (kloroform, halothane, isoflurane, sevoflurane) rekombináns és natív TRPM3-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk HEK293T sejteken és egér hátsógyöki ganglionokból izolált érző neuronokon *in vitro*. A csatorna aktivitását vagy fluoreszcens indikátorfestékeket (Fura-2 és Fluo-4) alkalmazva az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció mérésével követtük nyomon vagy patch clamp technika teljes sejtes konfigurációjában közvetlenül mértük a csatornán átfolyó transzmembrán áramokat.

A vizsgált IA-k dóziszfüggő módon gátolták a TRPM3 agonisták (pregnenolon szulfát (PS), CIM0216) által kiváltott Ca<sup>2+</sup> jeleket és transzmembrán áramokat a rekombináns TRPM3-at kifejező HEK293T sejteken. A vizsgált anesztetikumok közül a lepotensebb gátlószernek a halothane bizonyult (IC<sub>50</sub>: 0,52 mM, 10 μM PS jelenlétében. A korábbi irodalmi adatokkal összhangban a vizsgált IA-k a TRPM3-tól függetlenül Ca<sup>2+</sup> tranzienseket váltottak ki a szenzoros neuronok egy részén, ugyanakkor 1 mM-ban alkalmazva valamennyi IA jelentősen csökkentette a natív TRPM3 kémiai agonistákkal indukált aktivációját is. További eredményeink arra utalnak, hogy az IA-k a TRPM3 termális aktivációját is gátolhatják.

Eredményeink tovább bővítik ismereteinket az IA-k hatásmechanizmusáról valamint új típusú, potenciális fájdalomcsillapító TRPM3 gátlószerek fejlesztéséhez is hozzájárulhatnak.

Rövidítések: TRP – Tranziens receptor potenciál; TRPV1 – Tranziens receptor potenciál vanilloid 1; TRPA1 – Tranziens receptor potenciál ankirin 1; TRPM3/8 – Tranziens receptor potenciál melastatin 3/8; IA – illékony anesztetikum; GABA<sub>A</sub> – gamma-amino vajsav receptor A; NMDAR - N-metil-D-aszparaginsav receptor, K2P – kétpórusú kálium csatorna; PS – pregnenolon-szulfát

## A GM-CSF JELÁTVITEL ÉS A RECEPTOR INTERNALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY MESOTHEL SEJTEKBEN

Zsiros Viktória, Katz Sándor, Dóczy Nikolett, L. Kiss Anna  
Simmelweis Egyetem, Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

Korábbi munkánkban igazoltuk, hogy Freund adjuváns indukálta gyulladás során a patkányok hashártyájának mesothel sejtjei elveszítik hám tulajdonságaikat és mesenchymális sejtekké differenciálódnak (EMT II). Kimutattuk, hogy e folyamat során a hámsejtek makrofág markereket (pl. ED1) expresszálnak, gyulladással citokineket (GM-CSF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) termelnek, és receptoraikat expresszálják. *In vitro* kísérleteink, - amelyekben primer hashártya tenyészetet kezeltünk GM-CSF-el, TGF- $\beta$ -val, valamint a két citokin elegyével -, alátámasztották, hogy: 1) mindkét citokin hasonló fenotípusos átalakulást indukál, mint a Freund adjuváns; 2) GM-CSF kezelés hatására fokozódik az ED1 expressziója; 3) a mesothel sejtek GM-CSF-t termelnek, és GM-CSF receptort expresszálnak.

Kísérleteink során egyértelművé vált, hogy a GM-CSF jelátviteli folyamatához a receptor-ligand internalizációja elengedhetetlen. A GM-CSF kezelés a sejtfelszíni vezikulák számát lecsökkentette, indukálta a mesenchymális átalakulást, és fokozta a sejtek ED1 expresszióját. Dynasore kezeléssel - dynamin gátlása révén - gátoltuk a caveolák- és clathrin-burkos vezikulák lefűződését, és azt tapasztaltuk, hogy a dynasore kezelés hatására, azzal párhuzamosan a felszínnel összeköttetésben álló vezikulák száma drasztikusan megnőtt, és a dynasore-GM-CSF kombinált kezelés után a sejtek nem expresszálták az ED1 markert.

Jelen munkánkban arra kerestünk választ, hogy a receptor milyen útvonalon internalizálódik, és milyen endocitotikus vezikulákban (korai, késői és reciklizáló endoszóma) mutatható ki a jelátviteli folyamat során. Immuncitokémiai vizsgálatokkal és statisztikai elemzéssel vizsgáltuk a jelátvitel beindításáért felelős GM-CSF receptor  $\beta$  kolokalizációját különféle endocitotikus markerekkel (Cav-1, EEA1, Rab7, Rab11).

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$  caveolák közreműködésével internalizálódik a mesothel sejtekben. A gyulladás korai időpontjaiban a GM-CSF receptor korai endoszómákba szállítódik, ahol az EMT-hez szükséges jelátviteli folyamatok végbemennek. A gyulladás előrehaladtával, a késői endoszómákban detektálható receptor mennyisége jelentősen megnő, jelezvén, hogy a receptorok degradálódnak, és megindul a regeneráció.

**Rövidítésjegyzék:** EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), Cav-1 (Caveolin-1), EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), Rab (Ras-relatedGTP-binding protein)

## NATÍV FORGÓ ATPÁZ OSZCILLÁLÓ ELEKTROMOS TÉRBEN

Páli Tibor

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

A membrán-kötött bio-makromolekuláris komplexeknek van egy olyan osztálya, amelynek kulcsszerepe van számos normál életfolyamatban és betegségekben, és az ide tartozó fehérjekomplexek működése során azok a legyeseinek egy csoportja forgó mozgást végez a komplex többi részéhez képest [1]. A vakuoláris proton-ATPáz (V-ATPáz) egy molekuláris forgómotor, amely az ATP hidrolíziséből nyert kémiai energiát felhasználva protont szállít a membránon keresztül. Eukariota sejtekben a V-ATPáz tartja fenn a sejt-kamrák és a sejtek közötti tér közegének a citoplazmáénál alacsonyabb pH-ját.

A forgó enzimekben zajló forgás sebességének megmérése korábban csak az enzim genetikai, kémiai és fizikai módosításával volt lehetséges, és az enzimet el kellett távolítani natív membrán környezetéből [2]. E következmények elkerülése érdekében méréseinkben olyan élesztő vakuólumból készített lipid vezikulákat használtunk, amelyek nagy koncentrációban tartalmaznak V-ATPáz [3]. Azt vizsgáltuk – a V-ATPáz esetében elsőként –, hogy oszcilláló transz-membrán elektromos tér hogyan befolyásolja a V-ATPáz működését. Az aktivitásnak az elektromos tér frekvenciájától való függéséből sikerült meghatároznunk – elsőként – a forgó mozgás sebességét natív V-ATPázban, és új adatokat kaptunk az

enzimátikus forgó mechanizmusról is [4]. Vizsgáltuk a V-ATPáz működését komplex elektromos hullámformák esetén is.

Támogatás: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (K 101633, K 112716),

GINOP-2.3.2-15-2016-00001 program.

Irodalom:

[1] Zhao J, Benlekbir S, Rubinstein JL (2015) Nature, 521: 241-245.

[2] Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinoshita K, Itoh H (2001) Nature 410: 898-904.

[3] Ferencz C, Petrovszki P, Kóta Z, Fodor-Ayaydin E, Haracska L, Bota L, Varga Z, Dér A, Marsh D,

Páli T (2013) Eur Biophys J, 42: 147-158.

[4] Ferencz Cs-M, Petrovszki P, Dér A, Sebők-Nagy K, Kóta Z, Páli T (2017) Scientific Reports 7: 45309.



**A MEMBRÁN SZTEROLOK CÉLPONTJÁNAK MEGHATÁROZÁSA FESZÜLTÉG-FÜGGŐ K<sup>+</sup> CSATORNÁKON FESZÜLTÉG-ZÁR FLUOROMETRIÁVAL**

Varga Zoltán, Zákány Florina, Papp Ferenc, Kovács Tamás, Nagy Péter, Panyi György

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A feszültség-függő ioncsatornában membránpotenciál változás hatására a feszültség-érzékelő domén (VSD) elmozdul, és csatolás révén a pórus nyitását eredményezi, létrehozva az ionáramlást. A membránlipidek módosíthatják a feszültség-függő ioncsatornák kapuzását különböző nem-specifikus és specifikus mechanizmusokon keresztül. Ismert, hogy a koleszterin és a 7-dehidrokoleszterin (7-DHC) nagy mértékben megváltoztatja a Kv1.3 csatorna kapuzását (az aktiváció feszültség-függésének eltolódása, lassabb aktiváció, áramamplitúdó csökkenése), de nem világos, hogy e hatások a feszültség-érzékelő doménen, vagy a pórus doménen (PD) keresztül valósulnak-e meg.

Célunk annak meghatározása volt, hogy membrán szterolok fő célpontja a VSD, a PD, vagy a kettő közötti csatolás. A hatás specificitásának megállapításához a kísérleteket elvégeztük két különböző szerkezetű és kapuzási mechanizmusú csatornán: a szorosabb Kv1.3, és a lazább VSD-PD csatolású Kv10.1 csatornákon.

Az áramokat feszültség-zár fluorometria (VCF) technikával rögzítettük *Xenopus laevis* oocita expressziós rendszeren. A VSD mozgásának követéséhez ahhoz közeli, specifikus extracelluláris ciszteineket jelöltünk fluoreszcens festékkel.

Eredményeink szerint, míg a szterolok sem a VSD feszültség-függését, sem mozgásának kinetikáját nem módosították, mindkét paraméter változott a pórus esetén. Hasonló változásokat figyeltünk meg mindkét csatornában. Zaj-analízist alkalmazva azt találtuk, hogy míg a szterolok a csatornák nyitási valószínűségét nem befolyásolták, addig az egyedi csatorna vezetőképesség csökkent.

Eredményeink arra utalnak, hogy a koleszterin és a 7-DHC közvetlenül a pórus doménre hatva fejtik ki hatásukat, és nem a membránban mozgó VSD-n keresztül. A hatás valószínűleg nem specifikus kötőhelyeken keresztül valósul meg. A megemelt szterol tartalom a membrán viszkozitásának vagy mechanikai feszülésének változása révén lassíthatja a pórus nyitását és okozhatja a vezetőképesség csökkenését.

Rövidítések: VSD (Voltage Sensing Domain) = feszültség-érzékelő domén, PD = pórus domén, 7-DHC = 7-dehidrokoleszterin, VCF (Voltage-clamp fluorometry) = feszültség-zár fluorometria

A MEMBRÁNKÖRNYEZET ÉS A FEHÉRJE KONFORMÁCIÓ HATÁSA EPIDERMÁLIS NÖVEKEDÉSI  
FAKTOR RECEPTOR LIGANDKÖTÉSÉRE

Hajdu Tímea<sup>1</sup>, Kovács Tamás<sup>1</sup>, Szöllősi János<sup>1,2</sup>, Nagy Péter<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Biofizikai Tanszék

<sup>2</sup>MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport

A receptor tirozin-kinázok csoportjába tartozó epidermális növekedési faktor (EGF) receptorok fontos szerepet töltenek be az élő szervezetben, hatással vannak a sejtek növekedésére, a sejt differenciációs folyamatokra és az intracelluláris jelátviteli utakra. Munkám során azt tanulmányoztam, hogy a sejtek EGF-kötődésében megfigyelhető-e valamilyen jellegű kooperativitás, illetve, hogy az milyen tényezőktől függ.

Kísérleteimhez tetrametil-rodaminnal konjugált EGF-et használtam, amelyből hígítási sort készítettem, majd ezen oldatokhoz adtam a sejteket. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Aria III áramlási citométeren mértem. Eredményeimet a Hill-egyenlettel illesztettem, amelyben a Hill-koeficiens érték ( $n$ ) jellemzi a kötődés kooperativitását, amennyiben ez 1 felett alakul, akkor pozitív kooperativitás áll fenn. A ligandkötés affinitását a disszociációs konstans ( $K_d$ ) jellemzi.

A431 (humán epidermoid karcinóma) sejteket latrunculinnal kezeltem, amely meggátolja az aktin polimerizációját. A toxinnal kezelt sejtek EGF-kötési kooperativitása és affinitása lecsökkent a kontrollhoz képest.

Annak tanulmányozására, hogy az EGFR megfelelő glikoziláltsága befolyásolja-e a ligandkötést, tunicamycin kezelést végeztem, amely glikoziláció gátló hatásáról ismert. A kezelés hatására a Hill-együttható lecsökkent. Az EGFR deglikoziláltságát western blot vizsgálatokkal is alátámasztottuk.

Vizsgáltam, hogy a sejtek felszínén kifejeződő EGF receptor mennyisége hatást gyakorol-e a ligandkötés kooperativitására, így RNS interferenciával csökkentettem a sejtekben az EGFR expresszióját. Mivel ezen kísérletekhez EGFR-GFP-vel stabilan transzfektált A431 sejt vonalat használtam, a GFP intenzitásból következtethetünk az expresszió csökkenésére. Az eredmények alapján a legalacsonyabb GFP intenzitással rendelkező sejtek Hill-koeficiens és ligandkötési affinitása lecsökkent a nem transzfektált sejtekhez képest.

Sikerült kideríteni azt is, hogy az intracelluláris kináz-domén konformációváltozásai hatást gyakorolnak-e az EGF-kötődésre. Eredményeink azt mutatják, hogy az erlotinib, amely I-es típusú kináz-inhibitor, vagyis a kináz-domén aktív konformációjához kötődik, megnövelte a ligandkötési affinitást, míg a lapatinib, amely a kináz-domén inaktív konformációját köti és stabilizálja, lecsökkentette az EGF-kötődés affinitását.

Összegésképpen elmondható, hogy az EGFR megfelelő glikozilációja és citoszkeletonhoz való kihorgonyzódása szükséges a pozitívan kooperatív EGF-kötődéshez. Emellett a receptor expresszió szintje és az intracelluláris kináz-domén működése is döntően befolyásolja a ligandkötés kooperativitását és affinitását.

**Rövidítések:**

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

GFP: Green Fluorescent Protein

MEMBRÁNSZINTŰ STRESSZKUTATÁS: MIT TANULHATUNK A HASADÓ ÉLESZTŐTŐL?

Gudmann Péter<sup>1</sup>, Péter Mária<sup>1</sup>, Gombos Imre<sup>1</sup>, Pilbat Annamária<sup>2</sup>, Horváth Ibolya<sup>1</sup>, Török Zsolt,<sup>1,2</sup>  
Balogh Gábor<sup>1</sup>, Vígh László<sup>1</sup>, Glatz Attila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA SzBK Biokémiai Intézet, Molekuláris Stresszbiológiai Csoport, <sup>2</sup>LipidArt Kft.,

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik a membránok és a dajkafehérjék hőstresszválaszban betöltött szerepével. Korábban – főként prokarióta modelleken – igazoltuk, hogy egyes dajkafehérjék (főleg az sHsp-k) *in vitro* és *in vivo* is képesek membránokhoz kötődni, ellensúlyozandó a hősokk “fluidizáló” hatását. Kimutattuk azt is, hogy izoterm körülmények között a membrán fizikai állapotát befolyásoló szerek hősokkválaszt indukálnak, azaz a membránok a sejtek (egyik) hőmérői [1]. Az elmúlt években kutatásainkat kiterjesztettük eukarióta szervezetekre is.

Az emlős sejtek mellett kiegészítő modellként bevezettük a molekuláris biológiai szempontból jól használható, az emlősökhöz nagyon hasonló, lipid- és membránbiokémiai szempontból azonban kevésbé jellemzett hasadó élesztőt (*Schizosaccharomyces pombe*). Kimutattuk, hogy az *S. pombe* követi a homeoviszkozus adaptáció elvét, azaz hőmérsékletemelés hatására csökkenti membránlipidjeinek telítettségét, valamint növeli a PC/PE arányt. Megállapítottuk, hogy a hasadó élesztő mindkét  $\alpha$ -krisztallin típusú sHsp-je képes modellmembránokhoz kötődni és asszociációjuk határozott lipidpreferenciát mutat [2]. Kísérleteink során feltűnt, hogy hősokk hatására jelentősen megnőtt a lipid droplet egyik fő komponensének, a triacilglicerolnak mind a mennyisége, mind pedig a telítetlensége. A triacilglicerol szintéziséért felelős két gén inaktiválása után a sejtek – egyebek mellett – nagyon hőérzékennyé is válnak. Az egyes mutánsok lipidomikai analízise során számos, jól reprodukálható lipidváltozást mértünk nemcsak hősokk, hanem normál körülmények között is [3]. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy az *S. pombe* a lipid/membránszintű stressz kutatás kiváló alternatív modellje.

Rövidítések:

sHsp: kis mólsúlyú hősokk fehérje

*S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*

PC/PE: foszfatidilkolin/foszfatidiletanolamin

Irodalom:

[1] Török et al. (2014) *Biochimica et Biophysica Acta* **1838**: 1594–1618.

[2] Glatz et al. (2016) *Cell Stress and Chaperones* **21**: 327–338.

[3] Péter et al. (2017) *PLoS ONE* **12(3)**:e0173739.

**VISUALIZATION OF TRANSPORT PROCESSES BETWEEN IMMUNE CELLS  
KÖZÖTTI TRANSPORTFOLYAMATOK VIZUALIZÁLÁSA**

Alireza Ghadaksaz<sup>1</sup>, Madarász Tamás<sup>1</sup>, Halász Henriett<sup>1</sup>, Osteikoetxea-Molnár Anikó<sup>2</sup>, Tóth Eszter Angéla<sup>2</sup>, Huber Krisztina<sup>2</sup>, Nyitrai Miklós<sup>1,3</sup>, Matkó János<sup>2</sup>, Szabó-Meleg Edina<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet

<sup>2</sup> Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Immunológiai Tanszék

<sup>3</sup> Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont

Az élő szervezetek megfelelő működéséhez elengedhetetlenek a különböző sejtnyúlványokon keresztül megvalósuló kommunikációs és anyagtranszport folyamatok. Ezek a nyúlványok rendkívül változatos struktúrák. A sejtfüggelékek egyik jellegzetes típusát képviselik a membrán nanocsövek. Ezek - a többi membránkitüremkedéstől eltérően – egymástól távol elhelyezkedő sejtek közvetlen kommunikációját is lehetővé teszik azáltal, hogy fizikailag összekapcsolják ezeket a sejteket, folytonos csatornát kialakítva azok citoplazmája között. A nanocsövek biológiai jelentőségét in vitro már sokrétűen bizonyították: a membrán nanocsövek számos intercelluláris transzportfolyamatot bonyolítanak, nemcsak ionok, mRNS, miRNS, vezikulumok, sejtorganellumok (pl. lizoszóma, mitokondrium) és fehérjék transzportjában vesznek részt, de prionok, baktériumok, vírusok számunkra kedvezőtlen intercelluláris szóródását is elősegíthetik. A különféle típusú tumor sejtek is képesek nanocsőhálózatokon keresztül kommunikálni egymással: ilyen módon képesek pl. egymás között mitokondriumok, rezisztencia faktorok cseréjére.

A nanocsövek nemcsak a fent említett, orvosi szempontból is releváns funkciók miatt kerültek kutatásaink középpontjába: számos patológiás folyamatban, pl. gyulladással vagy neurodegeneratív állapotokban feltételezik a membrán nanocsöveken keresztüli intercelluláris kommunikáció lényeges szerepét. Az immunrendszer sejtjei közötti kommunikáció is számtalanszor nanocsövek segítségével zajlik, lényeges immunszabályozó funkciókkal kísérve. A legszélesebb ismeretanyag a nanocsövekről az immunrendszer sejtjein áll rendelkezésre. Ugyanakkor a B sejtek között kialakult nanocsövekről különösen kevés információ áll rendelkezésre a szakirodalomban, ezért munkánk során elsősorban eger eredetű B sejt vonalak között kialakult nanocsöveket, illetve ezek transzport tulajdonságait vizsgáltuk. Nagyfelbontású SIM, ill. konfokális lézer-pásztázó mikroszkópiai technikák segítségével vizualizáltuk a vezikulumok illetve az immunrendszer működését szabályozó kostimulátor fehérjék nanocsöveken keresztül történő transzportját, a CD86 fehérje endogén valamint exogén mintázatát, megfigyeltük a vezikulumok internalizációját, lokalizációját, sebességeloszlását, az érett, ill. éretlen B sejtek vezikulumképzésének különbségeit.

Vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a B-sejtek kiterjedt nanocsőhálózat létrehozására képesek. Ezeken a csöveken keresztül intenzív anyagtranszport folyamatok zajlanak, amelyek hatékonyabbá tehetik az antigén-függő T-sejt aktivációt.

Osteikoetxea-Molnár et al., Cell Mol Life Sci. 2016.

Munkánkat az EFOP-3.6.1-16-2016-00004, az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4-IV kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program és a GINOP-2.3.2-15-2016-00036 pályázat támogatta.

DNS – deoxiribonukleinsav RNS - ribonukleinsav

SIM - structured illumination microscopy (strukturált megvilágítású mikroszkópia)

**A P-GLIKOPROTEIN (ABCB1) MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA  
NUKLEOTID-KÖTŐHELY MUTÁNSOK SEGÍTSÉGÉVEL**

Goda Katalin<sup>1</sup>, Tarapcsák Szabolcs<sup>1</sup>, Thomas Stockner<sup>2</sup>, Szöllösi Dániel<sup>2</sup>, Gyöngy Zsuzsanna<sup>1</sup>, Szalóki Gábor<sup>1</sup>, Ágics Beatrix<sup>1</sup>, Türk Dóra<sup>3</sup>, Szabó Gábor<sup>1</sup>, Szakács Gergely<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet,  
<sup>2</sup>Institute of Pharmacology Center for Physiology and Pharmacology<sup>3</sup>, Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet<sup>4</sup>, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Comp

A P-glikoprotein (Pgp, ABCB1) az ATP-kötő kazettás (ABC) transzporterek fehérjecsaldójának tagja. A Pgp két transzmembrán doménből (TMD) és két nukleotid-kötő doménből (NBD) épül fel. Kristályszerkezeti vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a Pgp a citoplazma felé nyitott nagy szubsztrát affinitású és az extracelluláris tér felé nyitott alacsony szubsztrát affinitású TMD konformáció között fluktuálva távolítja el szubsztrátjait a sejtekből, melyhez az energiát az NBD-k ATP kötés általi dimerizációja és az ATP hidrolízise során történő szétválása biztosítja. Azonban a nagy mennyiségű strukturális és funkcionális információ ellenére továbbra sem ismert pontosan, hogy a két NBD hogyan működik együtt a katalitikus ciklus során. Hogy többet tudjunk meg a két NBD szerepéről az ATP kötésben és hidrolízisben kulcsszerepet játszó szekvencia motívumokban mutációt hordozó Pgp variánsokat vizsgáltunk. Bár a kiválasztott konzervált Walker A (K433M/K1076M), Walker B (D555A/D1200 vagy E556Q/E12001Q) és A-loop (Y401A/Y1044A) szekvenciák az ATP kötésében és hidrolízisében különböző szerepet játszanak, korábbi vizsgálatok alapján mind az egy vagy mindkét oldali NBD-kben mutációt hordozó fehérjék inaktívnak bizonyultak heterológ expressziós rendszerekben kifejezve vagy tisztított fehérjék alkalmazása esetén. Kísérleteinkben olyan emlős sejtvonalakat hoztunk létre, melyek nagy mennyiségben fejezik ki a mutáns fehérjéket és így természetes membrán környezetükben vizsgálhattuk működésüket.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a kétoldali mutánsok nem képesek sem ATP hidrolízisre, sem konformáció változásokra, azonban a féloldali mutánsok megőrizték ezt a képességüket. Calcein-AM akkumulációs és citotoxicitási vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az egyoldali Walker A és A-loop mutáns fehérjék képesek a szubsztrátok koncentráció gradiens ellenében történő transzportjára is, míg az egyoldali Walker B mutánsok nem mutatnak transzport aktivitást. Eredményeink lehetséges magyarázata, hogy egy intakt ATP kötőhely is elégséges annak a biztosítására, hogy a fehérje ismételten áthaladva a katalitikus cikluson képes legyen a szubsztrátok effektív transzportjára, amennyiben a mutáció lehetővé teszi az NBD dimer ismételt keletkezését és felbomlását. Hipotézisünk megerősítésére jelenleg molekuláris dinamikai szimulációkat végeznek kollaborációs partnereink.

**Köszönetnyilvánítás**

GINOP-2.3.2-15-2016-00044; GINOP-2.2.1-15-2017-00079; OTKA támogatások: K124815, PD75994; Szodoray ösztöndíj (Goda Katalin)

A DAAM FORMIN SZEREPE A MIKROTUBULUSOK ÉS AKTIN-FILAMENTUMOK  
DINAMIKÁJÁNAK KOORDINÁLÁSÁBAN AZ AXONÁLIS NÖVEKEDÉSI KÚP  
TERÜLETÉN

Földi István<sup>1</sup>, Szikora Szilárd<sup>1</sup>, Tóth Krisztina<sup>1</sup>, Vig Andrea<sup>2</sup>, Migh Ede<sup>1</sup>, Kaltenecker Péter<sup>1,3</sup>,  
Bugyi Beáta<sup>2</sup>, Natalia Sanchez-Soriano<sup>3</sup>, Mihály József<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Szeged

<sup>2</sup> Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet, Pécs

<sup>3</sup> University of Liverpool, Department of Cellular and Molecular Physiology, Liverpool, UK

Az axonok irányított növekedését a disztális végükön elhelyezkedő növekedési kúp szabályozza. A növekedési kúp elmozdulását az aktin és mikrotubulus sejtvázs összehangolt átrendeződése teszi lehetővé. Ezen változások koordinálásában számos citoszekelton-asszociált fehérje játszik szerepet. Ezen szabályozó faktorok közé tartoznak a formin-típusú fehérjék, melyek elsősorban az aktin processzálasban betöltött szerepükről ismertek. A forminok képesek aktint nukleálni, valamint az aktin polimerek növekvő végéhez kapcsolódva elősegítik az el nem ágazó aktin filamentumok képződését. Mára az is általánosan elfogadott, hogy a forminok szintén szerepet játszanak a mikrotubulusok dinamikájának szabályozásában, azonban ennek a pontos mechanizmusa még nem ismert.

Kutatócsoportunk már leírta, hogy a *Drosophila* DAAM (dishevelled-associated activator of morphogenesis) formin fontos szerepet játszik az idegrendszer megfelelő fejlődésében. Mutáns állatok vizsgálata megmutatta, hogy a DAAM hiányában erősen sérül az idegrendszer szerveződése, amely elsősorban bizonyos idegsejtek axonjainak nem megfelelő növekedése miatt alakul ki. A DAAM hiányában bekövetkező axonális növekedés sérülése sejtes szinten is kimutatható primer neuronális sejt kultúrákban. Ezen kultúrák előnye, hogy nagy felbontással vizsgálhatóak az egyes sejtvázs elemek fixált és élősejtes kísérletekben egyaránt. Az itt bemutatott primer neuronális kísérletekben megvizsgáltuk a DAAM axonális mikrotubulus dinamikára gyakorolt hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy DAAM hiányában megváltozik a mikrotubulusok dinamikája, ami feltételezhetően a mikrotubulusok csökkent stabilitásával van összefüggésben. A sejtes kísérletek mellett biokémiai vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a DAAM képes közvetlen fizikai interakcióra a mikrotubulusokkal, valamint stabilizálja azokat *in vitro*. Emellett, lokalizációs és fehérje interakciós kísérletek azt is bizonyították, hogy a közvetlen kölcsönhatás mellett a DAAM képes interakcióba lépni a mikrotubulus plusz-vég komplexszel, ami a mikrotubulus dinamika szabályozásának egy alternatív módját sugallja.

Eredményeinkkel azt bizonyítottuk, hogy a DAAM az aktin sejtvázs szabályozása mellett közvetlen hatással van a mikrotubulusokra, ezáltal fontos szerepet játszik a növekedési kúp sejtvázs elemeinek koordinációjában. A jövőben szeretnénk jobban megérteni ezen koordinációs aktivitás mechanizmusát, valamint feltérképezni a DAAM és mikrotubulusok közötti direkt és indirekt interakciós módokat.

**PODOCIN OLIGOMERIZÁCIÓ SZEREPE AUTOSZOMÁLIS RECESSZÍV  
NEPHROSISBAN**

Gusztáv Schay, Pál Stráner, Eszter Balogh, Gusztáv Schay, Christelle Arrondel, Ágnes Mikó, Gerda L'Auné, Alexandre Benmerah, András Perczel, Dóra K. Menyhárd, Corinne Antignac, Géraldine Mollet, Kálmán Tory

Semmelweis Egyetem

Podocin, a membrane-anchored component of the slit diaphragm, is encoded by *NPHS2*, the major gene mutated in hereditary podocytopathies. We formerly showed that its most frequent non-silent variant, R229Q, is only pathogenic when trans-associated to specific 3' mutations and suggested the causal role of an abnormal oligomerization. Here we show that podocin oligomerization occurs exclusively through the C-terminal tail (residues 283-382): through the first C-terminal helical region (H1, 283-313), which forms a coiled coil, and through the 332-348 region. Though we found the oligomerization not to be a prerequisite for membrane targeting, oligomerizing podocin variants strongly influence each other's localization, blocking or even restoring the membrane targeting. As such, oligomerization with membranous podocin variants with an intact C-terminal tail rescues the endocytosis of podocin mutants lacking the region distal to F344. Thus, oligomerization mediates interallelic interactions, potentially modifying the pathogenicity of trans-associated *NPHS2* alleles.

## AUTOREGULÁCIÓS MECHANIZMUSOK A MIOZIN 16 MOTORFEHÉRJE MŰKÖDÉSE SORÁN

Kengyel András<sup>1,2</sup>, Telek Elek<sup>1,2</sup>, Holló Alexandra<sup>1</sup>, Nyitrai Miklós<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet

<sup>2</sup> Szentágothai János Kutató Központ

<sup>3</sup> MTA-PTE Nukleáris-Mitochondriális Interakciók Kutató Csoport

A miozin 16 (Myo16) egy kevésbé ismert, nem-konvencionális motorfehérje, melyet elsőként idegszövetben mutattak ki, legnagyobb mennyiségben a késői embrionális és a korai posztnatális időszakban. A Myo16 érintettségét később több neurológiai kórképpel is összefüggésbe hozták: túlexpresszióját skizofréniában, hiányát autizmusban írták le. A Myo16 szerkezeti sajátosságai az N-terminális részen, a motor domén előtt található ankyrin ismétlődéseket tartalmazó domén (Myo16Ank), ami szerkezeti hasonlóságot mutat a miozin foszfatáz holoenzimben a protein foszfatáz-1 katalitikus alegységhez (PP1c) kapcsolódó regulátor alegységgel, valamint a rendezetlen szerkezetű, prolinban gazdag C-terminális farok domén (Myo16Tail), ami egyrészt a fehérje maglokalizációjáért felelős, másrészt foszforiláció révén bekapcsolódik az PI3K jelátviteli útbá és részt vesz a citoskeleton reorganizációjában. A Myo16 képes bejutni a sejtmagba, feltételezések szerint a PP1c magba juttatása lehet az egyik funkciója.

Kutatásunk célja elsődlegesen a miozin 16 motorfehérje szerkezeti elemeinek biokémiai karakterizálása, szabályozásának, interakcióinak leírása volt. Vizsgálatainkhoz izolált rekombináns Myo16Ank és Myo16Tail fehérjéket használtunk, melyeket fluoreszcencia spektroszkópiái, valamint mikroszkópos módszerekkel vizsgáltunk. Elsőként a Myo16Ank szerepét vizsgáltuk a miozin motor funkcióra, vázizom miozin modell rendszerben. Az eredmények azt mutatták, hogy a Myo16Ank közvetlenül köti a motor domént (KD ~ 2,4  $\mu$ M) és fokozza annak aktin-aktivált ATPáz aktivitását, valamint az *in vitro* motilitási próba során a Myo16Ank jelenléte koncentráció függő módon fokozta az aktin filamentumok motilitási sebességét.

A Myo16Tail vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy alacsony affinitással képes kötődni a Myo16Ank doménhez. Feltételezzük, hogy a Myo16 motor funkcióját a Myo16Ank közvetlen hatása mellett a visszahajló C-terminális domén is szabályozza.

Myo16: miozin 16; Myo16Ank: miozin 16 ankyrin domén; Myo16Tail: miozin 16 farok domén; PP1c: protein foszfatáz katalitikus alegység; PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz



## A hTMEM266 TRANZMEMBRÁN FEHÉRJE TULAJDONSÁGÁNAK FELDERÍTÉSE

Papp Ferenc, Varga Zoltán, Panyi György

Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A hTMEM266 egy olyan transzmembrán fehérje, melynek funkciója egyelőre nem ismert. Nagy hasonlóságot mutat a Hv1 szekvenciájával, viszont a Hv1-vel ellentétben proton-áramot nem vezet. 531 aminosavból áll, melyből kiindulva a hidrofóbicitási profilja alapján négy transzmembrán (TM) alfa hélixet lehet előre jelezni, ami előtt és után egy kb. 100 és kb. 310 aminosavat tartalmazó N- és C-terminális rész helyezkedik el. A négy TM egyértelmű hasonlóságot mutat az ún. S1-S4 feszültség-érzékelő doménhez (VSD), ami megtalálható a feszültség-kapuzott ioncsatornáknak, valamint a VSP-ben is. Azonban az N- és C-terminális részek nem hasonlítanak egyetlen ismert fehérjéhez sem. Elkészítettünk egy homológia-modellt a Phyre2 szerver segítségével, kiindulási alapként használva a Hv1 röntgenkristallográfiás szerkezeti modelljét.

Mindezen információk alapján hipotézisünk az, hogy ez a fehérje képes érzékelni a sejt membránpotenciál-változásait annak ellenére, hogy nem működik ioncsatornaként. A kísérleteink célja, hogy megmutassuk a hTMEM266 fehérje képes feszültségfüggő konformáció-változásokon keresztül menni. Ilyen jellegű vizsgálatokhoz az egyik leghatékonyabb módszer az ún. VCF technika, amivel elektromosan csendes fehérjék feszültségérzékelő képességét is ki lehet mutatni. E technikához olyan aminosav-pozíciót kell azonosítani a vizsgálni kívánt fehérjében, melyeket ciszteinre mutálva és fluorofórral megjelölve, a membránpotenciál megváltozásának hatására megváltozik az emittált fluoreszcencia-intenzitás. Eredményeink azt mutatják, hogy több olyan aminosav pozíció is van az S4 szegmens extracelluláris végéhez közel, ahol a sejt membránpotenciáljának megváltozásakor megváltozik az emittált fluoreszcencia-intenzitás is.

Mivel a cink gátolja a Hv1-et és mivel a TMEM266 nagy hasonlóságot mutat a Hv1-vel, ezért megnéztük, hogy van-e hatása a cinknek a TMEM266 fluoreszcenciás jelére. Az eredmények azt mutatják, hogy mind a jel alakja, mint annak nagysága megváltozott a cink jelenlétében.

Ezen felül megvizsgáltuk több vízben oldható fluoreszcencia-kioltó hatását is a TMEM266 fluoreszcens jelére a membránpotenciál függvényében. Depolarizáció hatására nagyobb fluoreszcencia-kioltást mértünk, ami alátámasztja az S4 kifelé történő mozgását feltételező hipotézisünket.

Mindezen eredményeink igazolják hipotézisünket, mely szerint a hTMEM266 képes érzékelni a sejt membránpotenciál változását.

Hv1: feszültség-kapuzott proton csatorna

TM: transzmembrán

VSD: feszültség-érzékelő domén

VSP: feszültség-kapuzott foszfatáz

VCF: Voltage Clamp Fluorometry

**IMPORTANCE OF BINDING KINETICS IN MEMBRANE INTERACTIONS USING  
BENCHTOP SPR**

Sarah Strathearn  
Nicoya lifescience Ltd.  
226-283 Duke St W, Kitchener, ON N2H 3X7, Canada

The key to many research projects is understanding the binding interactions between biomolecules. Most common techniques like western blots, pull-down assays and co-immunoprecipitation can only tell you if binding is occurring or not. This is very limited information, as many things in the biological world interact to some degree. To fully characterize an interaction, you need to look at what is happening in real time – the binding kinetics of the interaction. Detailed information such as on and off rates add more value in addition to yes/no binding and affinity constants, and are critically important to fully understanding the biological system that is being studied. The binding kinetics of protein, membrane, peptide and small molecule interactions were studied using a label-free surface plasmon resonance (SPR) analysis technique with the OpenSPR, a novel benchtop LSPR sensor technology. Each interaction measured displayed binding affinities ( $K_D$ ) from the pM to mM range, with on-rates ( $k_a$ ) from  $10^3 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  and off-rates ( $k_d$ ) from  $10^{-2} - 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . The on and off-rates of the kinetic interactions can distinguish minute differences in the binding kinetics of mutations or variations introduced into the biomolecules studied. Surface plasmon resonance is a highly versatile label-free interaction analysis technique, vital for understanding biological systems.

## B LIMFOCITÁK FUNKCIÓINAK SZABÁLYOZÁSA VELESZÜLETETT IMMUNELEMEK ÁLTAL

Erdei Anna<sup>1,2</sup>, Mácsik-Valent Bernadett<sup>1</sup>, Fazekas László<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológiai Tanszék,

<sup>2</sup>MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport

Az immunrendszer működésében a B limfociták kulcsszerepet játszanak: ellenanyagtermelő képességük mellett az immunfolyamatokat szabályozó citokineket termelnek és antigénbemutató sejtnek is hatékonyan működnek. Mivel az immunválasz kialakításában és az immunhomeosztázis fenntartásában a veleszületett immunrendszer elemeinek – köztük a komplementrendszernek és a kórokozók jellemző molekuláris mintázatát felismerő receptoroknak – meghatározó szerepük van, kutatásaink során ezen elemek és a B sejtek kölcsönhatását vizsgáljuk.

Ismert, hogy az emberi B limfocitákban kifejeződő Toll-Like receptorok (elsősorban a TLR7 és a TLR9) fokozzák a patogénekre adott humorális immunválaszt, továbbá kimutattuk korábban, hogy az 1-es típusú komplementreceptor (CR1, CD35) gátolja az antigénkötő receptoron (BCR) keresztül kiváltott aktivációt. Mivel a szervezetbe jutó patogének többsége aktiválja a komplementrendszert, a kialakuló immunkomplexek a B-sejtek mindhárom említett receptorához (BCR, TLR, CR1) kötődhetnek. Fontos tehát, hogy megismerjük az e struktúrák között kialakuló párbeszéd funkcionális következményeit.

Kísérleteinkben emberi mandulából izolált B sejtek válaszát vizsgáljuk BCR, CR1 és TLR ligandumkötését követően. A két- illetve három receptor stimulálásának következményét több módszerrel követjük. A sejtek aktiváltására utaló sejt felszíni markereket (pl. CD69) áramlási citométerrel mutatjuk ki, a sejtek proliferációját triciált timidin beépülésének mérésével, a sejtek ellenanyag-válaszát ELISPOT módszerrel, citokintermelését (pl. IL-6) ELISA technikával követjük.

Eredményeink szerint a B-sejtek BCR-en és TLR 7, illetve TLR 9-en keresztül történő aktiválását a CR1 jelentősen gátolja. Kiemelendő, hogy a CR1 a csak a TLR9 általi (vagyis a BCR-től független) aktivációt is hatékonyan gátolja, míg a TLR7 hatását nem befolyásolja.

Mindez egy eddig nem ismert, immunkomplexek által kiváltható kölcsönhatásra utal a BCR, CR1 és TLR között, ami jelentős mértékben szabályozhatja a B sejtek funkcióit.

Rövidítések: BCR – B sejt receptor, CR1 – 1-es típusú komplement receptor, TLR – Toll Like Receptor

## AZ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK A VELESZÜLETETT ÉS ADAPTÍV IMMUNITÁSBAN

Buzás Edit

Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Az elmúlt évtized robbanásszerű fejlődést hozott a sejtek által evolúciósan konzervált módon kibocsátott extracelluláris vezikulák kutatása területén. Az elmúlt egy két év során egészen új vezikula típusok váltak ismertté, az extracelluláris vezikulák biogeneze, molekuláris szerkezete és biológiai működése tekintetében számos alapvető új adat áll rendelkezésünkre.

A természetes immunitás sejtjei ismert módon kommunikálnak az adaptív immunitás szereplőivel, és ebben a kommunikációban az extracelluláris vezikulák szerepe igen jelentős.

Mind a gyulladásos megbetegedések immun-pathomechanizmusában, mind a tumor ellenes immunitásban kitüntetett szerepet játszanak. Az extracelluláris vezikulák diverzitását korábban alábecsültük. Hatásukat csak komplex módon, kombinatorikus hatásként értelmezhető.

Összességükben óriási interaktív membránfelszín képviselnek, ezért jobb megértésükhöz elengedhetetlen a környezetükkel való molekuláris kölcsönhatások megismerése.

**INTRAGANGLIONÁRIS MAKROFÁG: EGY ÚJ SEJTTÍPUS KARAKTERIZÁLÁSA ÉS  
ONTOGENEZISE A BÉLIDEGRENDSZER GANGLIONJAIBAN**

Nagy Nándor, Dóra Dávid, Kovács Tamás, Barad Csilla

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani  
Intézet, Össejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium, Budapest

A központi idegrendszert (CNS) neuroektodermális eredetű neuronok és gliasejtek, valamint a szikhólyag hemopoiitikus prekursoraiból származó mikroglia sejtek alkotják. A bélidegrendszerben (enteric nervous system, ENS) jelenlegi ismereteink szerint csak ganglionléc eredetű neuronok és glia sejtek találhatóak. Előzetes immuncitokémiai vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a csirke ENS ganglionjaiban hemopoiitikus sejtekre jellemző, CD45+ nyúlványos sejtek is előfordulnak. Ehhez hasonlóan, az egér ENS ganglionjaiban is találtunk nyúlványos CD45+CX3CR1+CD11b+ sejteket. Jelenleg ilyen sejtípust az enterális ganglionokban nem ismer a szakirodalom. Munkánk célja az volt, hogy az ENS-asszociált CD45+ nyúlványos sejteket karakterizáljuk és meghatározzuk embryonális eredetüket. Az immuncitokémiai karakterizálás során kiderült, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtek chB6, CSF1R (kolónia stimuláló faktor-1 receptor) és MHC-II antigént is expresszálnak, de monocita eredetű makrofág (Lamp1, KUL01), illetve glia markereket (GFAP, SOX2, B-fabp) nem fejeznek ki. A chB6 antigén a madarak B-limfocitáira és a CNS mikroglia sejtjeire specifikus sejtfelszíni molekula. MHC II expressziójuk révén antigén prezentációra is képesek lehetnek. Az intraganglionáris CD45+ sejteket a CSF1R<sup>GFP</sup>-(green fluorescent protein) transzgenikus csirketörzs és CX3CR1<sup>GFP</sup> egerek bélidegrendszerében is megfigyeltük. A CD45+chB6+CSF1R+MHC-II+ sejtek eredetét embryonális kiméra módszerrel tanulmányoztuk. A kísérlet során 8 napos csirke embrió vastagbél kezdeményét 9 napos GFP transzgenikus csirke embriók choriallantois membránra transzplantáltuk, és a kimérákat 8 napig tovább inkubáltuk. A kimérizmust GFP- és sejt-specifikus monoklonális ellenanyagokkal karakterizáltuk. Az embryomanipulációs és immuncitokémiai eredmények azt mutatták, hogy a CD45+ véreredetű sejtek kolonizálják a fejlődő enterális ganglionokat, melyek letelepedésük után nyúlványos, mikroglia-szerű sejtekké differenciálódnak.

**A HASÜREG ZSÍR-ASSZOCIÁLT NYIROKSZÖVETI ELEMEI – MEGJELENÉSI FORMÁK  
ÉS LIMFOID HOMEOSZTATIKUS FUNKCIÓK JÓBAN, ROSSZBAN**

Balogh Péter

Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A bél mukózális nyirokszöveiteinek a táplálék és helyi mikrobiom részletesen feltárt immunológiai feldolgozásával szemben a hasüregi felülethez kapcsolódó nyirokszövekről jóval kevesebb ismeret áll rendelkezésre. Vizsgálatainkban egy szelektív megtapadást mutató egér spontán high-grade B-sejtes limfóma (Bc-DLFL.1) hasüregi terjedésének kapcsán vizsgáltuk ezen nyirokszöveti képletek elhelyezkedését, szerkezetét, fejlődéstani jellemzőit és a B-sejtek megoszlásában játszott szerepét. In vivo bioimaging eljárással és fluoreszcein-jelölés utáni whole-mount anti-FITC haptén immunhisztokémiával kimutattuk, hogy a Bc-DLFL.1 sejtek az omentumban már korábban leírt tejfoltok (MS) valamint a vékonybélhez kapcsolódó zsírszövet-asszociált limfoid csoportosulások (FALC) mellett a hashártyán elhelyezkedő új nyirokszöveti kompartmentekbe is eljutnak, melyeket leveles szerkezetű limfoid aggregátumnak (Foliate Lymphoid Aggregates - FLAG) neveztünk el. Hasonló megtelepedési mintázatot kaptunk LacZ-jelzett A20 referencia high-grade B-sejt limfóma sejtvonallal is. Ezek a nyeles képletek laza szerkezetű makrofág-csoportosulásként kezdődnek a 2-3. posztnatális héten, melyek Rag1<sup>-/-</sup> egerekben ilyen állapotban blokkolt állapotban maradnak. Tisztított B-sejtek intraperitoneális bejuttatásával ezek a részlegesen kiérett FLAG-prekursorok a normál limfocita-képzéssel rendelkező egerekben a 3-5. hét során történő FLAG átalakuláshoz hasonlóan helyreállíthatók. A kiérett FLAG képletekre jellemző a T- és B-sejtes zónák részleges elkülönülése és LYVE-1<sup>int</sup>/CD45<sup>lo</sup> fenotípusú makrofágoknak a széli részeken megfigyelhető felhalmozódása, melyek CXCL13 termelése részt vehet a B-sejtek helyi megtelepedésében. A makrofágok klodronát-liposzomával való depléciója ellenére a FLAG struktúrák szerkezete megmarad, de a hasüregi limfoid megtapadás mértéke jelentősen csökken, míg zimosán-kezelés hatására a megtelepedés mértéke fokozódott. Eredményeink szerint a hasüregi nyirokszövetek többféle szerkezetű képletspektrumot alkotnak, melyek a normál limfocita-recirkuláció fenntartása mellett a mukózális nyirokkeringéshez kapcsolódó predilekciós helyekként is működhetnek B-sejtes daganatok megtapadásában.

## MEMÓRIA KIALAKULÁSA A VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZOK SORÁN

Bácsi Attila

Debreceni Egyetem, ÁOK Immunológiai Intézet

Az immunválaszokat hagyományosan veleszületett és szerzett (adaptív) kategóriákra osztjuk. A veleszületett immunválasz során nem antigének, hanem molekuláris mintázatok felismerése történik, és azonnal működésbe lépnek az eliminációs mechanizmusok. Az adaptív immunrendszer aktiválódása csak napokkal később indul meg, viszont az immunválaszok fajlagosak, az effektor funkciók csak az azokat kiváltó antigén ellen irányulnak, és immunológiai memóriát biztosítanak. Az immunológiai memória jellemzője, hogy ha ugyanazon antigén ismételt a szervezetbe jut, az elsődleges (primer) immunválasz kialakulásánál gyorsabban és nagyobb hatásokkal indukálja a másodlagos (szekunder) immunválaszt. Korábbi konszenzus szerint kizárólag az adaptív immunrendszer felelős az immunológiai memória kialakulásáért. Az elmúlt évek megfigyelései alapján azonban ez a dogma megdőlni látszik. Egyre több a bizonyíték arra, hogy a veleszületett immunrendszer is rendelkezik bizonyos memóriával. A patogénekre (Pathogen Associated Molecular Pattern /PAMP/) vagy szöveti károsodásra (Danger or Damage Associated Molecular Pattern /DAMP/) jellemző struktúrákkal történő első expozíció után a veleszületett immunrendszer sejtjei oly módon változnak meg, hogy ismételt azonos expozíció vagy heterológ ingerek esetén is fokozott választ adnak. Fokozódik a gyulladási mediátorok termelődése, és megnő a sejtek kapacitása, hogy eltávolítsák a patogéneket. Ezeknek a változásoknak a hátterében a veleszületett immunrendszer sejtjeinek epigenetikai átprogramozása áll, szemben az adaptív immunválaszok során kialakuló memóriával, ahol permanens genetikai változások - mutációk és rekombinációk - is bekövetkeznek. A transzkripció program megváltozása nemcsak az intracelluláris szignalizációs útvonalak megváltozását fogja eredményezni, hanem befolyásolja a sejtek metabolizmusát is. A sejtek oxidatív foszforilációról aerob glikolízisre váltanak, ami fokozza a válaszkészségüket a különböző stimulusokra. Az előadás a veleszületett immunitásban kialakuló memória néhány példáját, és a lehetséges mechanizmusokat mutatja be, valamint azt, hogy ezek az új ismeretek hogyan befolyásolják a vakcinák és a gyulladáscsökkentő készítmények kifejlesztésének stratégiáit.

A SEJTEK KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓ SZEREPE A *DROSOPHILA MELANOGASTER* VÉRSEJTKÉPZŐ KOMPARTMENTUMAIBAN ZAJLÓ DIFFERENCIÁLÓDÁS SORÁN

Honti Viktor<sup>1</sup>, Varga Gergely István<sup>1</sup>, Csordás Gábor<sup>1</sup>, Cinege Gyöngyi<sup>1</sup>, Jankovics Ferenc<sup>2</sup>, Sinka Rita<sup>3</sup>, Szikora Szilárd<sup>2</sup>, Kurucz Éva<sup>1</sup> és Andó István<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Immunológiai Témacsoport

<sup>2</sup> MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Fejlődésgenetikai Témacsoport

<sup>3</sup> Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék

Az *ecetmuslica* (*Drosophila melanogaster*) hemocitái az emlősök vérsejtjeihez hasonlóan több hullámban differenciálódnak, és minden fejlődési stádiumban vérsejtképző kompartmentumokban helyezkednek el. A lárva vérsejtképző kompartmentumai a központi nyirokszerv, a keringés, valamint a szesszilis szövet. A központi nyirokszervben zajló vérsejt differenciálódást szabályozó faktorok és folyamatok részletesen ismertek, jóval kevesebb információ áll azonban rendelkezésre a szesszilis szövetben zajló vérsejtképzésről.

Kísérleteink során azonosítottunk egy faktort, a Headcase fehérjét, mely a humán HECA tumorszuppresszor homológja, és eredményeink szerint elengedhetetlenül fontos szerepet játszik a központi nyirokszervben található vérsejtképző niche funkciójának fenntartásában. A Headcase funkciójának hiányában a központi nyirokszerv prekursor sejtjei immunindukció nélkül is végrehajtó vérsejteké differenciálódnak. Ez a fenotípus menekíthető a Decapentaplegic és a Hedgehog jelátviteli utak aktiválásával, ami arra utal, hogy a Headcase ezen szignalizációs utakon keresztül fejt ki szabályozó szerepét a lárva központi nyirokszervében.

A szesszilis szövetben zajló vérsejt differenciálódás vizsgálatára konfokális videomikroszkópiát, illetve a vérsejtek és vérsejtvonalak *in vivo* jelölésére alkalmas immunológiai, valamint transzgenikus eszköztárat használunk. Eredményeink szerint a szesszilis szövet vérsejtjei a keringéssel dinamikus egyensúlyi állapotot tartanak fent; a vérsejtek kitapadását, a szövet integritását az Eater fagocitózis receptor biztosítja. A szesszilis szövet sejtjeinek dinamikai vizsgálatát a konfokális felvételeken alapuló sejtkövetéses videóanalízissel végezzük. A sejtek között zajló kommunikációs folyamatok vizsgálatára olyan komplex transzgenikus jelölőrendszert hoztunk létre, mely lehetővé teszi a nem-sejtautonóm vérsejt differenciálódást irányító faktorok azonosítását.