1

QUADRUPLEX SZERKEZET KIALAKULÁSA ÉS STABILITÁSA A TROMBIN-KÖTŐ APTAMERBEN

Adányi Mónika, Végh András, Somkuti Judit, Smeller László

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

A nukleinsavak szerkezetében a hagyományos dupla szálú elrendeződés mellett számos egzotikus struktúra is fellelhető. Ezek közül a négyszálú tetraplex (másnéven quadruplex) szerkezetek különleges figyelmet kaptak, amikor kiderült, hogy jelen vannak a DNS telomer régióiban, ill. egyes onkogének promóter régióiban. Ezeket a négyszálú struktúrákat guaninban gazdag szekvenciák hozzák létre, úgy, hogy egy síkban négy guanin bázis kapcsolódik össze, ún. Hoogsten féle kölcsönhatásokkal. Egy G-quadruplexet tipikusan kettő vagy három ilyen sík alkothat.

Egyes guaninban gazdag rövid egyszálú DNS (aptamer) is felvehet G-quadruplex formát. Ezek nagy affinitással és specificitással kötődhetnek bizonyos fehérjékhez. Ilyen a TBA (thrombin binding aptamer), amely a trombin detektálására is használható.

Méréseinkben a TBA (GGTTGGTGTGGTTGG)-t mint a G-quadruplex szerkezetek modelljét használtuk. Méréseinkkel detektáltuk a TBA quadruplex struktúrába való feltekeredését és vizsgáltuk a térszerkezet stabilitását a környezeti paraméterek széles skáláját változtatva (különböző ionok koncentrációja, pH és hőmérséklet).

A quadruplex kialakulását monomolekuláris FRET-tel (Förster Rezonancia Energia Transzfer) detektáltuk.

Eredményeink szerint a TBA feltekeredett quadruplex szerkezetét a K^+ ion stabilizálja. Meghatároztuk a kötődési állandót és annak pH függését. Megállapítottuk, hogy az alacsony pH stabilizálóan hat a szerkezetre.

A quadruplex szerkezet hőstabilitását nagymértékben meghatározza a központi ion. A K^+ iont tartalmazó TBA quadruplexek fiziológiás hőmérsékleten stabilak, de a kétszálú DNS-hez képes jelentősen alacsonyabb hőmérsékleten vesztik el térszerkezetüket. A stabilitást a trombin kötődése csak kismértékben növeli.

Méréseink alapján a TBA egy jól karakterizált rendszerré vált, amelyet a későbbiekben kifejlesztendő G-quadruplex vizsgálati módszerek tesztelésére fogunk használni.

2

PACAP KO EGEREK ÍZÜLETI PORCÁNAK ELTÉRÉSEI

Bauer Balázs[1], Jüngling Adél[2], Balog Dóra[1], Kovács Péter[1], Tamás Andrea[2], Reglődi Dóra[2], Zákány Róza[1], Juhász Tamás[1]

[1] Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

[2] Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Anatómiai Intézet, PTE-MTA, „Lendület PACAP kutatócsoport”

A PACAP (hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) a hypothalamusban termelt 38 aminosavból álló neuropeptid, mely kimutatható az agyban és perifériás szövetekben is. Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy pozitív hatással van az in vitro porcképződésre, és hiánya megváltoztatja az ízületporc egyes alkotóelemeinek expresszióját fiatal egerekben.

Jelen kutatásaink során öreg PACAP génhiányos egerek térdízületeit vizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk, hogy az ízületi porc jelátviteli alkotóelemei hogyan változnak a kor előrehaladtával. Vad típusú és PACAP KO 1 éves idős egerek térdízületét hasonlítottuk össze morfológiailag és RT-PCR valamint Western blot segítségével.

Az egerek ízületeit HE festéssel megvizsgálva a génhiányos állatok ízületi porca vastagabbnak bizonyult. PACAP receptorai közül a PAC1 expresszálódik fehérje szinten dominánsan az ízületi porcban fiatal egerekben, azonban idős egerekben alig detektálható a jelenléte, illetve a KO állatokban ezzel a módszerrel a receptor nem mutatható ki. A PACAP indukálta jelátviteli útvonal egyik központi célmolekulája a PKA lehet, melynek expressziója jelentősen csökken az öreg PACAP KO állatokban. A PKA által aktivált transzkripciós faktorok közül a CREB foszforilált formájának jelenléte nem kimutatható és a P-Sox9 expressziója jelentősen csökken a génkiütött idős egyedekben. A Sox5 és Sox6 transzkripciós faktor fehérjeexpressziója sem detektálható az öreg állatok ízületi porcában. A Chst11 expressziója viszont csökkenést mutat a génhiányos állatokban. A hyalinporc extracelluláris mátrixát alkotó II. típusú kollagén expressziója csökken az idős KO állatokban a vad típusú alomtársakhoz képest. Ugyanakkor hipertrófiás porcra jellemző X. típusú kollagén expressziója fokozódik az öreg KO állatokban. Ehhez hasonló módon jelentős I-es típusú kollagén fokozódást is detektáltunk.

Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a PACAP hiánya elősegíti a porc öregedését és a normál extracelluláris matrix szerkezetét megváltoztathatja.

PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, CREB:cAMP response element-binding protein, Sox: Sry-related HMG box

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült

3

FÉM NANOPARTIKULUMOK SEJTKÁROSITÓ HATÁSA EISENIA ANDREI ÉS EISENIA FETIDA IMMUNSEJTEKEN

Bodó Kornélia[1], Gerencsér Gellért[2], Telek Elek[3], Mészáros Mária[4], Németh Péter[1], Engelmann Péter[1]

[1]PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, [2]PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet, [3]PTE ÁOK Biofizikai Intézet, [4]MTA SzBK, Biofizikai Intézet

A nanotechnológia fejlődése ellenére a nanorészecskék biztonságos használatával kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre. Hiányosak az ismereteink arról, hogy a környezetbe kikerült részecskék milyen hatással lehetnek az élő szervezetek immunrendszerére.

Feltételeztük, hogy a giliszta primér, makrofág-szerű immunsejtjei (ún. coelomasejtek) a veleszületett immunrendszer részeként gyorsan reagálnak a nanopartikulumok (NP-ok) toxikus hatásaira. *In vitro* kezelést végeztünk 10 nm-es ezüst (AgNP) illetve arany (AuNP) nanopartikulumokkal különböző koncentrációban (1,25µg-40µg/ml) 24 órás időtartamban *E. andrei* és *E. fetida* coelomasejteken. Célunk a toxicitási arány meghatározása, az apoptotikus válaszreakció és a fellépő DNS-károsodás kimutatása, illetve a két faj érzékenységbeli különbségének meghatározása volt.

A biológiai alkalmazás előtt a NP-ok fizikai karakterizálását (spektrofotometria és dinamikus fényszórás) végeztük el. Az élő sejtek arányát áramlási citometria alapú mérésekkel (7-aminoactinomycin D festés és a mitokondriális membránpotenciál) határoztuk meg. A sejtpusztulás mechanizmusát fluoreszcens kaszpáz 3 szubsztrát és TUNEL-assay alkalmazásával vizsgáltuk. A genotoxikológiai hatásokat Comet-assay-vel mértük.

Az AgNP a coelomasejtekben dózis-függő sejtpusztulást okozott (*E. andrei* LC10: 1,64 µg, LC50: 16,7 µg és LC90: 27,53 µg; *E. fetida* LC10: 1,18 µg, LC50: 5,24 µg és LC90: 23,25 µg), emellett mitokondriális károsodás és apoptózist indukáló, illetve DNS károsító hatással is rendelkezik. Ezzel szemben az AuNP esetében egyik fajnál sem figyeltünk meg lényeges toxikus hatást.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az AgNP a coelomasejtekre összetett citotoxikus hatást fejt ki, melyet az AuNP esetében nem sikerült igazolni. Eredményeink alapján *E. fetida*-ból származó coelomasejtek érzékenyebben reagálnak az AgNP hatásaira, mint az *E. andrei*–ból izolált coelomasejtek.

Kutatásunkat a PTE-ÁOK Kutatási alap (2017/04) és az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.

4

A TKS4 PROTEIN JELENLÉTE ELŐSEGÍTI A TUMOR PROGRESSZIÓT

Boldizsár Eszter[1], Damya Laoui[2], Gyöngyösi Adrienn[1], Jo A. Van Ginderachter[2], Lányi Árpád[1]

1 Debreceni Egyetem, Immunológiai Intézet, Debrecen, Magyarország; 2 Vrije Universiteit Brussel, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Brüsszel, Belgium

Irodalmi háttér és hipotézis:

A Tks4 fehérje szerepe a sejt-migráció szabályozásában, részvétele a funkcionális podoszómák és lamellipódiumok kialakulásában azt sugallja, hogy a protein szerepet játszhat a tumor-progresszióban. A Tks4 nélkülözhetetlen az emlős egyedfejlődés szabályozásában, ennél fogva valószínűleg részt vesz a funkcionális TAS szerveződésében.

Korábbi kísérleteink során Tks4-hiányos és vad-típusú egerekbe szubkután B16-F10 egér melanóma sejteket oltottunk és azt tapasztaltuk, hogy a Tks4-deficiens egerekben szignifikánsan kisebb tumorok fejlődtek. Annak eldöntésére, hogy a TAS immunsejtjei felelősek-e a megfigyelt változásokért csontvelő transzfer kísérleteket végeztünk. A Tks4-KO egerekből származó csontvelővel transzplantált egerekben szignifikánsan kisebb B16-F10 tumorok alakultak ki, ami a Tks4 fehérje tumor-asszociált immunsejt funkciók szabályozásában játszott szerepét igazolja.

Eredmények:

Ahhoz hogy meghatározzuk, mely immunsejt populációk funkcióit befolyásolja a Tks4 hiánya, LLC tumor sejteket oltottunk $Tks4^{null}$ egerekbe vagy olyan transzgenikus egerekbe ahol specifikusan a lizozimM-et kifejező sejttípusokból hiányzik a Tks4 protein, amely főleg a makrofágokat, dendritikus sejteket és neutrofil granulocitákat érinti. Tks4 hiányában mindkét tumor modell esetén csökkent tumor növekedést tapasztaltunk. Továbbá a Tks4-deficiens egerekbe oltott tumorokban megváltozott a TAS összetétele és az egyes immunsejt populációk fenotípusa.

Következtetés:

Eddigi adataink alapján a mieloid sejtekben kifejeződő Tks4 fehérje szerepet játszik a funkcionálisan aktív TAS kialakulásában, valószínűleg a TAS immunszuppresszív funkcióinak pozitív regulátora.

Tks4: tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains, TAS: tumor-associated stroma, LLC: Lewis lung carcinoma

5

A CALLUS KÉPZŐDÉS ELTÉRÉSEI PACAP KO EGEREK TIBIÁJÁBAN

Czibere Bernadett[1], Józsa Gergő[2], Tamás Andrea[2], Fülöp Balázs[2], Reglődi Dóra[2], Zákány Róza[1], Juhász Tamás[1]

[1] Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

[2] Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Anatómiai Intézet, PTE-MTA, „Lendület PACAP kutatócsoport”

Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) olyan neurohormon, melynek bizonyos perifériás szövetek fejlődésében és regenerációjában is fontos feladatot tölt be. Többek között a porc- és csontdifferenciációban jelentős szereppel bír, azonban a kompakt csont callus képzésében és regenerációs folyamataiban betöltött funkciójáról nem rendelkezünk adatokkal. Korábbi kísérleteink szerint a PACAP génhiányos egerek hosszú csöves csontjai könnyebben törnek, mely arra enged következtetni, hogy mind szerkezeti, mind gyógyulási folyamatokban eltérések lehetnek.

Kísérleteink során PACAP KO és vad típusú (VT) egerek tibiájának proximalis részén állítottunk be reprodukálható módon töréseket, majd ezek callus-képződési folyamatát követtük nyomon. A töréseket a proximalis ízfelszíntől 5 mm-re indukáltuk, 0,5 mm mélységben egy sebészeti szike segítségével. CT vizsgálattal a 3., 7. és 21. napon követtük nyomon a csontgyógyulási folyamatokat. RT-PCR és Western blot technikával detektáltuk a csontosodásban szerepet játszó szerves alkotók és a BMP jelátviteli útvonal egyes elemeinek expresszióját.

Az I-es típusú kollagén expressziója megemelkedik a VT egerek callusában, míg a génhiányos egerekben csökkent expressziót mutat. Ugyanakkor a mineralizációban fontos alkalikus foszfatáz (ALP) fehérjeexpressziója azonos mértékben jelenik meg mindkét genotípusban. A BMP2, 4 és 6 expressziója a 7. és 21. gyógyulási napon alacsonyabb értéket mutat a PACAP KO egerekben. A BMP útvonal egyik transzkripciós faktora, a Smad1 is csökkent módon expresszálódik a PACAP génhiányos egerek callusában.

Mindezek arra utalnak, hogy a PACAP szabályozó és befolyásoló tényező lehet a megfelelő csontregeneráció eléréséhez. Eredményeink alapján ez a funkció részben a BMP útvonallal való kommunikáción keresztül valósulhat meg.

PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide ALP: alkalikus foszfatáz, BMP: bone morphogenic protein

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült

6

AZ EGF RECEPTOR GENETIKAI VÁLTOZATAINAK ELŐFORDULÁSA ÉS HATÁSA A CETUXIMAB TERÁPIÁRA FEJ-NYAKI DAGANATOKBAN

Cserepes T. Mihály[1], Türk Dóra[1], Hegedüs Zita[1], Ivan Randelovic[1], Paku Sándor[2], Dezső Katalin[2], Kenessey István[3], Tóvári József[1]

[1]Kísérletes Farmakológiai Osztály, Országos Onkológiai Intézet, Budapest
[2] I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,[3] 2. sz. Patológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

A fej-nyaki daganatok 90%-ban laphámsejtes carcinomák (HNSCC), melynek incidenciája évi 680 ezer eset, ezzel a hatodik leggyakoribb daganattípus a világon. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) mutációi megváltoztatják a sejtek működését, hozzájárulhatnak azok malignalizálódásához, proliferációjához, illetve kemorezisztenciát okozhatnak. Az EGFR terápiára rezisztens variánsainak meghatározása a hatékony terápia sarokköve lehet.

Célul tűztük ki az EGFR-t célzó cetuximab antitest-terápia tesztelését fej-nyaki daganatokban vad típusú és genetikai variációkat tartalmazó tumorok esetén. Vizsgáltuk az EGFR vIII splice variánsát, illetve az R521K pontmutációt *in vitro, in vivo* rendszerekben, és klinikai mintákon.

In vitro körülmények között HNSCC sejtvonalakban meghatároztuk az EGFR genotípusát, valamint sejtproliferációs, citotoxicitási és cukor profil vizsgálatokat végeztünk. *In vivo* HNSCC xenograft modelleken teszteltük a cetuximab terápia hatékonyságát. Emellett kiválasztott betegpopuláción az egyes EGFR-variánsok előfordulását vetettük össze az EPF (Erbitux-Platinum-5FU) kezelési dózisával és a progresszióval. Ezen adatokkal jellemeztük a kezelés hatékonysága és az egyes variánsok közötti összefüggéseket.

PE/CA-PJ15 és PE/CA-PJ41, FaDu, Cal27 humán HNSCC xenograftok *in vivo* növekedése között látványos különbség volt több hetes cetuximab kezelés során. A PJ41 és Cal27 xenograftok szinte teljesen visszafejlődtek, a FaDu tumorok mérsékelten reagáltak, míg a PJ15 esetében rezisztenciát tapasztaltunk. EGFR genotipizálás során a rezisztensebbnek bizonyult sejtvonalakban kimutattuk az EGFR-R521K polimorfizmus heterozigóciát, ami befolyásolhatja az antitest terápiának hatékonyságát. *In vitro* sejtproliferációs vizsgálatunk során egyik sejtvonal esetén sem tapasztaltunk antiproliferatív hatást cetuximab kezelésre, ami erősíti, hogy a terápia nem közvetlenül a tumorsejtekre, mint inkább az ellenük beinduló immunválaszra van hatással. ADCC vizsgálatunk során kimutattuk, hogy PE/CA sejtvonalak esetén a cetuximabra szenzitív PJ41 sejtvonalnál kifejezett citotoxicitási válasz alakul ki *in vitro*. Cukorprofil vizsgálataink kiderítették, hogy a rezisztens PJ15 sejtvonal cukorprofiljában jelentős az eltérés a többi sejthez képest, ami befolyásolhatja az ADCC hatékonyságát.

Eredményeink az irodalomban is leírt EGFR-R521K polimorfizmus jelentőségét erősítik, melynek jelenléte közrejátszhatott a rezisztencia kialakulásában. A polimorfizmus kifejeződése markerként szolgálhat a kezelések tervezése során.

A fenti eredmények az NKFIH K116295 sz. kutatási pályázat támogatásával készültek.

Rövidítések:
HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor **EPF**: Erbitux + Platinum + 5-Fluorouracil terápia
ADCC: Antibody-Depencent Cell-mediated Cytotoxicity

7

JELÖLÉSMENTES OPTIKAI RENDSZER KIDOLGOZÁSA ENDOTÉLSEJTEK MŰKÖDÉSÉNEK KOMPLEX VIZSGÁLATÁRA

Debreczeni Márta Lídia[1], Székács Inna[2], Kovács Boglárka[2], Saftics András[2], Péter Beatrix[2], Kurunczi Sándor[2], Dobó József[3], Horváth Róbert[2], Cervenak László[1]

1 Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium
2 MTA Energiatudományi Kutatóközpont, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet, Nanobioszenzorika Lendület Csoport
3 MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

Háttér: Az endotélsejtek, mint az ereinket belülről határoló laphámsejtek, elsők között kerülnek kapcsolatba a vérben jelen lévő anyagokkal, így például a plazma szerin proteázaival, melyek többségének endotélsejtes hatásairól azonban máig nincs kellő információnk.
Bár az endotélsejtek funkcióinak tanulmányozására számos módszer áll rendelkezésre, ezek általában különböző jelzőmolekulákat alkalmaznak, amelyek önmagukban befolyásolhatják a sejtek működését. Kutatásunk során célul tűztük ki egy nagyáteresztőképességű, jelölésmentes optikai rendszer kidolgozását, amely alkalmas az endotélsejtek plazma enzimekre adott válaszreakcióinak vizsgálatára.

Módszerek: Vizsgálati módszerünkhöz egy olyan platformot választottunk (Epic BenchTop, Corning), amely egy speciális optikai tulajdonságokkal rendelkező 384 lyukú lemez megvilágításával képes valós időben követni a felszín közeli, kb. 200 nm-es sáv törésmutató változásait. A lemez felszínét a bazálmembránt utánozó zselatinnal fedtük, melyen primer humán köldökzsinórvéna endotélsejtekből konfluens tenyészetet hoztunk létre. Az alapvonal felvétele után a sejteket kezeltük a vizsgálandó anyagokkal, majd detektáltuk a felszín közeli törésmutató változását. Azon anyagokat, amelyeknél a negatív kontrolltól eltérő lefutású válaszgörbét tapasztaltunk, klasszikus tesztekben – intracelluláris Ca^{2+} mobilizáció, permeabilitás mérés, VE-cadherin adhéziós molekula festése – validáltuk.

Eredmények: Beállítottuk azokat a körülményeket, amelyek között az endotélsejtek válaszreakciója érzékenyen vizsgálható a jelölésmentes optikai rendszer segítségével. A tesztelt plazma enzimek közül - a pozitív kontrollként használt trombin mellett – a C1r, a kallikrein és a MASP-2 jelentősen és dózisfüggő módon megváltoztatta az endotélsejtek viselkedését, karakterisztikus lefutású válaszgörbéket eredményezve. Ezen anyagok endotélsejtes hatásait további funkcionális tesztekben is igazoltuk; mindhárom proteáz jelentősen megnövelte a permeabilitást, továbbá megváltoztatta a VE-cadherin adhéziós molekula mintázatát, emellett a kallikrein és a MASP-2 Ca^{2+} mobilizációt is kiváltott.

Következtetés: Sikeresen adaptáltunk egy új, nagyáteresztőképességű, jelölésmentes optikai rendszert endotélsejtek működésének valós idejű vizsgálatára. Ezen új módszerrel a C1r, a kallikrein és a MASP-2 plazma szerin proteázokról elsőként sikerült endotélsejtes hatást kimutatnunk, melyet hagyományos tesztekben is igazoltunk. Eredményeink alapján az új platform alkalmas gyógyszerjelöltek és más hatóanyagok egyszerű és érzékeny szűrővizsgálatára endotélsejteken illetve más epiteliális sejteken.

Rövidítések: MASP-2 - mannózkötő lektin asszociált szerin proteáz-2, VE-cadherin – vaszkuláris endoteliális cadherin

8

SZÖVETI REGENERÁCIÓT KÍSÉRŐ, KONZERVÁLT SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI FOLYAMATOK: ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATOK GERINCTELEN MODELLSZERVEZETBEN

Bodó Kornélia, Bohdana Kokhanyuk, Németh Péter, Engelmann Péter
PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A regeneráció folyamata minden élőlénynél megfigyelhető, azonban a regenerációs kapacitás eltérő az egyes fajok között. A legtöbb gyűrűsféreg képes az elvesztett szelvényeinek regenerálására melynek kifejeződését nagymértékben meghatározza az amputáció mértéke.

Kevés tanulmány foglalkozik a regeneráció során megnyilvánuló immunológiai folyamatokkal, ezért célunk az *Eisenia andrei* gilisztafaj anterior és poszterior regenerációja során a mintázatfelismerő receptorok (PRR), jelátviteli molekula és több antimikrobiális faktor génexpressziós mintázatának összehasonlítása.

A morfológiai különbségek megállapítása céljából a sejtproliferáció kimutatását az amputálást követő második és negyedik héten EdU festést alkalmaztunk. Az egyes immunkompetens sejt-alcsoportok (ún. coelomasejtek) részvételét a regenerációs folyamatban specifikus monoklonális antitestekkel (anti-EFCC) állapítottuk meg. Az apoptózis detektálása céljából TUNEL assay-t végeztünk. A célgének mRNS expresszió változását valós idejű PCR-ral vizsgáltuk a regenerálódó szövetekben.

A regenerációs blasztéma kialakulását követően nagyszámú osztódó sejtet figyeltünk meg a folyamat második hetében, amely a negyedik hétre erőteljes csökkenést mutatott a poszterior blasztémában. Az apoptotikus aktivitás a regeneráció teljes folyamata alatt kimutatható volt, a legtöbb apoptotikus sejtet a negyedik héten detektáltuk. Az a-EFCC immunfestés alátámasztotta, hogy főként eleocyták és granuláris amoebocyták vándorolnak az újonnan képződő szegmensekbe. Eredményeink alapján ezen sejtek nagyobb mennyiségben a poszterior regenerációban vesznek részt.

A regeneráció során lecsökkent a PRR mRNS expressziója (kivétel SR) az intakt állatokhoz képest. Az anterior és poszterior regenerációs blasztémában számos géntermék (TLR, LBP/BPI, MyD88, SR, lysenin) mRNS mintázata jelentős hasonlóságot mutatott, különbséget figyeltünk meg az egyes antimikrobiális fehérjék (lizozim, lumbricin, LuRP) expressziója során.

Eredményeink alapján eltérő immunológiai mechanizmusok zajlanak az anterior/poszterior regeneráció folyamatában, amely génexpressziós és celluláris szinten is kimutatható. Kutatásunkat a PTE-ÁOK Kutatási alap (2017/04) és az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.

Rövidítések: LBP/BPI: LPS-binding protein/bactericidal permeability increasing protein, LuRP: lumbricin-related-peptide, SR: scavanger receptor, TLR: toll-like receptor

9

MELAS-SZINDRÓMÁS FIBROBLASZTOK BIOENERGETIKAI VIZSGÁLATA

Etl Bálint András, Gál Anikó, Horváth Gergő, Sváb Gergely, Molnár Mária Judit, Tretter László

Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet

A MELAS-szindróma egy, a ritka betegségek közé tartozó, a mitokondriális leucin-tRNS pontmutációja következtében létrejövő klinikai tünetegyüttes. A mutáció következményeként a mitokondriális fehérjék expressziója zavart szenved, ami a mitokondriumokban bioenergetikai funkciózavarokat, illetve a sejtek működésének károsodását eredményezi. A MELAS betűszó a betegség főbb tüneteiből ered, ezek közé a mitokondriális enkefalomiopátiát, laktát-acidózist, valamint a stroke-szerű epizódokat soroljuk. A betegség súlyosságát a sejtekben lévő károsodott mitokondriumok aránya (heteroplazmia) határozza meg.

A MELAS-ban szenvedő, illetve egészséges páciensből származó fibroblasztok bioenergetikai paramétereit vizsgáltuk. Ezt követõen egy, a mitokondriális funkciók javítására potenciálisan alkalmas vegyületnek, a metilénkéknek a mutáns sejtekre gyakorolt hatásaival foglalkoztunk.

A vizsgálatok során felhasznált sejtek a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetéből származtak. A letapadt sejtek oxigénfogyasztását és az extracelluláris közeg pH változását Seahorse XF96 mûszerrel mértük.

Jelentősen csökkent a MELAS-szindrómában szenvedõ betegből izolált fibroblasztok oxigénfogyasztása az egészségesekhez képest, emellett a teljes respirációs kapacitás és az ATP-szintézis hatásfoka is csökkent a mutáns sejtvonalban. Mindkét sejttípusban glükóz hozzáadására fokozódott a laktáttermelés, viszont sem oligomycin (a mitokondriális ATP-szintáz gátlószere), sem szétkapcsolószer jelenlétében a patológiás sejtekben nem fokozódott tovább a glikolízis aktivitása. Metilénkék hozzáadásával sikerült a mutáns sejtek nyugalmi légzését és respirációs kapacitását is növelni, továbbá csökkenteni a glikolitikus aktivitásukat.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a MELAS-szindrómás sejtekben csökkentek a mitokondriális légzési funkciók, így ezekben a fibroblasztokban döntően a glikolízis biztosítja a működéshez szükséges energiát, és nyugalmi körülmények között is maximális intenzitással mûködik. A metilénkék alkalmasnak bizonyult a mitokondriális funkciók javítására, ezért a későbbiekben alkalmas lehet MELAS-szindrómás és más mitokondriális betegségben szenvedő páciensek kezelésére, elsősorban a visszatérő metabolikus krízisek idején.

10

A CFTR KLORID CSATORNA VIZSGÁLATA

Farkas Bianka [1,2], Gera János[3], Paragi Gábor [3,4], Tordai Hedvig[1], Hegedűs Tamás [1,5]

1 Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

2 Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar

3 SZTE Orvosi Vegytani Intézet

4 MTA- SZTE Biomimetikus rendszerek kutatócsoport

5 MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport

A cisztás fibrózis öröklődő, súlyos, monogénes betegség, melynek a hátterében az ABCC7/CFTR klorid csatorna mutációi állnak. A CFTR csökkent funkcionális expressziója az epitél sejtek csökkent klorid vezetését eredményezi melynek következtében a só- és vízháztartás zavara lép fel. A fehérjének több mint 2000, cisztás fibrózishoz köthető mutáns formája ismert, melyek közül a leggyakoribb (~90%) az F508 deléciója. A mutációk többsége a fehérje feltekeredésére, stabilitására és működésére van hatással. Funkcionális expressziót helyreállító gyógyszerek tervezéséhez elengedhetetlen a CFTR szerkezetének atomi szintű ismerete. A krio-elektronmikroszkópia területén történt fejlesztéseknek köszönhetően a CFTR szerkezetének meghatározása lehetővé vált, azonban több kérdés is felmerül a publikált szerkezetekkel kapcsolatban. Annak ellenére, hogy a szerkezetet aktív állapotban (ATP-kötött, foszforilált) határozták meg, nem figyelhető meg benne klorid vezetésre képes csatorna. Ezért molekuladinamikai szimulációkat végeztünk olyan fehérje konformációk azonosítása céljából, melyek nyitott csatornát tartalmaznak. Azt tapasztaltuk, hogy a 8. transzmembrán hélix (TM8) törése miatt a csatornák többsége a membrán régióba nyílik. Miután a homológ ABCC1/MRP1 szerkezet alapján korrigáltuk a CFTR TM8-at, szimulációink már az extracelluláris térbe nyíló csatornákat eredményeztek.

Jellemeztük a csatornát szerkezeti szempontból, továbbá Poisson-Boltzmann egyenletek megoldásán alapuló módszerrel a klorid áthaladásának energetikáját. Eredményeink arra utalnak, hogy a publikált szerkezetek torzultak, nem a csatorna aktív állapotát mutatják. Vizsgálataink hozzájárulnak a transzport megértéséhez, s ezáltal mutációk mechanizmusának megértéséhez.

Rövidítések

ABCC1/MRP1

ABCC7/CFTR

TM8

Multidrog rezisztencia fehérje 1

Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor

Transzmembrán hélix 8

11

JELÖLÉSMENTES OPTIKAI BIOSZENZOR ALKALMAZÁSA XENOBIOTIKUMOK LETAPADT SEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

Farkas Enikő[1,2], Székács András[3], Kovács Boglárka[1,2], Oláh Marianna[3,4], Horváth Róbert[1], Székács Inna[1]

[1] MTA EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet, Budapest,[2] Pannon Egyetem, Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola (Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskola), Veszprém,[3] Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Agrár-környezettudományi Kutatóintézet, Budapest,[4] Szent István Egyetem, Környezettudományi Doktori Iskola, Gödöllő

A sejttoxicitás-vizsgálatokban túlnyomórészt biokémiai (MTT és enzimatikus tesztek) módszereket használnak. Ezek azonban számos hátránnyal rendelkeznek: időigényesek, jelölő anyagot igényelnek, és alkalmazásuk korlátozott szérumos tápközegben. Az Epic®BenchTop jelölésmentes bioszenzor képes érzékelni a szenzorfelület feletti 100-200 nm rétegben bekövetkező sejtmorfológiai és dinamikus tömeg-újraeloszlási folyamatok által keltett összetett sejtválaszokat [1-3]. Így ez a technika új lehetőséget nyit a xenobiotikumok sejttoxicitásának gyors és hatékony meghatározásához is, mellyel kiküszöbölhetőek a hagyományos technikák hátrányai.

Kutatásunk célja, hogy új módszert fejlesszünk ki xenobiotikumok sejttoxicitás-vizsgálatához az Epic®BenchTop bioszenzor segítségével. Munkánk során a világszerte használt Roundup Classic növényvédő szer és komponensei (hatóanyaga: glyphosate és formázó anyaga: polietoxilált faggyúamin (POEA)) által a csont eredetű (preoszteoblaszt, MC3T3-E1) letapadt sejtekre gyakorolt hatását vizsgáltuk szérumos és szérummentes tápközegben. A bioszenzoros eredményeket hagyományos jelöléses módszerekkel – fluoreszcens mikroszkópia (sejtfestés) és citofluorometria –, illetve egy jelölésmentes technikával Holografikus mikroszkópiával is alátámasztottuk.

A kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a glyphosate a Roundup Classic-nál vagy a POEA-nál 19-szer magasabb koncentrációban mutat citotoxikus hatást. A bioszenzoros eredményekből meghatároztuk a reagensek sejtkitapadásra gyakorolt koncentrációfüggő citotoxikus hatásait, valamint az IC_{50} értékeket szérumos tápközegben (Roundup Classic: 0,024%, POEA: 0,003%, glyphosate: 0,068%) és szérummentes környezetben (Roundup Classic: 0,028%, POEA: 0,003%, glyphosate: 0,223%). A mikoroszkópos képek alapján azt tapasztaltuk, hogy a Roundup Classic gátolja a sejtosztódást, a sejtmozgást, és apoptózist okoz, ugyanakkor a POEA (Roundup-equivalens koncentrációban) a sejtek morfológiájára és egységére gyakorol hatást. Ezzel szemben a glyphosate Roundup-equivalens koncentrációban nem gyakorolt látható hatást a sejtek morfológiájára és életképességére. A citofluorometriás vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy a POEA még alacsony koncentrációban is apoptotikus és nekrotikus hatást gyakorol a sejtekre.

Eredményeink azt mutatták, hogy a Roundup Classic citotoxicitásáért döntően a POEA formázó anyag felelős. Továbbá hagyományos módszerekkel és holografikus mikroszkópiával alátámasztottuk, hogy az Epic®BenchTop bioszenzorikai módszer megbízhatóan alkalmazható a sejttoxicitás-vizsgálatokban.

Irodalom:

[1] Orgovan N, Peter B, Bosze S, Ramsden JJ, Szabo B, Horvath R (2014) Sci Rep 4: 4034.
[2] Kurucz I, Peter B, Prosz A, Szekacs I, Horvath R, Erdei A (2017) Sens Actuators B Chem 240: 528–535.
[3] Peter B, Farkas E, Forgacs E, Saftics A, Kovacs B, Kurunczi S, Szekacs I, Csampai A, Bosze Sz, Horvath R (2017) Sci Rep 7: 42220.

A bemutatott munka az MTA (Lendület Program), NKFI (ERC_HU Program) és OTKA (K109865) támogatásával jött létre.

12

INVESTIGATION OF ABSORPTION AND METABOLISM OF DICLOFENAC IN BILE, IN TISSUE HOMOGENATES AND SMALL INTESTINAL PERFUSATE

[1]Vijeh F., [1]Almási A., [2]Fischer E., [1]Perjési P.

[1]University of Pécs, Pharmaceutical Faculty, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Pécs, HUNGARY

[2]University of Pécs, Medical Faculty, Institute of Pharmacology and Pharmacotherapy, Pécs, HUNGARY

The metabolism, absorption and excretion of of the phenolic compounds in various pathological conditions might have an important relevance. The diclofenac, as a non-steroid antiinflammatory agent was tested *in vivo* in normal and pathologic (experimental diabetes) conditions. The diclofenac excreted as its glucuronide and hydroxy derivatives, and enzymatic processes (at hydroxy derivatives and spontaneous oxydation can occure as well) are involved in the formation of them. The diclofenac is administered in its sodium salt form to characterise the metabolic profiles. The characterisation of the intestinal absorption of the diclofenac and the appearance of its metabolites (hydroxy and glucuronidated derivatives) in the small intestinal perfusate, tissue homogenates and in the bile in physiologic and pathologic (diabetic) conditions in Wistar rats. After the development of the HPLC methods, the change of the absorbed and non-metabolised diclofenac and its hydroxy and glucuronide derivatives were observed in experimental diabetes. The spontaneous oxydation was performed by the Udenfriend reaction. The presence of the diclofenac and the metabolic and hydroxilated derivatives was identified with UHPLC-MS instrument. In the background of the appearance of the hydroxy diclofenac – at least partly – the elevated oxydative stress is presumable.

A project was supported by the “Talent Center Program” of the University of Pécs.

13

PLAZMIN-INDUKÁLT FIBRINOLÍZIS KVÁZI-KÉTDIMENZIÓS FIBRINHÁLÓN

Feller Tímea, Hársfalvi Jolán, Csányi Csilla, Kiss Balázs és Kellermayer Miklós S.Z.

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A fibrinháló fontos mechanikai szerepet játszik a hemosztázisban. A vérben oldott állapotban található fibrinogén monomerek alvadás során háromdimenziós hálót formálnak. Ez a háló az alvadék vázaként szolgál és, ellenállva a véráramlás miatt fellépő nyíróerőnek, alapvető szereppel bír az embolizáció megelőzésében. A hálózat bonyolult térbeli szerveződése viszont nagyban megnehezíti a kialakult fibrinszálak szerkezeti és mechanikai tulajdonságainak vizsgálatát. Az általunk kifejlesztett kvázi-kétdimenziós hálózat atomerő-mikroszkóppal végzett topológiai vizsgálatok által lehetőséget nyújt a fibrin ezen jellemzőinek feltárására.

A hálózat ~50 nm-es átlagos vastagsággal rendelkezik, melyen az egyedi szálak szerkezeti jellemzői megfigyelhetők. A minta rehidrálás után plazminnal emészthető: 10 nM végkoncentrációjú plazmin a teljes hálózatot 15 perc alatt emésztette meg. A lízist folyamatában is tudtuk követni egyedi szálakon és hálózat-részeken. Az egyedi szálak rugalmasságának növekedését tapasztaltuk, miközben a szálak hosszirányú integritása megtartott maradt. Ebből arra következtetünk, hogy a lízis első fázisában a szálon belüli protofibrillumok közti oldalirányú kötések szakadnak fel miközben a szálat összetartó hosszirányú kötések sértetlenek maradnak. Kisebb szálak esetén megfigyeltük azok kötegekbe rendeződését, amely egy köztük fellépő kohéziós erő jelenlétére utal. Az enzim a szálakat a lízisnek csak az utolsó fázisában, az előző folyamatokhoz képest gyorsan darabolta fel hosszirányban.

A lízis folyamán a szálak sokáig megőrizték hosszirányú integritásunkat, melynek szerepe lehet az embolizáció megelőzésében. Másrészt az így fenntartott magas helyi plazminkoncentráció lehetővé teszi a hálózat gyors hosszirányú feldarabolódását az emésztés utolsó fázisában.

Az általunk kifejlesztett kvázi-kétdimenziós hálózat egyedi rálátást nyújt a fibrinháló szerkezeti és mechanikai jellemzőire, azok változására a fibrinolízis folyamán és a mögöttes molekuláris mechanizmusokra.

14

A MÁJ ELIMINÁCIÓS FUNKCIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA CROHN BETEGSÉG MODELLBEN

Fischer Emil, Almási Attila[2]. Bojcsev Sztojan[1], Kovács Noémi-Piroska[3], Fischer Tamás[1], Perjési Pál[2], Simon Higin[1]

Pécsi Tudományegyetem[1]ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, [2]GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézet, [3] „Selena" Gyógyszertár Marosvásárhely

Ismert, hogy a Crohn betegségben számos változás jön létre a szervezetben. Jelen kísérleteink során azt a kérdést vizsgáltuk, hogy a máj eliminációs funkciója hogyan módosul, illetve, hogy a változások befolyásolhatók-e különböző védőanyagokkal? A Crohn betegség modelljét indometacin szubkután adásával /10 mg/kg/ hoztuk létre patkányban. A morfológiai változások értékelésére a Tamaki score-t használtuk, amelynek az alapja a hiprémia, vérzés, eróziók és fekélyek megjelenése, illetve azok súlyossága.

A máj eliminációs funkciójának a vizsgálatára az epevezetékbe kanült kötöttünk, amelyen keresztül 15 perces periódusokban folyamatosan gyűjtöttük az epét. A vékonybél középső szegmentumát olyan izotóniás oldattal perfundáltuk, amely 500 uM koncentrációjú p-Nitrofenolt /PNP/ tartalmazott. Az epeminták analízisével nyomon követhető volt az anyavegyület, illetve a metabolitjainak /PNP-glukuronid:PNP-G, PNP-szulfát:PNP-S/ a biliáris exkréciója.

Kísérleteink eredményei alapján megállapítható, hogy az indometacin csökkentette az epefolyást, valamint, hogy ezt a negatív hatást konzekvensen csak a mesalazin volt képes ellensúlyozni. Az indometacin mind az anyavegyület /PNP/, mind a metabolitok /PNP-G, PNP-S/ epével történő kiválasztását jelentõsen mérsékelte. Ez arra utal, hogy a metabolitok képzésében fontos biotranszformációs aktivitás negatív irányban változik a májban az általunk létrehozott Crohn betegség modellben. A biliáris exkrécióban észlelt változások részben /PNP, PNP-G/, vagy egészben /PNP-S/ kivédhetők voltak mesalazinnal, ami ellentétes a vékonybélben tapasztalt eltérésekhez képest.

Rövidítések: PNP: p-Nitrofenol,
PNP-G: p-Nitrofenol glukuronid,
PNP-S:p-Nitrofenol szulfát

Munkánk az EFOP 3.6.1. pályázat támogatásával készült.

15

TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID-1 (TRPV1) IONCSATORNA GÁTLÓK, MINT A TESTHŐMÉRSÉKLET CÉLZOTT MODULÁCIÓJÁNAK FARMAKOLÓGIAI LEHETŐSÉGEI

Garami András, Oláh Emőke, Kéringer Patrik, Csenkey Alexandra, Zsiborás Csaba, Gáspár Petra, Pákai Eszter, Rumbus Zoltán

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Transzlációs Medicina Intézet

A tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) ioncsatorna szerepe igazolt az energetikai folyamatok, így a testhőmérséklet szabályozásában. A TRPV1 kapszaicinnel, savi hatásokkal és fájdalmas hővel aktiválható. Az ioncsatornát gátló szerek (antagonisták) emlősökben a testhőmérséklet változását, gyakrabban emelkedését, ritkábban csökkenését okozzák. A testhőmérsékleti hatások hátterében álló mechanizmusok azonban nagyrészt tisztázatlanok maradtak.

Patkányokban és egerekben végzett testhőmérsékleti mérések során fény derült arra, hogy a TRPV1 antagonisták által indukált testhőmérséklet emelkedésért a TRPV1 ioncsatorna protonok általi aktivációjának gátlása során kialakuló hőtermelés fokozódás és bőrön keresztüli hőleadás csökkenés (vazokonstrikció felelős). A TRPV1 antagonisták egy másik csoportjának, a hipotermiát kiváltó anyagoknak a vizsgálata meglepő eredményt hozott: a TRPV1 protonok általi aktivációjának fokozásával ezek a szerek a hőtermelés csökkentése és a bőrön keresztüli hőleadás fokozása (vazodilatáció) révén a teshőmérséklet csökkenését idézik elő. Mind a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia, mind pedig a hipotermia a hasüregben elhelyezkedő TRPV1 csatornákra specifikus célhatás.

Következtetésként levonható, hogy a TRPV1 ioncsatorna kapszaicin aktivációját gátló antagonisták különösen érdekes gyógyszercsoportot képviselnek abban az értelemben, hogy ugyanannak a molekuláris és élettani mechanizmusnak az ellentétes irányú modulációjával képesek vagy hipertermiát vagy hipotermiát létrehozni. Gyógyszerfejlesztési szempontból ezek a hatások kihasználhatók lehetnek az alkalmazott termofarmakológiában célzott, gyógyszeres testhőmérséklet változások létrehozására, vagy ellensúlyozására.

Támogatás: NKFIH FK124483, UNKP-17-4-III-PTE-33.

Rövidítésjegyzék: TRPV1, tranziens receptor potenciál vanilloid-1

16

A BGP-15 HATÁSA A HUMÁN JOBB PITVARI MYOCARDIUM KONTRAKTILITÁSÁRA

Lampé Nóra[1], Erdei Tamás[1], Szabó Katalin[1], Kekecs Ivett[1], Zsuga Judit[2], Szerafin Tamás[3], Szilvássy Zoltán[1], Juhász Béla[1#], Gesztelyi Rudolf[1#]

[1] Debreceni Egyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
[2] Debreceni Egyetem, NK, Egészségügyi Menedzsment és Minőségirányítási Tanszék
[3] Debreceni Egyetem, KK, Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika, Szívsebészeti Tanszék
[#] egyenlő mértékű hozzájárulás az eredményekhez

A szívbetegségekkel összefüggő mortalitás világszerte, köztük hazánkban is magas. A szervezetet érő, nehezen kikerülhető stressz és az elsősorban egyéni döntéseken alapuló egészségtelen életmód egyaránt hozzájárul a cardiovascularis rendszer károsodásához. Bár a hangsúly a megelőzésen kell, hogy legyen, a szív- és érrendszeri betegségek kezelése is komoly kihívás, ami új, hatékonyabb és/vagy kedvezőbb mellékhatás-profillal rendelkező terápiás készítmények kifejlesztését teszi szükségessé.

Vizsgálatunk során egy a II. klinikai fázisvizsgálaton túljutott, hazai fejlesztésű molekula, a BGP-15 pitvari kontraktilitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk nyílt szívműtéten átesett betegekből származó, *ex vivo* isoproterenollal stimulált szövetmintán.

Eredményeink szerint a BGP-15 kis koncentrációban (< 10 µmol/l) nem befolyásolta érdemben az előzetesen isoproterenollal stimulált pitvarok kontrakciós erejét, nagy koncentrációban (> 1 mmol/l) viszont erős negatív inotróp szernek bizonyult. Közepes koncentráció-tartományban a BGP-15 hatása nagymértékben függött a pitvari béta-adrenerg rendszer akut aktiválhatóságának mértékétől. Az isoproterenolra erőteljes pozitív inotróp választ adó mintákon a BGP-15 negatív inotróp hatása számottevő volt, míg a gyengén stimulálható preparátumokon a negatív inotróp hatás is gyengének mutatkozott. Ugyanebben a kísérleti elrendezésben a propranolol negatív inotróp hatása alacsonyabb koncentrációnál fejlődött ki és hamarabb elérte a (BGP-15-éhez hasonló) maximumát, ugyanakkor ez a hatás csak kismértékben függött a preparátum isoproterenol-érzékenységétől.

Eredményeink azt mutatják, hogy a BGP-15 elsősorban indirekt negatív inotróp hatással rendelkezik és csak nagy koncentrációban fejt ki direkt negatív inotróp hatást. A klasszikus béta-blokkoló propranololéval összehasonlítva a BGP-15 kiváltotta negatív inotrópia körülbelül azonos maximális hatású, de kisebb potenciálú, emellett hangsúlyosabb az indirekt komponense.

BGP-15: O-[3-piperidino-2-hidroxi-1-propil]-nikotinsav amidoxim

17

FLUORESZCENCIAKIOLTÁS REKONSTITUÁLT MEMBRÁNOKBA ÁGYAZOTT FOTOSZINTETIKUS FÉNYBEGYŰJTŐ KOMPLEXEKBEN

GÖRFÖL Fanni, AKHTAR Parveen, LAMBREV Petar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged

A fotoszintetikus organizmusok gyakran vannak kitéve gyorsan bekövetkező szélsőséges fényintenzitásbeli változásoknak. Alacsony fényintenzitás mellett a napenergiából elnyerhető maximális hatékonyság eléréséhez, többlet fényenergia elnyelése esetén pedig a fotoszintetikus szervezet védelme érdekében a fénybegyűjtő rendszer finomhangolt működésére van szükség. Erős fényviszonyok mellett a reakciócentrumok fokozatosan telítődnek, a fölöslegesen elnyelt energia potenciálisan károssá válik. Ennek kivédésére fejlesztették ki az NPQ mechanizmusait az oxigéntermelésre képes organizmusok.Növényekben az NPQ elsősorban az LHCII-ben zajlik, konformációs változásokat vonva magával. In vitro kísérletekben, az NPQ kiváltható a komplexek aggregációjával. Tisztázatlan azonban, hogy ugyanez a kioltási mechanizmus zajlik-e le in vivo, fotoszintetikus membránokban is. Egyes feltételezések szerint az in vitro aggregáció olyan klorofill–klorofill érintkezési pontokon ill. útvonalakon eredményez kioltást, melyek előfordulása a tilakoidok lipid membránjába ágyazott LHCII esetében kizárható. Ezen makromolekulák szerkezetének és funkcióinak tanulmányozására gyakori megközelítés a membránfehérjék beágyazása mesterségesen előállított lipid membránokba. Munkám a membránba ágyazott, natív-szerű környezetben lévő LHCII fluoreszcencia tulajdonságait, ill. az ebben a rendszerben – kiinduló feltételezésünk szerint – lejátszódó kioltás jelenségének vizsgálatát helyezi középpontba. Egyensúlyi és időfelbontásos fluoreszcencia spektroszkópia alkalmazásával vizsgáltuk a liposzómákba ágyazott LHCII trimerek működését különböző lipid:fehérje arányok mellett. Egy újszerű módszert dolgoztunk ki a rekonstituált proteoliposzómák lipid:fehérje arányának pontos meghatározására lipid festék alkalmazásával. A proteoliposzómák nagyfokú heterogenitást mutattak méretük, fehérjesűrűségük és fluoreszcencia spektroszkópiai tulajdonságaik terén, még sűrűséggradiens ultracentrifugálással való szeparálást követően is. Vizsgálataink erős monoton kapcsolatot tártak föl az LHCII fluoreszcenciahatásfoka és a lipid:fehérje arány között. Mérési eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a fluoreszcencia hatásfoka és élettartama a fehérjesűrűség növelésével fokozatosan csökken. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a fellépő kioltás korrelál a távoli vörös fluoreszcenciaemisszió megjelenésével, amit már korábban megfigyeltek mind mesterségesen létrehozott aggregátumokban, mind pedig ép növényi levelekben NPQ feltételek mellett. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az NPQ-t rekonstituált membránokban LHCII-LHCII kölcsönhatások váltják ki, nagy valószínűséggel ugyanazt a mechanizmust követve, mint a fotoprotektív NPQ folyamata in vivo.

NPQ: nem-fotokémiai fluoreszcenciakioltás

LHCII: II. fénybegyűjtő komplex

18

LIPIDEK ÉS A STRESSZ: A HASADÓ ÉLESZTŐ, MINT MODELLSZERVEZET

Gudmann Péter, Péter Mária, Balogh Gábor, Gombos Imre, Horváth Ibolya, Vígh László, Glatz Attila

MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Molekuláris Stresszbiológia Csoport, Szeged

Az egyik legfontosabb környezeti stresszforrás a hőmérséklet gyors megváltozása. A hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) - amely az emlősökhöz nagyban hasonlító stresszválasszal és jelátviteli útvonalakkal rendelkezik - a szubletális hőstressz (HS) elleni védelemben legfontosabb szerepet játszó folyamatok közé tartozik a különböző termoprotektív molekuláknak - hősokkfehérjéknek (Hsp), trehalóznak és lipideknek - a szintézise, valamint a membránok újrarendezése. A membránok ezen túl a „fluiditás" változásán keresztül képesek érzékelni a hőmérséklet növekedését/csökkenését, így hőmérőként működnek a sejt számára. A hőmérséklet változásának hatására jelentősen megváltozik a membránok lipidösszetétele. Az *S. pombe*-ban az egyik meglepő változás a triacilglicerol (TG) szintjének és szaturációjának megváltozása HS hatására. A TG a „lipid droplet"-ek (LD) egyik fő alkotója és feltehetően jelentős szerepe van a hősokk elleni védelemben. Ennek vizsgálatához inaktiváltuk a TG szintéziséhez szükséges két enzimet (dga1, plh1), majd az így kapott egyszeres és kétszeres mutáns (DKO) törzseket megvizsgálva megfigyeltük, hogy mindhárom mutáns törzs hőérzékeny. Továbbá, a DKO enyhe HS utáni növekedése és membránösszetétele jelentősen eltér mind a vad típustól, mind az egyszeres mutánsokétól, valamint nem mutatható ki benne LD. Törzseink membránjainak fizikai állapotát lipofil fluoreszcens festékek segítségével (transz-parinársav, di-4-ANEPPDHQ) is elkezdtük tanulmányozni normál és HS körülmények között. Ahhoz, hogy információt kapjunk a végbemenő változásokról, a jelölt sejteket fluorimetriás, mikroszkópos és ún. „lifetime" méréseknek vetettük alá. Korábbi vizsgálatainkból ismert, hogy több Hsp is kölcsönhat membránokkal, módosítva azok fizikai állapotát, finomszerveződését. Ezért GFP-jelölt Hsp-k felhasználásával megvizsgáltuk, hogy az eltérő hőmérsékletű enyhe HS-ok alatt miként változik a Hsp-osztályok (sHsp-k, Hsp70, Hsp104) indukciós kinetikája mind a vad típusban, mind a mutáns törzseinkben.

Rövidítések listája:

HS: hősokk

(s)Hsp: (kis mólsúlyú)hősokkfehérje

LD: lipid droplet

S. pombe: *Schizosaccharomyces pombe*

TG: triacilglicerol

19

AZ ABCG2 KONFORMÁCIÓ VÁLTOZÁSAINAK VIZSGÁLATA PERMEABILIZÁLT SEJTEKEN

Gyöngy Zsuzsanna[1], Szakács Gergely[2], Goda Katalin[1]

[1.] Debreceni Egyetem; Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
[2.] MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet, Budapest

Az ABCG2 az ABC kazettás fehérjék családjába tartozó aktív transzporter, amely képes a daganatellenes szereket kipumpálni a sejtekből, ezáltal multidrog rezisztenciát okozni. Számos ABC transzporter kristályszerkezete alapján feltételezhetjük, hogy az ABCG2 egy nukleotid mentes, intracelluláris oldalról nyitott- és egy nukleotid kötött intracelluláris oldalról zárt konformáció között fluktuál. A konformáció érzékeny kötődésű 5D3 antitest segítségével a két konformer elkülöníthető, arányuk meghatározható. Kísérleteink célja olyan az 5D3 antitest allkalmazásán alapuló kídsérleti protokollok kidolgozása, melyek segítségével az ABCG2 fehérje katalitikus ciklusa tanulmányozható.

Bakteriális toxinnal permeabilizálva a sejteket a nukleotidok kimoshatóak és a sejtfelszíni ABCG2 fehérjék 5D3-reaktív konformációba kerülnek. ATP adását követően a fehérjék a nukleotid koncentrációjától függő módon átváltottak az 5D3 antitestet nem kötő konformációba. Ez a konformáció változás az ATP hidrolízisét kizáró körülmények között pl. Mg^{2+} hiányában vagy ADP adása hatására is megfigyelhető volt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a fehérje 5D3-reaktív konformációból történő átfordulását 5D3-at nem kötő konformációba, a nukleotidok kötődése és disszociációja befolyásolja. A vanadát gátolja az ABC transzporterek általi ATP hidrolízist, mivel az ATP hidrolízisét követően képes az eltávozó foszfát helyére nagy affinitással bekötődni és az újabb hidrolitikus ciklus bekövetkezését meggátolni. Ezzel összhangban kísérleteinkben vanadát kezelés hatására növekedett az ABCG2 nukleotid kötésének látszólagos affinitása ATP/Mg^{2+} jelenlétében, míg Mg^{2+} hiányában a vanadát kezelés nem befolyásolta a nukleotid kötődés látszólagos affinitását. Kinetikai méréseink alapján elmondhatjuk azt is, hogy az ABCG2 szubsztrát quercetin, fokozta a vanadát által csapdázott poszt-hidrolitikus konformer létrejöttének sebességét. Megfigyeltük azt is, hogy az 5D3 antitest kötődése az ABCG2 fehérjéhez reverzibilis, valamint az antitest disszociációjának sebességét fokozta az ATP/Mg^{2+} és szubsztrát quercetin jelenléte. Eredményeink alátámasztják, hogy a konformáció érzékeny kötődésű 5D3 antitest alkalmas az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálatára.

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

20

AZ MTOR-AMPK-AUTOFÁGIA INDUKTOR SZABÁLYOZÁSI KAPCSOLATÁNAK RENDSZERBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Hajdú Bence, Holczer Marianna, Bánhegyi Gábor, Kapuy Orsolya

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

Az utóbbi években egyre több olyan tanulmány készült, ahol a biológiai rendszerek dinamikai viselkedését elméleti módszerekkel próbálják közelíteni. Egy lengyel-amerikai kutató csoport létrehozott egy egyszerű matematikai modellt, amelyben az önemésztést végző autofágia és a sejtnövekedést szabályozó mechanizmusok leírására a kulcsfontosságú tagokat és azok egymásra gyakorolt hatását differenciálegyenletekkel írták le.A modell három tagból, az mTOR, az AMPK és az Ulk1 fehérjékből áll. Az AMPK alacsony energiaszinteken az Ulk1-en keresztül aktiválja az autofágiát, míg közben gátolja az mTOR aktiválódását. Ezzel szemben az mTOR jóllakott állapotban direkt és indirekt módon az Ulk1-en keresztül akadályozza az autofágiát. Az Ulk1 negatív hatást fejt ki az AMPK-ra, ezzel megakadályozva az autofágia túlpörgését, illetve az mTOR fehérjét is gátló hatást fejt ki, ezzel autofáfia közben a sejtnövekedést leállítja. A modell csupán két inputot vizsgál, a rapamycin szintjét, mely az mTOR-t gátolja, illetve az AMPK aktivitási szintjét, amely a sejt energia-ellátottságának legfontosabb szenzora. Több kísérletes eredményt is megfelelően szimulálnak (pl. éhezés, rapamycin kezelés), ugyanakkor számos, már kísérletekkel bizonyított folyamatot nem jól írnak le.Elképzelésünk szerint a modell kulcsfehérjéi között egyéb kapcsolat is van, nevezetesen az mTOR képes az AMPK gátlására, így létrehozva egy extra dupla negatív visszacsatolási hurkot a rendszerben. Azt gondoljuk, hogy ennek a szabályozási huroknak döntő szerepe van abban, hogy az elméleti úton készített modell más mutáns fenotípusokat is meg tudjon magyarázni. Az általunk létrehozott modellel három inputot vizsgál: a sejtek éhezését (AMPK aktiválás), a rapamycin szintet (mTOR gátlás) és a rezveratrol szintet (mTOR gátlás és AMPK aktiválás). Ennek az új modellnek a viselkedését különböző matematikai módszerrel (pl. számítógépes szimulációk, jel-válasz görbék készítése) vizsgáljuk. Emellett modellünk helyességét humán embironális vese sejteken végzett kísérletekkel is bizonyítjuk.

Az alábbi munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4-III-SE-75 Kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

AMPK – AMP-activated protein kinase,
mTOR - mammalian target of rapamycin,
ULK1 - Unc-51 like autophagy activating kinase

21

A PACAP HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PIGMENTSEJTEKEN

Hajdú Tibor[1], Juhász Tamás[1], Kovács Patrik[1], Zsigrai Emese[1], Vágó Judit[1], Emri Gabriella[2], Reglődi Dóra[3], Zákány Róza[1]

[1]DE ÁOK Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
[2]DE ÁOK Bőrgyógyászati Klinika
[3]PTE ÁOK Anatómia Intézet

A PACAP (hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) a hypothalamus által termelt 38 aminosavból álló neuropeptid, melyet először az idegrendszerben mutattak ki, de jelenlétét leírták már más szövetekben és szervekben is. Malignus betegségek kapcsán igazolták a daganatsejtekre gyakorolt gátló hatását. A bőr pigment termelő sejtjeiben (melanocyták) és az azokból esetlegesen kialakuló rosszindulatú neoplasticus elváltozásokban (melanoma malignum cutis) a PACAP lehetséges szerepei idáig ismeretlenek, így munkánk célja, hogy megvizsgáljuk a neuropeptid hatásait melanoma sejteken és melanocytákon.

Kísérleteinket eltérő malignitású melanoma sejtvonalakon (A2058, WM35) és normál humán epidermális melanocytákon (NHEM) végeztük. A PACAP receptorainak (PAC1, VPAC1, VPAC2) és bontóenzimének (DPP4) mRNS és fehérje szintű jelenlétét RT-PCR-ral és Western blottal végeztük. A sejtek PACAP termelő képességét a PACAP előalak (preproPACAP) mRNS expressziójának detektálásán keresztül ellenőriztük. A PAC1 receptor kifejeződését bőrből illetve különböző mélységű melanomás elváltozásokból származó szövetminták immunhisztokémiai vizsgálatával is megerősítettük. A PACAP lehetséges sejtmorfológiára, motilitásra, osztódásra gyakorolt hatásait többféleképpen vizsgáltuk, először egy inkubátorba helyezhető sejtmonitorizáló kamera alkalmazásával videoanyag formájában rögzítettük a vizualizálható változásokat. Emellett migrációs (Boyden-kamra) és inváziós assay-ket (Matrigel) végeztünk, ahol PACAP kezelést követően drasztikus csökkenést figyeltünk meg a melanoma sejtek motilitásában. Utóbbi eredményeink tükrében a PACAP-nak a pigmentsejtek citoszkeletonjára kifejtett hatásait folyamatban lévő kísérleteinkben vizsgáljuk. 2x24 órás PACAP kezelést követően CyQuant proliferációs assay-vel a WM35 sejtvonalon szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a sejtek osztódásában.

Eredményeink arra utalnak, hogy a PACAP csökkenti a rosszindulatú sejtek in vitro vizsgált migrációs és inváziós képességét, és feltehetően negatív hatással bír a malignus sejtek proliferációjára is. A neuropeptid hatásainak és a hatások mögötti jelátviteli folyamatok

részletesebb feltárása melanocytákban és melanoma sejtekben hiánypótló jellegű és fontos információkat szolgáltathat a pigmentsejtek biológiájának jobb megértéséhez.

22

A TERMO- ÉS OZMOSZENZITÍV TRP IONCSATORNÁK KIFEJEZÕDÉSE ÉS SZEREPE HUMÁN DERMÁLIS FIBROBLASZTOKON

Herczeg-Lisztes Erika, Kelemen Balázs[2], Vladár Anita[2], Puskás Zsófia[2], Gyetvai Ágnes[1], Bíró Tamás[1], Tóth István Balázs[2]

1Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Immunológiai Intézet, 2 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna család tagjai a sejtek környezetében bekövetkező fiziko-kémiai változások fontos szenzorai; részt vesznek az ozmotikus-, mechanikus-, termális- és kémiai ingerek detektálásában és feldolgozásában. A TRP család számos tagja kifejeződik a bőr epidermális keratinocytáin, és a bőrfüggelékekben, ahol kiemelkedõ szereppel bírnak az epidermális barrier funkció kialakításában, a szőrnövekedés, a faggyútermelés, valamint a gyulladásos mediátorok szintézisének szabályozásában. A bőr mélyebb, dermális rétegének sejtjein funkciójuk azonban kevésbé ismert, ezért munkánk során humán dermális fibroblasztokon (HDF-okon) vizsgáltuk a hőérzékeny TRP csatornák kifejeződését és funkcióját.

Humán sebészeti mintákból származó bőrből izolált primer HDF sejteken kvantitatív RT-PCR technika alkalmazásával vizsgáltuk a termoszenzitív TRP csatorna transzkriptek expresszióját. A kifejeződő TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 és TRPA1 közül a TRPV4 expressziója volt a legmagasabb, TRPM3-at csekély mértékben, míg TRPM8-at egyáltalán nem detektáltunk.

Ezt követően a dominánsan expresszálódó, hőmérséklet emelkedésre és hipozmotikus ingerekre is érzékenyTRPV4 szerepét vizsgáltuk. Fluoreszcens Ca^{2+} indikátorok segítségével megállapítottuk, hogy a TRPV4 funkcionális ioncsatornát alkot HDF sejteken: specifikus agonistái (GSK1016790A, 4αPDD) dózisfüggően emelték az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, amit a TRPV4 szelektív antagonista HC-067047 erőteljesen gátolt. Hipotóniás ingerek alkalmazására a HDF sejtek az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tranziens emelkedésével reagáltak, ami a HC-067047 jelenlétében jelentősen csökkent, utalva a TRPV4 szerepére a hipotóniás ingerre adott válaszban.

A továbbiakban vizsgáltuk a TRPV4 szerepét a HDF sejtek biológiai funkcióinak szabályozásában. Eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a TRPV4 aktivációja jelentősen befolyásolhatja bizonyos, az extracelluláris mátrix kialakításában fontos szereppel bíró gének (kollagén, mátrix metalloproteinázok) expresszióját valamint egyes gyulladásos citokinek termelődését. Ez alapján felmerül a dermális fibroblasztokon kifejeződő TRPV4 lehetséges szerepe az extracelluláris mátrix dinamikus átépülésének szabályozásában és a sebgyógyulás regulációjában valamint egyes gyulladásos bőrbetegségek és fibrotikus elváltozások kialakulásában.

Rövidítések: TRP – Tranziens receptor potenciál; HDF – Humán dermálisfibroblaszt; RT-PCR – Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció; 4αPDD– 4α-Phorbol 12,13-didecanoate

23

A PACAP JELÁTVITEL ZAVARAI ALZHEIMERES EGEREK VESÉIBEN

Hinnah Barbara[1], Horváth Gabriella[2], Perényi Helga[1], Zákány Róza[1], Reglődi Dóra[1], Juhász Tamás[1]

[1] Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
[2] Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Anatómiai Intézet, PTE-MTA, „Lendület PACAP kutatócsoport”

Az Alzheimer-kór a központi idegrendszer degeneratív betegsége, mely kialakulása során több perifériás szerv funkciója is patológiásan elváltozhat, pl. a vese, here, pancreas. A PACAP (hypophysis adenilát-cikláz aktiváló peptid) egy 38 aminosavból álló neuropeptid. Fontos szerepet tölthet be az Alzheimer kór egyes folyamataiban és a betegség manifesztációját csökkenti, valamint számos egyéb patológiás folyamatban is pozitív hatással bír. Hipotézisünk szerint a PACAP és a BMP jelátviteli útvonal kapcsolata sérülhet Alzheimer-kóros vesében. A Framelim egy lizált probiotikumokat, vitaminokat és zsírsavakat tartalmazó táplálék kiegészítő, melynek adagolása pozitív hatású a betegség lefolyására, illetve azt találták, hogy az aktív mozgás is késlelteti a betegség manifesztációját.

Kísérleteink során Western Blot, RT-PCR és immunhisztokémiai módszerekkel hasonlítottuk össze Alzheimer-kóros, Framelimmel kezelt valamint aktív mozgásterápián átesett egerekben a PACAP jelátviteli útvonal egyes elemeinek jelenlétét.

Kimutattuk, hogy a PAC1 és VPAC1 receptorok fehérjeexpressziója megnő az Alzheimeres egyedekben, melyet a Framelim is megemel, viszont az aktív mozgás csak a VPAC1 receptor fehérjeexpresszióját emeli. A PKA expressziója Alzheimer-kóros egerekben csökken, de nem változtatja meg a mozgás és a Framelimes étrend sem. A BMPR1, BMP4 és Smad1 fehérjeexpressziója emelkedik az Alzheimeres modellállatok veséiben, mely változásokat Framelim adagolása csökkenti és a mozgás kontroll értéken tart. Ezzel ellentétben a CREB aktívabb, foszforilált jelenléte megemelkedik és a IV-es típusú kollagén fehérjeexpressziója is fokozódik, és Framelim adagolása további növekedést okoz az Alzheimeres állatokban. A mozgás terápia viszont jelentősen csökkenti a IV-es típusú kollagén expresszióját, de a CREB expressziót kontroll értéken tartja.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vese tubulusainak membrana basalisában nélkülözhetetlen IV-es típusú kollagén termelése a PACAP jelátviteli útvonal megváltozásán keresztül szenved zavart Alzheimer kóros állatokban. Az alkalmazott beavatkozások hatása nem egyértelmű.

PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide PKA: protein kináz A, BMP: bone morphogenic protein, CREB:cAMP response element-binding protein

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

24

AZ MTOR ÉS AZ AMPK KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA

Holczer Marianna, Hajdú Bence, Bánhegyi Gábor, Kapuy Orsolya

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

A sejtek homeosztázisát bonyolult szabályozási hálózatok működése tartja fent. Ebben a folyamatban kulcsfontosságú a tápanyag-ellátottságot követő mTOR és az energiatöltöttséget érzékelő AMPK közötti egyensúly. Ezen folyamatok szoros kapcsolatban állnak az ULK1 kinázzal, amely az autofágia induktora. Elegendő tápanyag esetén az mTOR az ULK1 gátlásán keresztül gátolja az autofágiát és elősegíti a felépítő folyamatokat. Celluláris stressz hatására az AMPK gátolja az mTOR-t, és az ULK1-en keresztül aktiválja az autofágiát, miközben az mTOR gátlására az ULK1 is rásegít. Bizonyított, hogy az ULK1 negatív visszacsatolással gátolja az AMPK-t, ami lehetővé teszi az autofágia lecsengését és az mTOR visszaaktiválódását. Véleményünk szerint egy extra negatív szabályozás is megtalálható a hálózatban, nevezetesen az mTOR gátolja az AMPK-t. Ez a dupla negatív visszacsatolási hurok az AMPK és mTOR között nélkülözhetetlen, hogy az AMPK biztosan inaktív maradjon, ha a sejtnek nincs szüksége rá. Kutatómunkánk célja az mTOR-AMPK-ULK1 szabályozási hálózatban levő kapcsolatok pontosabb meghatározása. Kísérleteinkhez humán embrionális vese sejteket (HEK293T) használtunk. A sejteket kezeltük resveratrollal (AMPK-t aktiválja, mTOR-t gátolja), rapamycinnel (mTOR-t gátolja), Compound C-vel (AMPK-t gátolja) és éheztettük (AMPK-t aktiválja) őket. Vizsgáltuk a sejtek életképességét és Western blottal követtük nyomon a fehérjék változását. Egyes fehérjék szintjének a szabályozására siRNS-t használtunk.Azt tapasztaltuk, hogy az AMPK nélkülözhetetlen az autofágia elindításához, míg az ULK1 az autofágia fenntartásához kell. mTOR gátlása és/vagy AMPK akitvációja esetén először az AMPK majd az ULK1 aktiválódott, amelyet az autofágia indukciója követett. Amennyiben az mTOR gátlását az AMPK gátlásával kombináltuk, akkor nem láttunk ULK1 aktiválódást és az autofágia is inaktív maradt. Emellett kísérletekkel igazoltuk, hogy az AMPK aktív az mTOR gátlása alatt. A molekuláris kísérletek mellet az mTOR-AMPK-Ulk1 közötti kapcsolatokat elméleti biológiai eszközökkel is vizsgáljuk.Az alábbi munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4-III-SE-75 Kódszámú Új

Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

AMPK – AMP-activated protein kinase, mTOR - mammalian target of rapamycin,
ULK1 - Unc-51 like autophagy activating kinase

25

A MIOZIN 16 ANKYRIN DOMÉN HATÁSA AZ AKTOMIOZIN RENDSZERRE

Holló Alexandra[1], Vékony Zsófia[1], Kengyel András[1,2], Nyitrai Miklós[1,2,3]

[1] Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet
[2]Szentágothai János Kutató Központ
[3]MTA-PTE Nukleáris-Mitokondriális Interakciók Kutató Csoport

A miozin motorfehérje-család egyik kevéssé ismert tagja a nem-konvencionális miozin 16, amely a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt megtalálható és feltételezések szerint a sejtciklus és a proliferáció szabályozásában játszhat szerepet. A miozin 16-ot legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszer szöveteiben mutatták ki, elsősorban az idegfejlődés időszakában. Érintettsége humán kórképek, pl. a skizofrénia és az autizmus kialakulásának hátterében is valószínűsíthető. A miozin 16 fehérjék szerkezeti sajátossága a fehérje N-terminális részén található, 8 ankyrin ismétlődést tartalmazó domén (Myo16Ank). Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a Myo16Ank kötődik a nehéz meromiozinhoz (HMM) és fokozza annak ATPáz aktivitását.

A motor funkció szabályozása kulcsfontosságú a miozin fehérjék működése szempontjából. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy a Myo16Ank a HMM melyik részéhez kapcsolódva fejti ki a hatását, illetve az ATPáz ciklus melyik lépését tudja befolyásolni. Vizsgálatainkhoz steady-state anizotrópia illetve ATPáz aktivitás mérést, valamint *in vitro* motilitási próbát használtunk, teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkóp segítségével. Kísérleteinket vázizom aktomiozin modell rendszeren végeztük.

Eredményeink azt mutatták, hogy a Myo16Ank a vázizom HMM-en belül közvetlenül a motor doménhez, az úgynevezett S1 fragmentumhoz képes kötődni ($K_D \sim 7{,}01\ \mu M$) és közvetlenül fokozza az S1 ATPáz aktivitását. Az *in vitro* motilitási próba során megfigyeltük, hogy a Myo16Ank jelenléte koncentráció függő módon fokozza az aktin filamentumok motilitási sebességét. Mivel a Myo16Ank közvetlenül nem képes aktint kötni, a hatás feltételezhetőleg a motor domén ADP kibocsátásának fokozásán keresztül valósulhat meg. Különböző ATP koncentrációkon elvégezve a mérést azt tapasztaltuk, hogy a My16Ank jelenlétében a motor domén alacsonyabb ATP koncentráción éri el a maximális reakciósebességet.

Eddigi eredményeink alapján a Myo16Ank egyik lehetséges intramolekuláris szerepe a miozin 16 motor aktivitásának szabályozása lehet, mégpedig a motor aktivitás közvetlen fokozásán keresztül.

Myo16Ank: Miozin 16 ankyrin domén; HMM: nehéz meromiozin;

26

AZ ABCG2 MULTIDROGTRANSZPORTER EGY ÚJONNAN AZONOSÍTOTT POLIMORF VARIÁNSÁNAK JELLEMZÉSE

Homolya László, Bartos Zsuzsa, Zámbó Boglárka, Mózner Orsolya, Sarkadi Balázs

MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az ABCG2 egy membrántranszporter, melynek feladata az endo- és xenobiotikum sejtekből történő eltávolítása. Overexpressziója rákos sejtekben multidrog-rezisztenciát okoz, ezért multidrog transzporterként is ismert. Mivel a húgysav is az ABCG2 transzportált szubsztrátjai közé tartozik, a fehérje diszfunkciója hiperurikémiához, illetve köszvényhez vezethet. Egy korábbi munkában egészséges emberek és köszvényes betegek vörösvérsejtjeiben az ABCG2 expressziós szintjét meghatározva, sikerült azonosítani egy eddig még nem ismert polimorf variánst (M71V), amely alacsonyabb expressziót mutat az eritrocitákban. A mostani vizsgálatunk célja az volt, hogy feltárjuk ennek a polimorfizmusnak a hatását az ABCG2 transzporter expressziójára, lokalizációjára és funkciójára. Összehasonlításképpen az ABCG2 vad típusú (vt) változatát, egy katalitikusan inaktív (K86M) mutánst, valamint egy olyan ismert polimorf variánst használtunk, amely a köszvénnyel hozható összefüggésbe (Q141K). Kísérleteink rámutattak, hogy az M71V változat a vt ABCG2-höz képest alacsonyabb szinten expresszálódik emlős sejtekben. Szemben a vad típusú fehérjével, ami a plazmamembránban helyezkedik el, az M71V-ABCG2 jórészt intracelluláris lokalizációt mutat. Két független rendszerben vizsgálva az M71V variáns funkcióját, az tapasztaltuk, hogy a polimorfizmus csak kevéssé befolyásolja az ABCG2 transzport kapacitását és ATPáz aktivitását. Kémiai chaperonok (4-fenil butirát és kolhicin) emelték az M71V-ABCG2 expressziós szintjét és a sejtfelszíni megjelenését. Összegezve, kísérleteink arra utalnak, hogy az M71V polimorf variáns egy folding és trafficking mutáns, amely egy nem kellően stabil fehérje, és feltehetően jórészt lebontásra kerül. Ha viszont eljut a sejtfelszínre, akkor el tudja látni a funkcióját, így a farmakológiai chaperonok képesek lehetnek korrigálni ezzel a polimorfizmussal járó fenotípust.

27

IDH1 MUTÁCIÓVAL ÖSSZEFÜGGŐ BIOENERGETIKAI JELLEGZETESSÉGEK VIZSGÁLATA HUMÁN GLIOMA SEJTEKBEN

Hujber Zoltán[1], Petővári Gábor[1], Horváth Gergő[2], Dankó Titanilla[1], Krencz Ildikó[1], Tóth Fanni[1], Tretter László[2], Jeney András[1], Anna Sebestyén[1]

[1] Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

[2] Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest

Bevezetés: A low grade gliomák és szekunder glioblastomák 80%-ára jellemző az izocitrát-dehidrogenáz 1 (IDH1) enzim funkciónyeréses mutációja. A mutáció következtében D-2-hidroxiglutarát onkometabolit termelődik a sejtekben, mely epigenetikai és metabolikus változásokat okoz a tumorsejtekben. Az IDH1 mutáció meghatározásának fontos szerepe van a gliomák diagnosztikus besorolásában. Célunk az IDH1 mutációval kapcsolatos energetikai jellegzetességek vizsgálata, illetve terápiás lehetőségek keresése.

Módszerek: Vizsgálatainkban U87 MG, U373 MG, U251 MG sejtvonalakat alkalmaztunk. Az IDH1 mutáció hatásának tanulmányozására az U251 MG IDH1 R132H transzfektált klónját használtuk. A sejtek oxigénfogyasztását, glikolitikus tevékenységét és szubsztrát oxidációját Seahorse technikával mértük. A sejtek anyagcseréjét folyadékkromatográfia-tömegspektrometria módszerrel és Western blottal (anyagcsere enzimek, transzporterek és szabályozó fehérjék expresszióját) vizsgáltuk (intra- és extracelluláris energia és onkometabolittermelés).

Eredmények: A sejtvonalak oxigénfogyasztása és glikolitikus kapacitása jelentős különbségeket mutat. Az IDH1 mutáció az alacsonyabb glikolízissel és magasabb sejtlégzéssel mutatott összefüggést. Az U251 MG sejtekre magas glutamin, glutamát és malát oxidáció volt jellemző, mely az IDH1 mutáns U251 MG sejtekben szignifikáns csökkenést mutatott. Az U251 MG IDH1 vad típusú sejteket D-2-hidroxiglutaráttal kezelve megfigyeltük, hogy mind az alaplégzés, glikolitikus tevékenység és szubsztrátoxidáció is az IDH1 mutáns U251 MG sejtekhez hasonló változásokat okozott az anyagcserében.

Következtetés: Az IDH1 mutáció az alacsonyabb glikolízissel, magasabb sejtlégzéssel és megváltozott glutamin anyagcserével mutatott összefüggést, melyeknek akár terápiás jelentősége is lehet a jövőben.

Támogatás: Richter Centenárium Alapítvány, STIA-KF- 17(SA), Bolyai-590/2015(SA), ÚNKP-17- 3(HZ)-17- 3(KI)-17- 2(DT)

28

A PROTEÁZ-AKTIVÁLT RECEPTOR 1 JELÁTVITELI FOLYAMATAI ENDOTÉLIUMBAN ÉS ÉRSIMAIZOMBAN

Janovicz Anna, Kerkovits Nóra Melinda, Dr. Benyó Zoltán, Dr. Ruisanchez Éva

Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató Intézet

Bevezetés: A trombin hatásait közvetítő PAR1 receptor az erek endotél és simaizom sejtjein is kifejeződik. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a PAR1 receptorok aktivációja hogyan hat az értónusra, és hogy milyen jelátviteli folyamatok vesznek részt a hatások közvetítésében.

Módszerek: Kísérleteinket WT, illetve PAR2, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ és eNOS KO, valamint $G\alpha_i$ fehérjéket gátló pertussis toxinnal kezelt egerek izolált mellkasi aortaszegmensein végeztük. Ép endotéliumú és endotél-irott ereken is kísérleteztünk. Az értónus változásait izometriás körülmények között miográfon regisztráltuk és a 124 mM K^+ indukálta kontrakcióra normalizáltuk. A PAR1 receptorok szelektív aktiválására a TRAP-6 peptidet alkalmaztuk.

Eredmények: A TRAP-6 ép endotéliumú WT erekben jelentős relaxációt okozott, míg eNOS KO és endotélium-írtott WT erekben kontrakciót váltott ki. Mindkét hatás jelentősen lecsökkent a PAR1 antagonista Vorapaxar jelenlétében. Meglepő módon a TRAP-6 relaxáns hatása PAR2 KO erekben is lecsökkent, ami valószínűleg a PAR1 és PAR2 receptorok közötti transzaktivációval magyarázható. Az intracelluláris jelátviteli folyamatokat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a PLC gátlószer U73122 eltüntette a TRAP-6 relaxáns hatását, mely a $G\alpha_{q/11}$/PLC/IP3 jelátviteli út érintettségére utal az eNOS–aktiváció folyamatában. Ezzel szemben a TRAP-6 okozta vazokonstrikció változatlan maradt $G\alpha_{q/11}$ KO erekben, illetve a $G\alpha_i$ gátolt egerek ereiben is. Jelentősen csökkent vazokostrikciót tapasztaltunk azonban $G\alpha_{12/13}$ KO erekben, valamint a Rho-kináz Y-27632-vel történő gátlását követően $G\alpha_{q/11}$ KO erekben.

Következtetések: Eredményeink szerint a PAR1 receptorok jelátviteli folyamatai jelentősen különböznek az endotéliumban és az érsimaizomban. Az endotéliumfüggő vazorelaxáció közvetítésében a PAR1/PAR2 transzaktiváció is szerepet játszik és az intracelluláris jelátvitel a $G\alpha_{q/11}$/PLC/IP3 úton valósul meg. Ezzel szemben a vazokonstrikcióban a $G\alpha_{12/13}$/Rho/ROCK jelátviteli út játszik szerepet. Az intracelluláris jelátviteli utak különbözősége lehetőséget teremt a PAR1 receptorok által közvetített vazodilatátor és vazokonstriktor válaszok szelektív farmakológiai gátlására.

Rövidítések:

eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz; IP3: inozitol-triszfoszfát; KO: deficiens; PAR1: proteáz-aktivált receptor 1; PLC: foszfolipáz-C; ROCK: Rho-kináz; WT: vad típusú

Kutatási támogatás: OTKA K-112964, NVKP_16-1-2016-0042

29

BIOAKTÍV FOSZFOLIPIDEK TUMORELLENES HATÁSA

Juhász Kata, Schmidt János, Wahr Mátyás, Marosvölgyi Tamás, Lóránd Tamás, Gallyas Ferenc, Balogi Zsolt

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A zsírsavakat és a lipideket a tumorok progressziójának és metasztázis képzésének kulcsfontosságú összetevőjeként emelik ki, azonban hatásmechanizmusuk kevéssé ismert. Egyes bioaktív foszfolipidek metabolikus útvonalainak enzimei között több tumor szupresszort is azonosítottak. Kémiai szintézissel előállított specifikus foszfolipidek tumorellenes szerepét 3D szferoid és klasszikus Boyden-kamra kemotaxis kísérletekben vizsgáltuk *in vitro* több erősen áttétképző tumor sejtvonalban. A tumor inváziós útvonalak farmakológiai gátlásával vizsgáltuk az érintett jelátviteli kaszkádokat és a sejtek túlélését. Klinikai tumor minták analitikai elemzésével a vizsgált foszfolipidek *in vivo* szerepét vizsgáltuk a lehetséges terápiás felhasználhatóság felderítésének érdekében.

30

A CIKLOFILIN D-FÜGGŐ MITOKONDRIÁLIS PERMEABILITÁS TRANZÍCIÓ KRITIKUS SZEREPE GYULLADÁSOS FOLYAMATOKBAN, STERIL SOKK ESETÉN

Kálmán Nikoletta[1] Veres Balázs[1], Antus Csenge[1], Fónai Fruzsina[1], Jakus Péter Balázs[1], Boros Éva[3], Hegedűs Zoltán[4], Erős Krisztián[1], Nagy István[3,5], Tretter László[6], ifj. Gallyas Ferenc[1,2,7], Sümegi Balázs[1,2,7]

[1]Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem
[2]Nukleáris-Mitokondriális Interakciók Kutatócsoport, MTA-PTE, Pécs
[3,4]Biokémiai[3] és Biofizikai[4] Intézet, MTA Biológiai Kutatóközpont, Szeged
[5]SeqOmics Biotechnológiai Kft., Mórahalom
[6]Orvosi Biokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
[7]Szentágothai János Kutató Központ, Pécsi Tudományegyetem, Pécs

CÉL: A tanulmány célja a ciklofilin D (CypD vagyis peptidil-prolil izomeráz F) függő mitokondriális permeabilitási tranzíció (mPT) szerepének megértése lipopoliszacharid (LPS) által indukált steril sokkban. RNS szekvenálási adatokból transzkriptom analízist végeztünk, hogy bizonyítsuk az mPT gyulladásos reprogramozásban betöltött szerepét, és azonosíthassunk új célpontokat a steril sokk terápiájában. A halálos áldozatokban kialakuló többszervi elégtelenséghez vezető úton a máj kitüntetett jelentőséggel bír, így analíziseinket vad típusú (WT; *Ppif*$^{+/+}$) és génkiütött (CypD KO; *Ppif*$^{-/-}$) egér (C57BL/6) májszöveteken végeztük.

EREDMÉNYEK: Vad típusú szövetekben az LPS jelentős különbségeket indukál 2866 gén expressziójában, 206 útvonalon (IPA analízis), beleértve a mitokondriális diszfunkcióhoz vezető, oxidatív foszforilációt és redoxfolyamatokat érintő változásokat. A CypD kiütése csökkenti a szövetek oxidatív károsodását, és csillapítja az LPS-indukálta változásokat kb. 1000 génben. Az antioxidáns TEMPOL a CypD KO szövetekben tapasztaltakhoz hasonlóan, részben csillapítja az LPS indukálta mitokondriális biogenezishez vezető génexpressziót mind a mitokondriálisan, mind a nukleárisan kódolt gének (köztük néhány transzkripciós faktor) esetében. A CypD hiánya és a magas koncentrációban adagolt TEMPOL egyaránt csökkentette az egerek LPS indukálta steril sokk okozta halálozási arányát, ami jelzi az oxidatív stressz csökkentésének fontosságát a betegség progressziójában.

KÖVETKEZTETÉSEK: LPS indukálta steril sokkban az CypD-függő mPT felerősíti a gyulladásos folyamatokat, elősegíti a betegség progresszióját oxidatív stresszel összefüggő mechanizmusok által. Viszont a CypD kiütése visszafordítja és/vagy csökkenti az LPS indukálta génkifejeződéseket és útvonalváltozásokat, végeredményben a betegség progresszióját. Ezek alapján a CypD hatékony célpont lehet a steril sokk terápiájában, és más oxidatív stresszhez kapcsolódó rendellenességekben is.

„Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-III-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült”

C57BL/6 – laboratóriumi egértörzs neve, CypD - ciklofilin D, IPA – Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen), KO – génkiütött, LPS – lipopoliszacharid, mPT – mitokondriális

permeabilitás tranzíció, *Ppif* – peptidil-prolil izomeráz F génje, TEMPOL – **4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl**, WT – vad típusú

31

APPA FUNKCIONÁLIS DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER (FRET) SEGÍTSÉGÉVEL

Kapronczai Róbert, Karádi Kristóf, Pécsi Ildikó, Grama László, Lukács András

Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biofizikai Intézet

Az AppA a legismertebb és legtöbbet vizsgált BLUFF domén fehérje, mely a Rhodobacter sphaeroidesbaktériumban betöltött funkcióját annak köszönheti, hogy kék fény hatására megváltozik. A fotoaktiváció egyik legfontosabb szereplője a 104-es triptofán, mely a legközelebb helyezkedik el a molekula FAD-ához. Röntgenkrisztallográfiás adatok alapján a triptofán fotoaktivációt követően pozíciót vált. Ennek pontos mikéntje azonban erősen vitatott. Munkánk célja ezen folyamat pontosabb feltérképezése. Korábbi e-téren folytatott kísérleteink során megállapítottuk, hogy a sikeres vizsgálatok érdekében ki kell küszöbölni a tirozinát zavaró jelét. Erre megoldásnak mutánsok alkalmazása, és a molekula pH környezetének szabályozása látszik megfelelőnek. Ezt célozzuk meg abszorpciós-emissziós mérésekkel bebiztosítani, hogy ezután a Triptofán mozgását elsősorban FRET méréssel alá tudjuk támasztani. Eredményeink szerint a triptofán világos állapotban kevesebb energiát képes a FAD-al közölni, tehát arra következtetünk, hogy messzebb került a FAD-tól, a molekulán kívülre. Ennek vizsgálatára pedig alacsonyabb pH-n érdemes a megfelelő mutánsokkal dolgozni a zajok szűrése érdekében.

Támogatás: EFOP-3.6.2-16-2017-00005

Rövidítések:
AppA = activation of photopigment and PUC A protein;
BLUF = Blue light sensing using
FAD; FAD = Flavin adenine dinukleotid
FRET = fluorescence resonance energy transfer

32

PP2A SZEREPE A SOX9/CREB TRNSZKRICIÓS FAKTOROK ÉS A RHAMM/CD44 INTERAKCIÓK SZABÁLYZÁSÁBAN HUMÁN MELANOMA SEJTVONALAKBAN

Katona Éva[1], Juhász Tamás[1], Hajdú Tibor[1], Nagy Georgina[2], Kókai Endre[3], Trencsényi György[4,5] Gergely Pál[3], Zákány Róza[1]

1 Debreceni Egyetem, ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
2 Debreceni Egyetem, ÁOK, Bőrgyógyászati Klinika
3 Debreceni Egyetem, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet
4 Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Képalkotó Intézet, Nukleáris Medicina Tanszék
5 Scanomed Kft. , Debrecen

A melanoma malignum cutis az epidermis pigmentsejtjeinek kontrollálatlan sejtosztódásából kialakuló rosszindulatú daganat. A daganatok kialakulásában szerepet játszik az extracelluláris mátrix alkotó hialuronsav (HA), melyet három hialuronsav szintáz fehérje, a HAS1, HAS2 és HAS3 termel, és egyúttal köt is a sejtekhez. További HA-receptorok a RHAMM és CD44, melyek ligandkötése nyomán a tumor sejtek szaporodását, és migrációját elősegítő szignál útvonalak aktiválódhatnak. Ismert, hogy a melanomaformációban sok esetben szerepet játszik a PP2A protein foszfatáz mutációja, mely a SOX9 és CREB fehérjéken keresztül részt vesz a melanogenezis szabályozásában. A PP2A funkcióját eltérő malignitású melanoma sejtvonalakon vizsgáltuk 20 nM végkoncentrációban alkalmazott okadainsavval (OA) történő farmakológiai gátlásán keresztül. A vizsgálatokhoz a nem metasztatizáló WM35, az agyi metasztázisból származó A2058 és annak- egérben erősen metsztatizáló- xenograftjából származó HT168 melanoma sejtvonalakat használtuk. Megállapítottuk, hogy az OA csökkentette a PP2A enzimaktivitást mindhárom sejtvonal sejtjeiben, megváltoztatta a sejtek morfológiáját, és csökkentette a proliferációt. A PP2A gátlás hatására a melanogenezisben jelentősségel bíró SOX9 és CREB fehérjék foszforilált formáinak mennyisége megemelkedett. A SOX9 és CREB transzkripciós faktorokat foszforiláló ERK1/2 és PKA vizsgálata során az ERK1/2 és a pERK1/2 mennyisége nőtt, míg a PKA fehérjeexpressziója csökkent OA hatására, valamint csökkent a PKA-SOX9- tengely downstream targetjének, az MITF-nek a fehérjeexpressziója is. A PP2A HA homeosztázisban betöltött szerepét vizsgálva megállapítottuk, hogy OA hatására eltérően változnak a különböző malignitású sejtek HAS és hialuronidáz fehérjeexpressziós mintázatai; ugyanakkor mindhárom sejtvonal sejtjeiben csökken a migrációs és inváziós képesség, fokozott RHAMM és CD44 fehérjeexpresszió mellett. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a PP2A szerepet játszik a melanoma sejtek proliferációjának és migrációjának szabályozásában, melyet *in vivo*, CB17 SCID egereken végzett PET/MRI kísérleteink is igazoltak: a subcutan injektált melanoma sejtekből létrejövő daganatok OA kezelés hatására csökkent radiotracer aktivitást mutattak a kezeletlen daganatokhoz képest.

Támogatás: OTKA CNK80709, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, GOP-1.1.1-11-2012-0197

PKA: protein kináz A, ERK1/2: extrecellular signal regulated kinase, RHAMM: Receptor for Hyaluronan Mediated Motility

33

MORFOLÓGIAI ÉS BIOKÉMIAI BIZONYÍTÉKOK A MESOTHEL SEJTEK PROFESSZIONÁLIS MAKROFÁGGÁ TÖRTÉNŐ DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRÓL GYULLADÁSOS FOLYAMATOK SORÁN

Sándor Katz, Viktória Zsiros, Anna L. Kiss

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy gyulladásos stimulusok hatására a mesothel sejtek makrofág markereket expresszálnak (ED1, OX43) jelezvén, hogy makrofágszerű sejtekké differenciálódnak. Tekintettel arra, hogy a makrofágok professzionális fagocita sejtek, és a TNF-α fő termelői, vizsgáltuk a mesothel sejtek fagocitotikus aktivitásának, és ezen citokin expressziójának változását a gyulladás során.

A fagocitotikus aktivitást *in vivo* rendszerben tus festék és fluorescens jelölt biopartikulum (pHrodo) intraperitoneális injektálása után vizsgáltuk a gyulladás különböző időpontjaiban. Hasonló vizsgálatokat végeztünk *in vitro*, GM-CSF kezelt primer túlélő hashártyatenyészeten. A szénszemcsék és a biopartikulumok fagocitózisát hagyományos elektronmikroszkópos és konfokál lézer mikroszkópos vizsgálatokkal követtük nyomon. A TNF-α expressziójának változását immuncitokémiai és Western blot módszerekkel vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy a TNF-α az early growth response (EGR1) transzkripciós faktor targetje, vizsgáltuk, hogy a mesothel sejtek expresszálják-e az EGR1-et. Az EGR1 expresszióját és nukleáris transzlokációját az ERK1/2 foszforilációja befolyásolja, ezért vizsgáltuk az ERK1/2 foszforilációs szintjének a változását is a rendszerünkben.

Eredményeink igazolják, hogy a gyulladásos stimulusok hatására a mesothel sejtek fagocitotikus aktivitása jelentősen megnő, TNF-α termelése fokozódik és EGR1 transzkripciós faktort expresszálnak.

Tekintettel arra, hogy ezen átalakulás során a mesothel sejtekben caveolin-1 expressziója is változik, úgy véljük, hogy a mesothel sejtek gyulladás során makrofágokká transzdifferenciálódnak, és ezt az átalakulást a caveolin-1/ERK1/2/EGR1 jelátviteli útvonal szabályozza.

Rövidítések: TNF-α: tumor nekrotikus faktor-α, GM-CSF: granulocita-makrofák colony stimuláló faktor, EGR1: early growth response 1, ERK1/2: extracelluláris szignál regulálta kináz

34

PORC-PROGENITORSEJTEK IONCSATORNA-EXPRESSZIÓJA ÉS MŰKÖDÉSE OSTEOARTHRITISBEN

Kothalawala William Jayasekara, Almássy János[2], Zákány Róza[1], Matta Csaba[1]

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, 1Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, 2Élettani Intézet

Az ízületi gyulladás (osteoarthritis) az ízületek valamennyi komponensét érintő degeneratív elváltozás, amely a tüneti kezelésen túl jelenleg nem gyógyítható. A betegség progresszív lefolyása során a porcmátrix összetétele jelentősen megváltozik, a proteoglikán-tartalom nagymértékben lecsökken, ami alapvetően befolyásolja a sejtek mikrokörnyezetének ionösszetételét. Hipotézisünk szerint ezzel párhuzamosan az ízületi porc sejtes elemeinek, a chondrocyták és chondroprogenitor sejtek membránproteinjeinek és ioncsatornáinak expressziója és működése is megváltozik. Jelen pillanatban ezen fehérjék szerepe az osteoarthritis patogenezisében kevéssé tisztázott. Munkánk során osteoarthritises porcból izolált progenitorsejteken található ioncsatornák működését tervezzük jobban megismerni. Affymetrix génchip platformon kapott előzetes eredményeink több ioncsatornát kódoló gén esetén mutattak eltérő expressziót csontvelői mezenchimális őssejtekhez (MSC) képest.

Jelen munkában a gépchip segítségével kapott előzetes eredményeket kívántuk megerősíteni. Az *in vitro* tenyésztett progenitorsejtekből történő RNS-izolálást követően RT-qPCR segítségével megvizsgáltuk egyes kiválasztott ioncsatorna-gének expresszióját. A reakciókat Sybr-green alapú assay-vel, abszolút kvantifikálással, a legstabilabban expresszálódó háztartási génre normálva számítottuk ki. A sejteket az eltérő expressziós mintázatot mutató ioncsatornák inhibitorai vagy aktivátorai jelenlétében tenyésztve megvizsgáltuk a sejtek proliferációjára és életképességére kifejtett hatásokat.

A nagy konduktanciájú Ca^{2+}-aktivált K^{+}-csatorna (BK_{Ca}) alfa és béta-alegységeinek expressziós mintázata eltérést mutatott a referencia-sejtpopulációként használt MSCkhez képest. A paxillin (inhibitor) vagy NS1619 (aktiváló szer) jelenlétében tenyésztett sejtek proliferációs mintázatában eltéréseket tapasztaltunk. A sejtek elektrofiziológia tulajdonságainak vizsgálata jelenleg folyamatban van a patch clamp módszer felhasználásával.

A BK_{Ca} ioncsatorna alegységeinek eltérõ expressziós mintázata, valamint a sejteknek a farmakonokra adott eltérő válasza alapján feltételezhetjük, hogy a progenitorsejtek elektrofiziológiai tulajdonságaiban is eltéréseket fogunk találni. Mivel számos gyógyszer ioncsatornák működésének modulálásán keresztül fejti ki hatását, ezért ezen progenitorsejt-populáció ioncsatorna-összetételének és működésének megértése új támadáspontú gyógyszerek kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

Támogatás: Az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának, és az MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíjának támogatásával készült.

35

AZ OLAPARIB (PARP INHIBÍTOR) VÉD AZ OXIDATÍV STRESSZ INDUKÁLTA EPITHEL BARRIER DISZFUNKCIÓ ELLEN ÉS GÁTOLJA A GYULLADÁSOS MAKROFÁGAKTIVÁCIÓT

Kovács Dominika, Vámos Eszter, Sümegi Balázs, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs

Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Bevezetés: A gyulladásos bélbetegségek (IBD; Crohn-betegség, colitis ulcerosa) patológiájábangenetikai-, immunológiai-, környezeti faktorok és az intesztinális mikrobiom egyaránt fontos szerepet játszanak. Mindezek az immunrendszer aktiválásán és az epithel barrier károsításán keresztül érik el hatásukat. Az epithel határréteg destrukciója a bél permeabilitásának fokozódásához, a patogének mucosalis immunsejtekkel való interakciójához, ezáltal kontrollálatlan gyulladáshoz, szövetkárosodáshoz vezet. A gyulladásos mechanizmus kialakulásában kulcsfontosságú faktor az oxidatív stressz, melynek hatására a PARP enzim túlzott aktivációja további gyulladásos folyamatokat indukál és nekrotikus sejthalált eredményez. Munkánk célja a már III-as klinikai fázisban lévő PARP gátló, az olaparib IBD-ben betöltött szerepének tisztázása. Jelen kutatásunk során az olaparib epithel barrierre, illetve gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatását vizsgáltuk in vitro.Módszerek: A H2O2 indukálta ROS termelését dihidrorodamin 123 fluoreszcens festékkel, a sejtek túlélést MTT teszttel Caco-2 humán colon epithel sejteken vizsgáltuk. A mitokondriális funkciókárosodásának mértékét a sejtek oxigénfogyasztásának és az extracelluláris pH-változásának mérésén keresztül Seahorse XFp Analyzer segítségével határoztuk meg. Az epithel barrier integritását egy ellenállás alapú, valós idejű xCelligence RTCA készülékkel monitoroztuk. A gyulladásos immunsejt aktiváció modellezésére LPS (1µg/ml) aktivált RAW Blue makrofág sejtek NFκB aktivációját, nitrit és ROS termelését mértük.

Eredmények: Kísérleteink során az olaparib (10µM) kezelés hatására jelentős mértékben csökkent aH2O2 indukálta ROS termelés, sejthalál, valamint a mitokondriális funkció károsodása. Az intesztinális barrier in vitro modellezésére alkalmazott eptihel monolayer oxidatív károsítása a barrier diszfunkcióját eredményezte, azonban az olaparib kezelés hatására az integritás megmaradt. Továbbá RAW Blue makrofágok LPS indukálta NFκB aktivációját, nitrit és ROS produkcióját is szignifikánsan csökkentette az olaparib kezelés.

Konklúzió: Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az olaparib egyfelől a makrofágok gyulladásos aktivációjának gátlásán, másfelől az epithel barrier funkció fenntartásán keresztül hathat,melyet minden bizonnyal a mitokondriális károsodás mérséklésével ér el. Jövőbeli terveink között szerepel az olaparib hatásának vizsgálata in vivo kísérletes colitisben, mellyel a későbbi humán IBD terápiás felhasználásának lehetőségét kívánjuk felvetni.

Rövidítések:
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
IBD: inflammatory bowel disease
ROS: reactive oxygen species
LPS: lipopolysaccharide
NFκB: nuclear factor kappa B

Támogatás: GINOP- 2.3.2-15- 2016-00049, GINOP-2.3.3-15-2016-00025

36

A REKREÁCIÓS MOZGÁS SZEREPE A KOGNITÍV KÉPESSÉGEK ÉS NEURODEGENERATÍV ELTÉRÉSEK JAVÍTÁSÁBAN AGING PATKÁNY MODELLEN

Kurucz Andrea[1], Bombicz Mariann[1], Varga Balázs[1], Priksz Dániel[1], Trencsényi György[2], Kertész István[2], Nagy Tamás[2], Pósa Anikó[3] Szilvássy Zoltán[1], Juhász Béla[1]

[1] Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, [2]Debreceni Egyetem, Nukleáris Medicina Intézet, [3]Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

A neurodegeneratív betegségek csoportjába tartozó Alzheimer-kór az időskori demencia leggyakoribb oka. Patomechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott, de ismeretes az agy predilekciós helyein (hippocampus, parietalis, temporalis és frontalis lebeny) felszaporodó kóros szerkezetű β-amyloid fehérje, az általa indukált idegrendszeri gyulladás, oxidatív stressz, valamint a következményes tau fehérje hiperfoszforiláció és aggregáció szerepe, mely folyamatok eredményeként nagymértékű neuronpusztulás következik be.

Régóta feltételezik, hogy a fizikai aktivitás csökkenti az Alzheimer-kór rizikóját, és előnyösen befolyásolja a betegség lefolyását. Kísérletünkben a rekreációs mozgás és az állatok kognitív képességének összefüggését vizsgáltuk.

A kísérletben résztvevő állatokat 3 fő csoportba osztottuk, mely csoportokon belül külön-külön vizsgáltuk a hímek és a nőstények eredményeit: 1. idős (18 hónapos) kontroll állatok (n=2x8), 2. idős (18 hónapos), futó állatok (n=2x8), 3. fiatal (3 hónapos) kontroll állatok (n=2x8). A kísérletben az önkéntes fizikai aktivitás az állatok ketrecébe beállított, standardizált futókerék segítségével, napi több km futást jelentett 3 hónapon keresztül. A kísérlet során a kognitív funkciókat Morris water maze (MWM) teszttel, az agyszövet patológiás elváltozásait Pozitron Emissziós Tomográfiával (PET), valamint szövettani (H&E, Congo vörös) és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk. Az oxidatív stressz elleni védekezést a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim aktivitásmérése alapján állapítottuk meg.

A MWM tesztben a plató megtalálása az idős futó állatok esetében szignifikánsan kevesebb időt vett igénybe az idős kontroll állatokhoz viszonyítva. A PET-tel és szövettani vizsgálatokkal kimutatható strukturális elváltozások mértéke szintén szignifikánsan csökkent, míg a HO-1 aktivitása a hippocampus és frontalis lebeny területén szignifikánsan emelkedett a futás hatására.

A fizikai aktivitást végző idős állatok kognitív funkciói, valamint a neurodegenerációs eltérések jelentősen javultak az idős, ülő életmódot folytató patkányok értékeihez képest.

Támogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-00062, UNKP-17-4, UNKP-17-3

37

GLÜKÓZ-6-FOSZFATÁZ-B ENZIMKINETIKAI JELLEMZŐINEK VIZSGÁLATA

Dr. Lédeczi Zsigmond, Dr. Pittner Rebeka, Dr. Bőgel Gábor, Dr. Kardon Tamás

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

A glükóz-6-foszfatáz-β (G6PC3) az endoplazmás retikulum membránjában elhelyezkedő foszfohidroláz aktivitással rendelkező enzim. Glükóz-6-foszfátot (G6P) hidrolizálja intraluminálisan glükózra és foszfátra. A májra specifikus, és a glukoneogenezisben kulcsszerepet játszó glükóz-6-foszfatáz-α-tól (G6PC1) katalitikus alegységében és expressziós mintázatában különbözik, szekvenciájuk 36%-ban azonos. A foszfatáz aktivitással rendelkező fehérjét a 17. kromoszómán elhelyezkedő G6PC3 gén kódolja, megjelenése ubikviter, minden sejtben expresszálódik. A génben fellépő mutációk pontosan nem ismert mechanizmussal súlyos kongenitális neutropéniát (SCN4) és egyéb fejlődési rendellenességeket okoznak. A G6PC1 mutációja által okozott Von-Gierke kórban a neutropénia szintén jellegzetes tünet, ezzel ellentétben SCN4-ben metabolikus elváltozások nem jellemzőek, viszont fejlődési rendellenességek társulnak a neutropéniához. Az enzim két izoformájáról kimutatták, hogy a G6P-ot megegyező affinitással képesek kötni. A G6PC3, ahogy azt a G6PC1 esetében is leírták, más szubsztrátkat is hidrolizálhat. Az ilyen jellegű irodalmi adatok egyelőre ellentmondóak. Amennyiben sikerül olyan szubsztrátot találni, amely esetleg fiziológiásan is szubsztrátja lehet a G6PC3-nak, úgy az enzim funkciójára is lehet belőle következtetni. Ennek alapján feltételezzük, hogy nemcsak a glukóz-6-foszfát intramikroszomális anyagcseréje befolyásolja a leukociták funkcióját, hanem esetleg más fiziológiás szubsztrátok metabolizmusa is. Ezek a metabolikus utak akár apoptotikus utakat is beindíthatnak.

Munkacsoportunk az enzim kinetikai jellemzőinek meghatározását, valamint a különböző szubsztrátok esetleges fiziológiai szerepének vizsgálatát tűzte ki céljául.

Az enzim jellemzéséhez HEK sejteket transzfektálva túltermeltettük a GFP taggel kapcsolt G6PC3 enzimet. Az enzimaktivitásokat különböző szubsztrátok használatával a keletkező foszfát koncentrációja alapján foszfomolibdenát módszerrel mértük meg. Az enzimkinetikai paraméterek meghatározásához nem lineáris görbeillesztést alkalmaztunk. A szubsztrátokkal illetve a defoszforilált termékekkel fényszóráson alapuló transzmembrán transzportmérést végeztünk patkánymáj mikroszóma minták felhasználásával.

Az általunk vizsgált terminális cukorfoszfát szubsztrátok közül a 6-foszfo-glukonát (6PG) a ribóz-5-foszfát (R5P) fruktóz-6-foszfát (F6P), eritróz-4-foszfát (E4P) és a szorbitol-6-foszfát (S6P) esetében tapasztaltunk megnövekedett foszfatáz aktivitást a kontroll mintákhoz képest.

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

38

A LIZOFOSZFATIDSAV KÖTŐDÉSE A HUMÁN NCK1 FEHÉRJE SH2 DOMÉNJÉHEZ GÁTOLJA ADOMÉN ÉS FOSZFOTIROZIN CÉLPEPTIDJE KÖLCSÖNHATÁSÁT

Koprivanacz Kitti[1], Besztercei Balázs[1,2], Mihály Judith[3], Tőke Orsolya[4], Merő Balázs[1],Buday László [1,5], Liliom Károly [1,6]

1 MTA TTK Enzimológiai Intézet
2 Semmelweis Egyetem, Kísérletes Élettani Intézet
3 MTA TTK Anyag és Környezetkémiai Intézet
4 MTA TTK Szerves Kémiai Intézet
5 Semmelweis Egyetem, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet
6 Semmelweis Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

A lizofoszfatidsav (LPA) a természetben előforduló legegyszerűbb szerkezetű foszfolipid, a lipid metabolizmusban az összetettebb foszfolipidek felépítésének prekurzora. Az elmúlt közel három évtizedbenvilágossá vált, hogy fiziológiás összetevője a vérnek és más testfolyadékoknak, emelkedett koncentrációja indikatív emlő, prosztata és egyéb daganatok jelenlétére és korrelál azok áttétképző hajlamával. Antiapoptotikus faktornak tekinthető jelátvivő, mert aktiválja a sejtek túlélési folyamatait. A rákos sejtek LPA-t termelő enzimet választanak ki, amely autokrin/parakrin módon fokozza migrációjukat. Oxidatív stressz körülmények között az LPA acillánc-összetétele megváltozik, miáltal gyulladási faktorként viselkedik, pozitív visszacsatolási folyamatokon keresztül elősegítve saját maga és egyéb gyulladásfokozó citokinek termelődését. Ezeket a hatásokat LPA-ra szelektív hat G-fehérjékhez kapcsolódó receptor közvetíti.Ezenkívül az LPA képes a PPARγ transzkripciós faktort aktiválva neointíma képződést indukálni. Ismert, hogy sejtfelszíni receptorok fiziológiás vagy patológiás működésének hatására LPA keletkezik a sejtmembrán belső, intracelluláris rétegében membrán-görbületi stresszt és lokális negatív töltéstöbbletet létrehozva. Az időlegesen így felgyülemlő LPA új kötőfelületet alakít ki, amelyhez szelektíven kapcsolódhatnak a jelátviteli folyamatokban szereplő fehérjék egyes doménjei. Ezek a dinamikus kötőhelyek módosíthatják a fiziológiás vagy patológiás fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Az SH2 domének szekvenciaspecifikusan felismerik a foszforilált tirozin oldalláncokat, amelyekhez kötődve jelátviteli folyamatokat indítanak be. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az Nck1 adaptorfehérje SH2 doménjének kötődését LPA-t tartalmazó liposzómákhoz, illetve a görbült felületet mimikáló micellákhoz fluoreszcencia spektroszkópia, ITC, MST, FTIR és NMR technikákkal. Jellemeztük a kötődés szelektivitását szerkezetileg és funkcionálisan rokon lipidekkel összehasonlítva, valamint az LPA-kötés affinitását és sztöchiometriáját. Megmutattuk, hogy az LPA micellák jelenlétében az SH2 domén nem képes az ismert foszforilált célpeptidjéhez kötődni. Eredményeink alátámasztják, hogy az intracelluláris membránfélben keletkező LPA a fehérjedoménekhez kötődve módosíthatja a jelátviteli folyamatok dinamikáját.

Rövidítések:FTIR - Fourier-Transform Infrared SpectroscopyITC - Isothermal Titration CalorimetryLPA- Lysophosphatidic acid (Lizofoszfatidsav)MST - Microscale ThermoforesisNck1 - Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1NMR - Nuclear Magnetic ResonancePPAR - Peroxisome Proliferator-Activated ReceptorSH2 - Src Homology 2

39

A FOTOSZINTETIKUS PIGMENT–FEHÉRJE KOMPLEXEK STABILITÁSÁNAK JAVÍTÁSA REKONSTITUÁLT MEMBRÁNMODELLEKBEN

LINGVAY Mónika[1,2], AKHTAR Parveen[2], ZSIROS Ottó[2] GARAB Győző[2], LAMBREV Petar[2]

[1]Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Fizika Doktori Iskola,

[2]MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet

A fotoszintetikus apparátus egyik kulcsfontosságú jellemzője a fénykárosodással szembeni ellenállóképessége és aktív védelme, illetve a fénykárosodás kijavításának képessége. Ezek a funkciók a teljes fotoszintetikus apparátus összehangolt működését feltételezik.

A korábbi munkánkban, különböző optikai spektroszkópiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az általunk előállított mesterséges membránok (proteoliposzómák) alkalmazhatók modellként a komplex fotoszintézisfolyamatok tanulmányozásában és utánozásában, de ezeknek viszonylagos instabilitása bőven teret ad a további fejlesztéseknek.

Jelen kutatásunk tárgya a magasabb rendű növényeknek a fényenergia begyűjtésében és átalakításában részt vevő PPC-knek (pl. az ún. LHCII) mesterséges lipid membránokkal való kölcsönhatásainak tanulmányozása ill. a felépített membránmodellek stabilitásának javításának lehetősége. Célunk olyan modell membránok létrehozása – izolált fotoszintetikus fehérjékből és lipidekből –, amelyek a természetes fotoszintetikus apparátus egyes részeit utánozzák, és hő és fénnyel szembeni stabilitásuk megközelíti a natív tilakoidmembránokét.

Az LHCII-t tartalmazó mesterséges membránok fénykárosodásra való hajlamát izolált komplexekkel összehasonlítva vizsgáltuk. A minták pigmenttartalmának sugárzási dózistól és időtől függő változásait abszorpciós és polarizációs (CD) spektroszkópiával elemeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a lipid-környezetben az LHCII komplexek jobban ki vannak téve a fény káros hatásának, mint a detergensben szolubilizált komplexek. A fotokárosodás lehetséges mechanizmusaként, a malondialdehid–tiobarbitursav reaktivitási teszt segítségével kimutattuk, hogy ez legalább részben oxidatív stressz eredménye (membránlipidek fény-által indukált peroxidációja), amit különböző antioxidánsok (Na-aszkorbát, tokoferol, β-karotén stb.) fotoprotektív hatásának bizonyításával is alátámaszthatunk.

Rövidítések:

PPC fotoszintetikus pigment–fehérje komplex

LHCII II-es fénybegyűjtő komplex

CD cirkuláris dikroizmus

Köszönetnyilvánítás:

A kutatást az Nemzetgazdasági Minisztérium GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázatának és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-I kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

40

A TR100 RÁKELLENES SZER HATÁSA A MEMBRÁN NANOCSÖVEK KIALAKULÁSÁRA ÉS MORFOLÓGIÁJÁRA

Hencz Alexandra Júlia[1], Somogyi Pál[2], Madarász Tamás[1], Nyitrai Miklós[1,3], Matkó János[4], Bugyi Beáta[1,3], Peter Gunning[5], Szabó-Meleg Edina[1,3]
[1]Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet, Pécs, Magyarország
[2]Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biotechnológia, Pécs, Magyarország
[3]Pécsi Tudományegyetem, Szentágothai Kutatóközpont, Pécs, Magyarország
[4]Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Immunológiai Tanszék, Budapest, Magyarország
[5]UNSW, School of Medical Sciences, Sydney, Australia

A sejtek közötti kommunikáció többféle módon valósulhat meg, ezek során sejtek bizonyos jeleket küldhetnek/fogadhatnak. Ennek az intercelluláris kommunikációnak egyik formája a membrán nanocsöveken keresztül megvalósuló közvetlen anyagtranszport. A membrán nanocsövek (orvos)biológiai jelentőségét már sokrétűen bizonyították. Nemcsak lipidek, ionok, sejtorganellumok, vezikulumok továbbítására képesek, de baktériumok, vírusok, prionok sejtek közötti terjesztésében is szerepük van. Elősegíthetik továbbá a tumor sejtek metasztázisát, migrációját, és növelhetik a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciát. A rosszindulatú sejtek között ily módon létrejövő kommunikáció gátlására, ezáltal osztódásuknak és terjedésüknek a megakadályozására potenciális megoldást jelenthetnek az anti-tropomiozinok (ATM-k). Az ATM-k a malignus sejtek aktin citoszkeletonját szabályozó, a normál körülményekhez képest fokozottabban expresszálódó tropomiozin izoformákra fejtik ki hatásukat. Az anti-tropomiozinok közé sorolható a TR100 nevezetű kis molekula, amely az aktin filamentumokhoz asszociált Tpm3.1-hez kötődik és a tropomiozin stabilizáló hatását zavarja meg.

Munkánk során a TR100 membrán nanocsövek kialakulási folyamatára és morfológiájára gyakorolt hatását vizsgáltuk *in vitro* sejtkultúrás rendszerekben. Kísérleteinkben érett egér B-limfocita (A20) sejteket használtunk. A tumorsejtek osztódásához és migrációjához elengedhetetlenek a citoszkeletális rendszer fehérjéi, különösen az aktin filamentális hálózat. A membrán nanocsövek filamentális aktin alapú struktúrák. A TR100 sejtek és nanocsövek aktin citoszkeletonjára gyakorolt hatását fluoreszcens phalloidin jelöléssel tettük láthatóvá és nagyfelbontású strukturált megvilágítású (SIM) mikroszkópiával vizualizáltuk a változást.

A TR100 kezelés hatására a membrán nanocsövek morfológiája megváltozott, rövidültek és vékonyodtak, továbbá a kialakult csövek száma jelentősen csökkent.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az aktin citoszkeletont közvetett módon megcélzó molekulák potenciálisan alkalmasak lehetnek a rákos sejtek közötti közvetlen és gyors információcsere gátlására.

Kulcsszavak: membrán nanocső, aktin citoszkeleton, TR100

ATM: anti-tropomiozin
Tpm3.1: tropomiozin 3.1
SIM: strukturált megvilágítású mikroszkóp

41

A DANTROLEN HATÁSMECHANIZMUSÁNAK NYOMÁBAN

Magyar Zsuzsanna Édua, Diszházi Gyula, Almássy János
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

A rianodin receptor (RyR) az izom szarkoplazmatikus retikulum (SR) membránjában található ioncsatorna, mely fiziológiás körülmények között idegi ingerület hatására megnyílik és Ca^{2+}-t szabadít fel az SR-ből, ami kiváltja az izom összehúzódását. Malignus hyperthermia-roham során azonban az arra genetikai okok miatt érzékeny RyR illékony altatószerek hatására ingerület hiányában is megnyílik és kontraktúrát okoz, ami a Ca^{2+}-felszabadulás dantrolénnel való gátlása nélkül halálhoz vezet. Bár a dantrolen kötőhelyet a RyR-ban már azonosították, a szer pontos hatásmechanizmusa ismeretlen. Ennek oka az az ellentmondás, hogy a dantrolén gátolja az SR vezikulákból történő Ca^{2+}-felszabadulást, de SR-ből tisztított csatornákon történő árammérésekben (single-channel árammérések) hatástalan. Ez arra utal, hogy a RyR a tisztítási folyamat során elveszti a dantrolen gátló hatásához nélkülözhetetlen mikrokörnyezetét.

Permeabilizált izomrostokon nemrég kimutatták, hogy a dantrolen-hatáshoz szükséges faktor a Mg^{2+}.

Munkám során annak kívántam utánajárni, hogy single-channel árammérésekben valóban a Mg^{2+}-e a dantrolen gátló hatásához szükséges hiányzó faktor. Ennek érdekében nyúl vázizomból származó tisztított RyR-okat építettünk sík lipid kettős rétegbe és a dantrolen hatását Mg^{2+} jelenlétében teszteltük. Eredményeink szerint a dantrolen 37±7%-kal csökkentette a csatornák nyitvatartási valószínűségét.

Ezután a dantrolen SR vezikulákból történő Ca^{2+}-felszabadulásra gyakorolt hatását vizsgáltuk optikai módszerekkel. Kimutattuk, hogy a dantrolen általi gátláshoz Mg^{2+} mellett ATP is szükséges, valamint, hogy a Mg^{2+} potencírozza a dantrolen gátló hatását.

Eredményeink arra utalnak, hogy a RyR csak egy specifikus, (Mg^{2+} és ATP által) allosztérikusan módosított állapotában képes kötni a dantrolent.

42

C-VITAMIN KOMPARTMENTÁCIÓ ÉS EPIGENETIKA A KANYARGÓS ARTÉRIA SZINDRÓMA PATOMECHANIZMUSÁBAN

Margittai Éva[1], Németh Csilla Emese[2], Nemoda Zsófia[2], Lőw Péter[3], Bánhegyi Gábor[2]

[1]Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató Intézet

[2]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

[3]ELTE TTK, Anatómiai, Sejt és Fejlődésbiológiai Tanszék

A C-vitamin az egyik legismertebb vízoldékony antioxidáns, mely a szabadgyökök semlegesítésén kívül enzim-kofaktorként is működhet. A sejt számos kompartimentumában megtalálható Fe^{2+}/2-oxoglutarát függő dioxigenáz enzimek aktivitásához C-vitamin szükséges, mely a katalízis során eloxidálódott vas visszaredukálásában játszik szerepet. Ilyen C-vitamin dependens dioxigenázok találhatóak a sejtmagban is, ahol a hiszton és DNS demetiláció révén az epigenetikai módosításokban vesznek részt.

Korábbi munkánk során leírtuk, hogy kanyargós artéria szindrómában – mely egy öröklődő kötőszöveti megbetegedés – a C-vitamin oxidált formájának transzportja zavart szenved a GLUT10 transzporter génjének mutációja révén. Mivel a transzporter a magmembránban található, feltételeztük, hogy kanyargós artéria szindrómában a sejtmagi C-vitamin szint alacsonyabb lesz, melynek következtében a sejtmagban elhelyezkedő, epigenetikai módosításokban résztvevő enzimek aktivitása csökkenhet. Vizsgáltuk ezért mind a sejtmagi C-vitamin szintet, mind az 5-metilcitozin, és a demetiláció első lépéseként kialakuló 5-hidroximetilcitozin szintjét C-vitamin hozzáadásával, ill. C-vitamin szupplementáció nélkül kanyargós artéria szindrómás páciensek fibroblasztjaiban.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a kanyargós artéria szindrómás páciensekből izolált sejtekben a C-vitamin szint szignifikánsan lecsökkent a sejtmagban. A páciensekből izolált fibroblasztokban az 5-hidroximetilcitozin csökkent szintje volt észlelhető, mely defektív demetilációra utal. A demetiláció C-vitamin hozzáadásával sem volt fokozható, valószínűleg a C-vitamin transzporter magmembránba lokalizálódó hiánya miatt. A metilációs profilt nem csak a teljes DNS szintjén, hanem különböző kandidáns génekre vonatkozóan is megvizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a PPAR-γ metilációját a C-vitamin hozzáadása kizárólag a kontroll fibroblasztokban csökkentette, a páciensekből izolált fibroblasztokban a C-vitamin hatástalan volt – szintén valószínűleg a kanyargós artéria szindrómás páciensekből hiányzó transzporter miatt.

Eredményeink kanyargós artéria szindrómás páciensekben megváltozott DNS-metilációs profilt mutattak mind a teljes DNS szintjén, mind specifikus gének egyes régióira vonatkozóan. Ezen eredmények a C-vitamin epigenetikai szerepére utalhatnak a kanyargós artéria szindróma patogenezisében. Vizsgálataink az elsők, melyek a C-vitamin transzport szerepét igazolják az epigenetikai módosítások kialakításában, és felvetik a lehetőségét annak, hogy a kanyargós artéria szindróma akár kompartimentációs betegségként is értelmezhető lehet.

43

LIPIDEK ANATÓMIÁJA: MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOK TÉRBEN ÉS IDŐBEN

Márk László, Schmidt János, Szabó Éva

PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A mátrix-segített lézer deszorpciós ionizációra (MALDI) épülő képalkotási tömegspektrometria lehetővé teszi komplex biológiai strukturák jelölésmentes képalkotását. Segítségével közvetlenül a szövetmetszetekrõl származó lipidek, peptidek és proteinek térbeli eloszlását lehet viszonylag nagy térbeli felbontással (ca. 20 mikrométer) vizsgálni.

Munkánk során a különbözõ fejlődési fázisban lévõ egérembriók lipid és protein összetételének változásait vizsgáltuk annak érdekében, hogy jobban megérthessük az implantáció és a korai embrionális fejlõdés során bekövetkező molekuláris változásokat. Vizsgálataink során számos LPA2 és COX2 által szabályzott lipid összetételében mutattunk ki szignifikáns különbséget a mintacsoportok között. A legjelentõsebb eltérések a foszfolipidek lokális eloszlásában tapasztaltuk, ahol a PC-k, PI-k, PE-k illetve egyes endocannabinoidok térbeli és idõbeni változásai az embriógenezis során kiválóan követte az embrió és az endometrium interakciójának folyamatát. Eredményeink hozzájárulnak a korai embrionális fejlõdés jobb megismeréséhez és a kifejlesztett metodika új lehetőségek teremt meg a jelölésmentes képelkotási kutatások számára.

44

AZ NRF2 ÉS A SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÓELEMEINEK KAPCSOLATA OXIDATÍV STRESSZ SORÁN

Márton Margita[1], Tihanyi Nikolett[1], Bánhegyi Gábor[1], Kapuy Orsolya[1]

[1]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

Oxidatív stressz során a sejten belüli reaktív oxigénvegyületek (ROS) felhalmozódása túlsúlyba kerül az antioxidáns vegyületekkel szemben. Ez a folyamat felboríthatja a celluláris homeosztázist, károsítva a sejtet, és bekapcsolhatja a sejthalál folyamatokat is. Amennyiben oxidatív vegyületekkel (mint például H_2O_2-dal, tBHP-dal) kezelünk sejteket, aktiválódnak a központi celluláris stressz-válasz folyamatok, miközben a sejt osztódási ciklusa gátlódik. Az NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) fehérje számos citoprotektív gén transzkripciós szabályozásával kulcsfontosságú a redox egyensúly fenntartásában. Egyelőre az NRF2 sejtciklust szabályozó hatásának a részletei még nem ismertek. A sejtciklus egy olyan pontosan meghatározott folyamat, amelyet a ciklin függő kináz/ciklin komplexek hajtanak, és az ellenőrzőpontokban lévő molekulák állítanak le stressz esetén. A ciklin fehérjék közül a D-típusú ciklinek reagálnak legérzékenyebb módon oxidatív stresszre.

Kutatásom célja megvizsgálni, vajon a PERK által aktivált NRF2 befolyásolja-e a Ciklin D1 fehérje szintjét oxidatív stressz esetén.

Bizonyított, hogy a Ciklin D1-et oxidatív stressz esetén legátolja a PERK útvonal, mely a sejtciklus leállásához vezet. Feltételezésünk szerint a PERK kináz az NRF2 indukálásával gátolja le a ciklin molekulát különböző módokon. Szeretnénk megvizsgálni azt, hogy az NRF2 és Ciklin D1 molekulák közötti kapcsolat direkt és/vagy indirekt útvonalon keresztül valósul-e meg. Lehetségesnek tartjuk, hogy az NRF2 és Ciklin D1 fehérjék közötti indirekt kapcsolatot a ciklin függő kináz inhibitorok (mint például p15, p21 és p27) hozzák létre.

Ez a kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-I-SE-30 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság programjának támogatásával készült.

Kulcsszavak: oxidatív stressz, NRF2, sejtciklus, Ciklin D1

Rövidítések: ROS: Reakív Oxigénvegyületek; H_2O_2: hidrogén-peroxid; tBHP: tercbutil-hidroperoxid; NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

45

A Γ-AMINOVAJSAV METABOLIZMUSA IZOLÁLT MITOKONDRIUMOKBAN ÉS KÖZPONTI IDEGRENDSZERI TUMORSEJTEKBEN

Mászi Anikó, Horváth Gergő, Sváb Gergely, Tretter László

Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet

A γ-aminovajsav (GABA) a központi idegrendszer legfõbb gátló neurotranszmittere. A GABA-shuntön keresztül metabolizálódik, többnyire gliasejtekben. Metabolizmusa során szukcinát-szemialdehid keletkezik, majd szukcináttá történõ oxidációja után lép be a citrát körbe.
Az irodalomban legtöbbször gátló neurotranszmitterként találkozhatunk a GABA-val. Folytattak kutatásokat mitokondriális metabolizmusban betöltött szerepérõl, azonban ez mostanáig csak kevéssé ismert. Kutatócsoportunk a GABA metabolizmusra kifejtett hatását vizsgálta agyi mitokondriumokban, mikrogliában, és központi idegrendszeri tumorsejtekben. Kísérleteinkhez a mitokondriumokat tengerimalac agykéregbõl izoláltuk, ezt követõen Clark elektróddal vizsgáltuk az oxigénfogyasztást. A sejtes vizsgálatokhoz BV-2 mikroglia, illetve U251 glioblasztoma sejteket használtunk. Ezen sejtek esetében Seahorse mûszerrel követtük nyomon az oxigénfogyasztást, valamint az extracelluláris médium pH változását, amelybõl a glikolízisre és az oxidatív dekarboxilezésre következtethetünk.
A GABA-t egyedüli szubsztrátként alkalmazva a mitokondriális oxigénfogyasztás kismértékû volt. Kombinációban az α-ketoglutaráttal nagymértékû, szukcináttal kismértékû fokozódást tapasztaltunk az oxidációban.
A BV-2 mikroglia sejtek GABA metabolizmusát arteficiális cerebrospinális folyadékban vizsgáltuk. A GABA önmagában jól oxidálódott és több más ismert központi idegrendszeri szubsztráttal (glukóz, piruvát, acetát) kombinálva tovább fokozta az oxidációt. Glutamin szubsztrát után adva a GABA-t, nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést. A GABA U251 glioblasztoma sejteken is jelentõsen fokozta az oxigénfogyasztást.
A GABA fontos szerepet tölt be a központi idegrendszer metabolizmusában. Eredményeink rámutattak, hogy a GABA metabolizmus a központi idegrendszeri tumor sejtekben intenzív és befolyásolása farmakológiai célpont lehet a daganatos betegségek kezelésében.

46

MOLEKULÁRIS ÓRAGÉNEK RITMIKUS EXPRESSZIÓJA IN VITRO PORCDIFFERENCIÁCIÓ SORÁN

Matta Csaba, M. Abdulhadi Alagha, Vágó Judit, Zákány Róza

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Az élőlények napi ritmusát (cirkadián ritmus) a hipotalamuszban megtalálható központi óra, valamint a testi sejtek (így a porcsejtek) molekuláris órái szabályozzák. A cirkadián óra molekuláris alapját evolúciósan konzervált óragének és -fehérjék ritmikus expressziója és aktivitása képezi, amelyek közül a legfontosabbak a transzkripciós aktivátorok (*Bmal1*) és a transzkripciós represszorok (*Per1/2*). A fenti faktorok közötti feedback több száz downstream gén kifejezõdésének szabályozása révén képes biztosítani a szövetek homeosztázisát. Egy friss közlemény nemrégiben bizonyította, hogy a molekuláris óra egyik kulcsfontosságú génjének (*Bmal1*) mesterséges kiütése egérben az ízületi gyulladáshoz (oszteoartritisz, OA) hasonló tüneteket indukál az ízületek szöveteiben.

A molekuláris óra működését és jelentőségét a porcfejlődés során eddig még nem vizsgálták. Ahhoz, hogy megértsük a porcsejtek belső cirkadián ritmusának szabályozását és azt, hogy az óra ritmicitásának felbomlása hogyan vezethet OA kialakulásához, először a molekuláris órának a porcszövet kialakulása során játszott szerepét kell feltérképezni.

Kísérleteinket csirkeembriók végtagtelepeiből előállított, spontán porcosodó micromass kultúrákon végeztük. A molekuláris órát szérumsokkal, illetve szérummegvonással szinkronizáltuk. A mintagyűjtési időpontok beállítását követően specifikus qPCR primerek segítségével vizsgáltuk az óragének expressziós mintázatát Sybr-green alapú assay-vel, relatív kvantifikáció módszerével.

Sikerült kimutatnunk, hogy a molekuláris óra a primer porcosodó sejtkultúrákban az in vitro porcdifferenciációnak már ebben a nagyon korai stádiumában is mûködik: a legfontosabb óragének (Bmal1/2, Per2/3, Cry1/2) oszcilláló expressziót mutatnak. Ez egy igen újszerû eredmény, ugyanis egyáltalán nem volt biztos, hogy az óragének az embrionális élet ilyen korai szakaszában is oszcilláló mintázat szerint expresszálódnak. A porc- és csontdifferenciáció irányításáért felelős „master” transzkripciós faktorok (Sox6, Sox9, Runx2) is cirkadián expressziót mutatnak, és hasonló mintázatot észleltünk a porcdifferenciáció kalcium-jelétvitele szempontjából fontos TRPV-receptorok esetén is.

Eredményeink a porcdifferenciáció szabályozásának jobb megismerésén keresztül hozzájárulhatnak az OA-pathogenesis molekuláris mechanizmusainak alaposabb feltérképezéséhez.

Készült az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának támogatásával.

47

HAPTOGLOBIN ALPHA-1 FEHÉRJE MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA MESTERSÉGESEN MEGTERMÉKENYÍTETT EMBRIÓK TÁPOLDATÁBAN

Montskó Gergely[1,2], Gödöny Krisztina[2,3], Várnagy Ákos[2,3], Bódis József[2,3], Kovács L. Gábor[2,3,4]

[1]Pécsi Tudományegyetem, Szentágothai János Kutatóközpont

[2]MTA-PTE Humán Reprodukciós Kutatócsoport

[3]Pécsi Tudományegyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

[4]Pécsi Tudományegyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

A humán infertilitás világszerte terjedő tendenciát mutató jelenség, mely évről évre egyre több párt érint. A problémából fakadóan fokozott igény mutatkozik a mesterséges megtermékenyítéses beavatkozások iránt, lehetőleg minél magasabb születési arányt szem előtt tartva. A metabolomikai vagy proteomikai megközelítésű, nem-invazív módszerek alternatívát kínálnak a hagyományos morfológiai szempontú embrió értékelés kiegészítésére. Kutatócsoportunk egy lehetséges biomarker, a humán haptoglobin alpha-1 láncának mennyiségi meghatározását végezte el mesterségesen megtermékenyített embriók tápoldatában.

Non-invazív retrospektív vizsgálataink során a beültetett embriók eldobásra kerülő tápfolyadék mintáit használtuk, az elemzéseket többlépcsős grádiens elúciós folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS) segítségével végeztük.

Összesen 207 tápoldat minta analízisét végeztük el, két csoportra osztva. A kontroll csoportba tartozó embriók életképességének becslése kizárólag a hagyományos, morfológiai értékelés segítségével történt meg. A vizsgálati csoportban ezen túl elvégeztük az életképesség vizsgálatát a haptoglobin alpha-1 fehérje mennyiségi meghatározása alapján is. A kizárólag morfológiai szempontból életképes embriók (n=104) a kontroll csoportban összesen 34 esetben vezettek sikeres klinikai terhességhez, a teherbeesés aránya 32.7% volt. A vizsgálati csoport esetében (n=103) a mind morfológiai, mind a haptoglobin alpha-1 fehérje mennyisége alapján életképes embriók (n=66) összesen 30 esetben vezettek sikeres klinikai terhességhez, a teherbeesés aránya 45.5% volt.

A megfigyelt növekedett teherbeesési ráta (32.7% vs. 45.5%) hátterében a két módszer kombinációjából adódó lehetőségek állnak. A haptoglobin alpha-1 fehérje mennyiségi meghatározása alapján lehetővé válik a morfológiai bélyegek alapján nem azonosítható, alacsony implantációs potenciállal rendelkező embriók szűrése.

Köszönetnyilvánítás:

Az eredmények az OTKA 115394 „Az embrió életképességének korai biokémiai indikátorai” a GINOP-2.3.2-15-2016-00021 „Chip technológia alkalmazása a humán in vitro fertilizáció eredményességének javításában” és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4-III Új Nemzeti Kiválóság Programja című pályázatok támogatásával valósultak meg.

48

A GLUT10 TRANSZPORTER ÉS A KANYARGÓS ARTÉRIA SZINDRÓMA

Németh Csilla[1], Margittai Éva[2], Marcolongo Paola[3], Benedetti Angiolo[3], Bánhegyi Gábor[1]

[1]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

[2]Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató Intézet

[3]Sienai Egyetem, Molekuláris Orvostudományok Intézet, Siena, Olaszország

A kanyargós artéria szindróma (arterial tortuosity syndrome, ATS, OMIM 208050) a kötőszövet egygénes öröklődő betegsége, melyet a nagyobb artériák megnyúlása és kacskaringós lefutása, az ízületek hipermobilitása és a bőr lazasága jellemez. Az ATS okaként a glukóz transzporter 10 (GLUT10) fehérjét kódoló *SLC2A10* gén mutációját tartják számon; az azonban, hogy a transzporter hiánya milyen módon vezet a betegség kialakulásához, nem ismert. Saját, korábbi eredményeinken alapuló hipotézisünk szerint a GLUT10 aszkorbinsavat (vagy annak oxidált formáját, dehidroaszkorbinsavat) transzportálhat az endoplazmás retikulum lumenébe. Az intraluminális prolil- és lizil-hidroxilázok kofaktora az aszkorbinsav, így hiányában a kollagén és elasztin képződése zavart szenvedhet, mely magyarázhatja a betegségben észlelt kötőszöveti tüneteket.

Munkánk célja a GLUT10 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata, illetve a GLUT10-függő aszkorbát/dehidroaszkorbát transzport kimutatása volt fibroblasztok endoplazmás retikulumában. Immunocitokémiai vizsgálataink a GLUT10 perinukleáris elhelyezkedését mutatták kontroll fibroblasztokban. A GLUT10 fehérje a fibroblasztok mikroszómális (endoplazmás retikulumot is tartalmazó) frakciójában volt kimutatható immunoblottal. Szelektíven plazmamembrán permeabilizált fibroblasztokban jelentős csökkenést észleltünk az ATS sejtek, illetve GLUT10 csendesített fibroblasztok dehidroaszkorbát felvételében, a GLUT10 re-expresszálásával ATS fibroblasztokban azonban helyre tudtuk állítani a dehidroaszkorbát transzportot. Az *in vitro* transzlációval előállított GLUT10 fehérje proteoliposzómában szintén hatékonyan facilitálta a dehidroaszkorbát felvételét. A fibroblasztok hosszantartó inkubálása aszkorbát jelenlétében kétszeres intracelluláris aszkorbát koncentrációt eredményezett a kontroll sejtekben az ATS sejtekhez képest. Eredményeink szerint tehát a GLUT10 az endoplazmás retikulumban és a magmembránban elhelyezkedő transzporter, mely facilitálja a dehidroaszkorbát felvételét az endoplazmás retikulum lumenébe és a nukleoplazmába; az aszkorbát hiány ezen kompartimentumok aszkorbát-függő enzimeinek csökkent működésén keresztül válthatja ki a patológiás hatásokat.

Rövidítések: glukóz transzporter 10, GLUT10 vagy SLC2A10

kanyargós artéria szindróma, ATS

49

EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK ANTIOXIDÁNS FOLYAMATOKBAN VALÓ SZEREPE

Németh Krisztina, Békés Márta, Pálóczi Krisztina, Buzás Edit, dr. Tamási Viola

Genetikai, Sejt- és Immunbiológia Intézet, Semmelweis Egyetem

Háttér: Ismert, hogy a sejtek EV-k segítségével képesek más sejtekbe antioxidáns hatású fehérjéket juttatni, azonban az, hogy antioxidáns vegyületek hogyan befolyásolják ezen EV-k redox kapacitását, még nem lett vizsgálva. Kísérleteinkhez az élelmiszertartósításra oly gyakran használt tBHQ-tválasztottuk és azt vizsgáltuk, hogy az említett vegyület hogyan befolyásolja a nyugvó és aktivált CD4+ T sejtek által szekretált EV-k antioxidáns kapacitását. Módszerek: CCRF-CEM sejteket 10µM tBHQ-val kezeltük, majd felülúszóból differenciál centrifugálással EV-ket izoláltunk. Az EV-k karakterizálása áramlási citometriával történt CD63, CD81, HSP70, annexinV markerekre nézve, továbbá qNANO technikával EV méreteloszlás változásthatároztunk meg. Az EV-k PRDX1, PRDX2, NQO1 és ALOX5 mRNS tartalmát Taqman módszerrel vizsgáltuk. Eredmények: Elmondhatjuk, hogy a tBHQ kezelés nem befolyásolta az EV-k PRDX1 mRNS tartalmát. PRDX2 mRNS tartalom sejtekben szignifikáns változást mutatott: nyugvó sejteknél csökkenést (0,4x), aktivált sejteknél növekedést (3x) tapasztaltunk. ALOX5 gént mRNS szinten EVkben nem sikerült detektálni. NQO1 esetében elmondható, hogy a tBHQ nyugvó sejtekben indukálja(3x), szekretált exoszómákban csökkenti (0,5x) az említett gén expresszióját. Aktivált CD4+ T sejtekben a tBHQ szintén indukálta a sejtekben lévő NQO1 expressziót és csökkentette az exoszómák NQO1 tartalmát, de ez nagyobb mértékű volt, mint a nyugvó sejtek esetén (sejt 13x; exoszóma: nem detektálható). Következtetések: Igazoltuk, hogy a tBHQ nem csak CD4+ T sejtek antioxidáns kapacitását befolyásolja, hanem a szekretált EV-két is. A vizsgált gének közül az NQO1-t kiemelve elmondhatjuk, hogy a tBHQ lehetséges protektív hatással bír a CD4+ T sejtekre nézve, azok redox stabilitását elősegíti, a génexpresszió fokozásával és/vagy exoszómákból történő mRNS visszatartásával.

EV extracelluláris vezikula

tBHQ terc-butil hidrokinon

CCRF-CEM human T cell lymphoblast-like cell line

PRDX1 peroxiredoxin 1

PRDX2 peroxiredoxin 2

NQO1 NAD(P)H-kinon dehidrogenáz 1

ALOX5 arachidonát-5-lipooxigenáz

CD cluster of differentiation

HSP70 heat schock protein 70

50

A KOMPLEMENT MASP-1 ENDOTÉLSEJTEKRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK TRANSZKRIPTOMIKAI VIZSGÁLATA

Németh Zsuzsanna[1], Schwaner Endre[1], Debreczeni Márta Lídia[1], Kajdácsi Erika[1], Doleschall Zoltán[2], Dobó József[3], Gál Péter[3], Cervenak László[1]

[1] Semmelweis Egyetem, III. Sz Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium, Budapest[2] Országos Onkológiai Intézet, Patogenetikai osztály, Budapest[3] Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpot, Enzimológiai Intézet, Budapest

A komplementrendszer a veleszületett immunitás szolúbilis alrendszere. A komplementrendszer lektin-útjának egyik kulcsenzime a mannózkötő lektin asszociált szerin proteáz 1 (MASP-1), mely képes az endotélsejtek aktiválására. Az endotélsejtek egyrétegű laphámot alkotnak az erek belső felszínén és számos élettani funkcióval rendelkeznek (ilyenek a gyulladás, érpermeabilitás, vérnyomás, angiogenezis, valalmint a koaguláció és fibrinolízis szabályozása). Korábbi fehérje szintű és funkcionális vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a MASP-1 megnöveli számos, a gyulladásban fontos szerepet játszó fehérje kifejeződését.

A humán köldökzsinór véna endotélsejteket (HUVEC) egészséges újszülöttekből származó köldökzsinórból preparáltuk és a konfluens állapot eléréséig tenyésztettük. A sejteket 2 órán keresztül kezeltük 0,6 μM MASP-1-el, majd a kezelés után RNS-t izoláltunk a G3 Human Gene Expression 8×60K v3 Microarray (Agilent Technologies) kivitelezéséhez. A microarray validálásra qPCR-t végeztünk 18 kiválasztott génen, melyekkel igazoltuk, hogy a micorarray mérés eredményei jól tükrözik a valós expresszió változást (Spearman-teszt: $r=0,834$ $p<0,0001$).

A KEGG, Reactome és a GO adatbázisainak, valamint kereskedelmi forgalomban kapható kitek génlistáinak segítségével összegyűjtöttük a legfontosabb endotélsejt-funkciókhoz (gyulladás, permeabilitás, koaguláció és fibrinolízis, angiogenezis valamint vérnyomásszabályozás) tartozó gének listáját. Ezek közül a gyulladási ($p=0,043$) és a permeabilitási ($p=0,015$) gének csoportjában szignifikánsan több olyan gént találtunk, melynek expresszióját a MASP-1 szignifikánsan változtatja, mint a teljes genomot tekintve. GSEA analízissel pedig az angiogenezis génjeinek csoportja mutatott jelentős változást, míg a MASP-1 a véralvadási rendszer és a vérnyomásszabályozás génjeinek kifejeződését nem befolyásolta jelentősen.

Az endotélsejtek számos szabályozási folyamatban játszanak fontos szerepet, ezek közül a MASP-1 kezelés hatására három csoport (gyulladás, permeabilitás és angiogenezis) génjeiben találtunk jelentős expresszió változást. A fokozott gyulladás és érpermeabilitás lehetővé teszi az immunsejtek és a védekezésben fontos fehérjék szövetközti térbe jutását, majd a károsodott érfal az angiogenezis során regenerálódhat. Mindez a gyulladás szabályozását tekintve egybevág korábbi ismereteinkkel, azonban a nagyáteresztőképességű transzkriptomikai vizsgálatok elsősorban egyfajta szűrővizsgálatot jelentenek, így a MASP-1 permeabilitásra és angiogenezsire gyakorlot hatásának részletesebb, fehérje-szintű vizsgálata szükséges, ezen vizsgálatok folyamatban vannak.

Rövidítések: MASP-1 – mannózkötő lektin asszociált szerint proteáz 1, HUVEC – humán köldökzsinór véna endotélsejt, KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO – Gene Ontology Consortium, GSEA – Gene Set Enrichment Analysis

51

A TRESK HÁTTÉR K^+ CSATORNA PKC ÁLTALI SZABÁLYOZÁSA

Pergel Enikő, Enyedi Péter, Czirják Gábor

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

A TRESK a két pórusdoménnal rendelkező K_{2P} csatornák családjába tartozik. Működése háttér K^+ áramot hoz létre, amely hozzájárul az érző neuronok nyugalmi membránpotenciáljának fenntartásához. A TRESK nagy mennyiségben fejeződik ki a hátsógyöki és trigeminális ganglionok érző neuronjaiban.

A csatorna szabályozásában fontos szerepe van a kalcium-függő kalcineurinnak, mely defoszforilálva a csatornát, többszörösére aktiválja annak működését. A kalcineurin hozzákötődve a csatornához annak több szerinjét is defoszforilálni tudja. A csatorna nyugalmi állapotba való visszatérését különböző kinázok segítik. A PKA az S252-t foszforilálja, míg az S262, S264 és S267 szerineket MARK kinázok foszforilálhatják. A közelmúltban leírták, hogy a humán TRESK csatorna PKC-t aktiváló PMA hatásra szintén aktiválódik.

A mutáns fehérjéket PCR alapú mutagenezissel hoztuk létre. A konstrukciókból ezt követően cRNS készült, mellyel Xenopus laevis oocytákat injektáltunk. A kifejeződő csatorna áramát két-elektródos voltage clamp módszerrel mértem.

Először tisztázni szerettük volna, hogy vajon a PKC hatása a kalcineurin közvetítésével jön-e létre. Eredményeink e lehetőséget kizárták: kalcium kelátor EGTA nem védte ki a PMA kezelés áramfokozó hatását. További kísérleteink azonban a korábbról ismert szabályozóhelyek szerepét bizonyították: olyan mutáns csatornák, melyekben a kalcineurin egyik célpontját a szerin 264-es aminosavat alaninra, ill. glutamátra cseréltük, nem aktiválódtak PMA kezelésre.

A csatornát foszforiláló MARK2 kinázról ismert, hogy a PKC foszforilálja, ezáltal gátolja a működését. Annak vizsgálatára, hogy a PKC csatornát aktiváló hatásának hátterében állhat-e a MARK PKC általi foszforilációja (u.i. a gátlás gátlása), olyan mutáns trunkált MARK2-t hoztunk létre, melyet a PKC nem tud foszforilálni. E konstrukciót koexpresszálva a TRESK csatornával a PMA elvesztette áramnövelő hatását.

A PKC hatását nPKC koexpressziójával is vizsgáltuk. Ez a PMA-hoz hasonlóan aktiválta a csatornát. Mutáns (tehát nPKC gátlásra érzéketlen) MARK2 koexpressziója azonban kivédte a PKC csatornát aktiváló hatását.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a PKC nem a kalcineurinon keresztül szabályozza a TRESK csatornát. A PKC-függő aktiváció lehetséges mechanizmusa az, hogy a PKC gátolja a TRESK-et foszforiláló egyik kinázt, a MARK-ot, így a csatorna nagyobb hányada kerül defoszforilált/aktív állapotba.

MARK: microtubule-affinity regulating kinase

nPKC: novel protein kinase C

PKA: protein kinase A

PKC: protein kinase C

PMA: phorbol 12-myristate-13-acetate

TRESK: TWIK-related spinal cord K^+ channel

52

A ZÖLD TEA POLIFENOL HATÁSA A SEJTADHÉZIÓS MÁTRIXRA ÉS A SEJTADHÉZIÓRA: VIZSGÁLATOK JELÖLÉSMENTES OPTIKAI BIOSZENZOROKKAL

Péter Beatrix[1], Farkas Enikő[1,2], Forgács Enikő[1], Saftics András[1,3], Kovács Boglárka[1,2], Kurunczi Sándor[1], Székács Inna[1], Csámpai Antal[4], Bősze Szilvia[5] és Horváth Róbert[1]

[1] MTA EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport
[2] Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola
[3] BME Oláh György Doktori Iskola (Kémia és Vegyészmérnöki tudományok)
[4] ELTE Kémiai Intézet
[5] MTA-ELTE Peptidkémiai Intézet

A zöld tea polifenol epigallokatekin-gallát (EGCg) pozitív hatásai már régóta ismertek [1]. A szakirodalomban a szerzők leggyakrabban jelöléses technikákat alkalmaztak, így a zöld tea polifenol vizsgálata jelölésmentes módszerekkel új perspektívákat nyithat meg.

Munkánk során optikai jelölésmentes bioszenzorokat (OWLS és RWG bioszenzor) alkalmaztunk a kivonat élő sejtekre (HeLa sejtvonal) és kopolimer bevonatokra gyakorolt hatásának vizsgálatára.

Az általunk kialakított multikomponens rendszernek köszönhetően a polimer bevonat készítése, kezelése kis molekulákkal (EGCg és oxidált EGCg), és e kezelt bevonatokra történő sejtadhézió vizsgálata ugyanazon bioszenzor felületen valósulhatott meg, több párhuzamos méréssel, valós időben, így reprezentatív kinetikai adatokat kaptunk a végbemenő folyamatokról.

Eredményként egy új modellt állítottunk fel az EGCg és a sejtadhéziós mátrix kölcsönhatásának leírására [2].

Ezen eredmények az EGCg indirekt, közvetett hatásait mutatják be, azonban a későbbiekben szándékunkban áll a polifenol direkt hatásait is megvizsgálni jelölésmentes módszerekkel, és fényt deríteni arra, hogyan hat a kezelés a sejtadhézióra a bevonatokkal történő közvetett interakciók nélkül.

Irodalom

[1] B. Peter, Sz. Bosze, R. Horvath. Biophysical carachteristics of proteins and living cells exposed to the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCg): review of recent advances from molecular mechanisms to nanomedicine and clinical trials. *European biophysics Journal*, 46 (1) 1-24. 2017

[2] B. Peter, E. Farkas, E. Forgacs, A. Saftics, B. Kovacs, S. Kurunczi, I. Szekacs, A. Csampai, Sz. Bosze, R. Horvath. Green tea polyphenol tailors cell adhesivity of RGD displaying surfaces: multicomponent models monitored optically. *Scientific Reports*, 7:42220, 2017.

Rövidítések

EGCg: epigallokatekin-gallát
OWLS: optical waveguide lightmode spectroscopy (optikai hullámvezető módus spektroszkópia)
RWG: resonant waveguide grating (rezonáns hullámvezető rács)

53

mTOR ÉS METABOLIKUS GÁTLÓSZEREK HATÁSA HUMÁN GLIOMA SEJTEKRE IN VITRO

Petővári Gábor, Hujber Z1, Dankó T1, Krencz I1, Tóth F1, Horváth Gergõ 2, Tretter László 2, Sebestyén A1

1 Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 2 Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest

A gliomák a központi idegrendszer rossz prognózisú, malignus tumorai. A metabolikus változások, adaptációk szerepe a daganatképzésben és progresszióban már jól ismert. Az mTOR útvonal aktivitása számos daganattípusban és az agresszív gliomákban is ismert. A PI3K / mTOR inhibitorok alkalmazására már zajlanak klinikai vizsgálatok, egyelõre kevés sikerrel.

Munkánk során humán glioma sejtvonalak mTOR aktivitását, metabolikus tulajdonságait és mTOR inhibitor érzékenységét vizsgáltuk in vitro. A metabolikus tulajdonságok alapján további metabolikus és mTOR inhibitorok kombinációját alkalmaztuk.

Az mTOR és egyéb metabolikus útvonal aktivitással összefüggő fehérjék expresszióját, az intracelluláris metabolit koncentráción alapuló metabolikus profilokat és az mTORC1, a kettõs mTOR inhibitorok és más metabolikus inhibitorok (pl. glutamináz, glikolízis és mitokondriális inhibitorok) vagy temozolomid anti-proliferatív hatását vizsgáltuk in vitro.

A négy vizsgált glioma sejtvonal különböző mTORC1 és C2 komplex aktivitást mutatott és a metabolikus enzimek expressziós mintázatai is eltérőek voltak. Az onko- (laktát, 2-HG) és a TCA metabolitok (malát, szukcinát, citrát) intra- és extracelluláris koncentrációja és a sejtek bazális oxigénfogyasztása korrelál ezekkel a metabolikus különbségekkel. Az mTORC1/C2 és a dual mTOR inhibitorok szignifikánsan magasabb anti-proliferatív hatást mutattak, mint az mTORC1 inhibitor *in vitro*. Továbbá, a különbözõ kombinációk hatásai a mitokondriális funkciók fontos bioenergetikai szerepére utalnak a sejtek proliferatív kapacitásában, amelyek egyéni különbségeket mutatnak.

Eredményeink alapján, a tumor sejtek metabolikus jellemzése, valamint az mTORI-k vagy és a használatban lévõ kemoterápiás szerek kombinációja a kiválasztott metabolikus útvonalak gátlóival a metabolikus profil eredményekkel összevetve további javulást eredményezhet a gliomák személyre szabott terápiájában.

54

H44 AppA MUTÁNSOK FUNKCIONÁLIS DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA ULTRAGYORS SPEKTROSZKÓPIÁVAL

Katalin Pirisi[1], Agnieszka Zieba[2], Robert Kapronczai[1], Greg Greetham[3], Peter J. Tonge[2], Steven R. Meech[4], Andras Lukacs[1]

[1] Department of Biophysics, Medical School, Szigeti Str. 12, H-7624 Pécs, Hungary [2] Department of Chemistry, and Department of Biochemistry & Cell Biology, Stony Brook University, Stony Brook, New York[3] Central Laser Facility, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxon OX11 0QX, United Kingdom[4] School of Chemistry, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich NR4 7TJ, United Kingdom

A BLUF domén fehérjék a fotoaktív flavoproteinek egy kiemelt családját alkotják, amelyekben a fényelnyelést követően strukturális átrendeződés valósul meg szoros összefüggésben a fehérje funkciójával. A legismertebb és legtöbbet vizsgált BLUF domén fehérje Rhodobacter Sphaeroides-ben fellelhető, a transzkipciós regulációban részt vevő AppA.

Sötét, oxigén-szegény körülmények között az AppA a PpsR nevű transzkipciós faktorhoz kötődik, intenzív kék színű fény hatására pedig az AppA-PpsR2 komplex disszociálódik, lehetővé téve ezzel a PpsR DNS-hez való kötődését és egyúttal megakadályozva a fotoszintetikus rendszer fehérjéinek bioszintézisét.

Korábbi vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a fehérje funkcióját a flavint körülölelő hidrogénkötésrendszer fényabszorpció révén megvalósuló átrendeződése triggereli. Jelen munka a flavin C2 atomjához közel eső 44-es pozícióban helyet foglaló histidinek cseréjével létrehozott mutánsokra koncentrál. Tekintve, hogy az aminosav hidrogénkötéssel kapcsolódik a flavinhoz, a különböző mutációk esetén a hidrogénkötés rendszer is különböző. A fotociklus feltérképezése látható- és infravörös tartomány beli tranziens abszorpciós spektroszkópiával valósult meg.

55

MAKROMOLEKULÁRIS ZSÚFOLTSÁG HATÁSA EGZOTIKUS DNS SZERKEZETEK KIALAKULÁSÁRA

Pfalzgraf Frederik, Somkuti Judit, Smeller László

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Bár az *in vitro* molekuláris spektroszkópiai mérések nagy részét híg vizes oldatokban végzik, nem szabad elfelejtenünk, hogy az élő szervezetben ettől merőben eltérő körülmények uralkodnak. A sejt belsejében a különféle makromolekulák összesített koncentrációja 30-40% körüli. Az utóbbi években egyre elterjedtebben vizsgálják, hogy a zsúfolt környezet hogyan befolyásolja egyes makromolekulák szerkezetét és működését. Nagyon sok adat van arra nézve, hogy a fehérjék szerkezete és stabilitása zsúfolt környezetben eltér a híg oldatban mutatottól.

Méréseinkben egy rövid egyszálú DNS szakasz, ún. aptamer viselkedését és szerkezetváltozásait vizsgáltuk zsúfolt környezetben. A makromolekuláris zsúfoltságot kísérletesen poliszacharidok vagy fehérjék segítségével állítják elő. Mi erre a célra 70 kDa móltömegű Ficoll-t használtunk, ami egy elágazó poliszacharid. Vizsgálati objektumunk a trombint kötő aptamer (TBA, thrombin binding aptamer) volt. Ez a 15 bázisból (GGTTGGTGTGGTTGG) álló DNS egy erősen felcsavarodott szerkezetet az ún. G-quadruplex szerkezetet veszi fel. Itt a guaninok négyesével egy síkban helyezkednek el. A TBA-ban két ilyen négyes található egymás felett.

Méréseinkben a TBA hőstabilitását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a zsúfolt környezet (10-40% Ficoll) – a korábbi fehérjés méréseinkkel ellentétben - nem befolyásolja jelentősen az átalakulási hőmérsékletet. Ezt azzal magyarázzuk, hogy a TBA viszonylag kis molekula, és ezért a kizárt térfogat effektus sokkal kisebb, mint a fehérjék esetén.

A magas hőmérsékletű kitekeredéssel szemben a quadruplex szerkezet feltekeredése nagyon érzékeny volt a zsúfoló ágensek jelenlétére. A feltekeredés dinamikája már alacsony (10%-os) Ficoll koncentráció esetén is jelentősen lelassult. Ez arra mutat, hogy a szerkezet kialakulása során van olyan köztes állapot, amely jelentős térfogatigényű.

56

G-QUADRUPLEXEK VIZSGÁLATA SPEKTROSZKÓPIAI MÓDSZEREKKEL

Végh András, Somkuti Judit, Adányi Mónika, Smeller László

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

Több mint 50 évvel Watson és Crick Nobel díja után már világos, hogy a DNS molekula a kettős hélix szerkezet mellett számos más egzotikus struktúrát vehet fel. Ezek egyike a G-quadruplex szerkezet, amelyben guanin bázisok szerveződnek planáris struktúrába. Négy guanin bázis kapcsolódik Hoogsteen féle kölcsönhatásokkal egymáshoz és ezekből a síkbeli négyesekből tipikusan kettő vagy három van egymás fölött.

A quadruplexek jelentőségét megnövelte, amikor felfedezték, hogy a DNS lánc végén elhelyezkedő telomér régió szekvenciája olyan, hogy benne a G-quadruplex szerkezetek könnyen megjelenhetnek. Ugyancsak találtak quadruplex struktúrákat egyes onkogének és protoonkogének promóter szekvenciáiban. A G-quadruplex térszerkezet gátolhatja ezek kifejeződését, illetve a telomér régióban gátolja a telomeráz aktivitást.

Kísérleteinkben a trombin kötő aptamert (TBA) és a humán telomér régióban előforduló szekvenciát (Htel) használtuk. Ezek szekvenciája: GGTTGGTGTGGTTGG (TBA) és AGGGTTAGGGTTAGGG (Htel). A térszerkezet kialakulását Fourier transzformációs infravörös (FTIR) és fluoreszcencia spektroszkópiával követtük. Ez utóbbi esetben az aptamerek két végét fluoreszcensen jelöltük egy donor-akceptor párral, és a FRET (Förster rezonancia energiatranszfer) jellel követtük a térszerkezet változásait.

A quadruplex szerkezet megjelenéséhez szükséges egy központi ion jelenléte. Kísérleteinkben a K^+ ion mind a TBA, mind pedig a Htel esetén stabilizálta a szerkezetet. A Htel szerkezete sokkal nagyobb hőstabilitást mutatott, ami azzal magyarázható, hogy a humán telomér háromszintű G-quadruplexet alkot, a TBA-ban pedig csak két egymással párhuzamos G-tetrád jelenik meg. Ez a különbség egyértelműen következik a szekvenciából, ahol három, ill. kettő guanin ismétlődik. A quadruplex szerkezetek kitekeredéséhez tartozó ΔH értékek is jól mutatják, hogy a Htel-t 50%-al több hidrogénhíd kötés stabilizálja.

Mivel a quadruplex szerkezetek *in vivo* stabilizálása perspektivikus a daganatok terápiájában, a Htel stabilitását vizsgáltuk a hozzá igazoltan kötő TMPyP4 molekula jelenlétében, és igazoltuk ez utóbbi stabilizáló hatását.

(TBA: thrombin binding aptamer, Htel: humán telomér, FTIR: Fourier transform infrared, FRET: Förster rezonancia energiatranszfer)

57

A MITOKONDRIÁLIS ANYAGCSEREHÁLÓZAT MODELLJE

Sváb Gergely[1,2], Szederkényi Gábor[2], Horváth Gergő[1], Tretter László[1]

[1] Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport
[2] Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar

A mitokondriumok fontos szerepet töltenek be a szervezet sejtjeinek anyagcseréjében. A mitokondriális citrát-kör által katalizált reakciók közismertek, viszont a mitokondrium aktuális metabolitszintjeiről kevés információval rendelkezünk. Joggal vetődik fel az igény a mitokondrium intermediereinek időbeli koncentráció-változásának leírására, mivel ezek számos kórállapotban megváltoznak. Az irodalomban megtalálható modellek széles tartományban mozgó paraméter-értékeket adnak meg, ezért a validációjuk során jelentős ponttalanságok figyelhetők meg.

A munkánk során egy pontosabb kvantitatív modellt szeretnénk fölállítani a mitokondriális anyagcsere folyamatok analízise érdekében, melynek célja a reakciókat katalizáló enzimek megváltozott működése során kialakult anyagcsere állapotok leírása. Emellett a mitokondrium új körülményekhez való metabolikus adaptációját vizsgáljuk.

A modellezés során a citrát-kör, az elektron transzportlánc, a malát-aszpartát és a citrát-piruvát inga működését külön-külön szimuláltuk, majd később összekapcsoltuk. A reakciósebességek meghatározásához a Michaelis-Menten enzimkinetikát használtuk. A transzportok sebességét a koncentráció gradiensek alapján határoztuk meg. A modellben szereplő enzimek és transzporterek paramétereit enzimkinetikai méréseink és irodalmi adatok alapján, illetve paraméterbecslési eljárásokkal határoztuk meg. A reakciók során lezajló koncentráció-változásokat differenciál-egyenletekkel írtuk föl. A modell 45 differenciális változót tartalmaz a különböző anyagok koncentrációinak megfelelően. A modellt MATLAB környezetben implementáltuk, a differenciál-egyenletek megoldásához ode23s solvert használtunk.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az önálló folyamatok ugyan külön könnyen szabályozhatóak, azonban működésük jelentősen eltér a fiziológiástól. Ezzel szemben a modulok összekapcsolásával egy komplex rendszer jön létre, amiben az egyes modulok egymást képesek szabályozni a kimeneteik által, így a fiziológiáshoz közeli eredményeket kaphatunk.

Ez eredmények azt mutatják, hogy a modell bővítésével és paramétereinek pontosításával egyre jobban tudjuk közelíteni a fiziológiás folyamatokat, ezért későbbi terveink között szerepel további anyagcsere folyamatok beépítése, és a hiányzó illetve pontatlan paraméter értékek mérése. Modellünket a későbbiekben szeretnék felhasználni különböző kórállapotok modellezésére azáltal, hogy az egyes enzimek defektusainak következtében megváltozott paramétereinek metabolizmusra gyakorolt hatását szeretnénk kvantitatívan megbecsülni. Ezáltal szeretnénk komplex képet kapni a mitokondrium metabolizmusáról és metabolomikájáról, és megjósolni az egyes enzimdefektusok súlyosságát.

Támogatók: EFOP-3.6.2-16-2017-00013, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

58

A GÖRÖGSZÉNA (TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM) MAGŐRLEMÉNY VALAMINT A DIOSGENIN HATÁSA AZ ENDOTHELIUM-FÜGGŐ VAZORELAXÁCIÓRA A METABOLIKUS SZINDRÓMA PATKÁNYMODELLJÉBEN

Szabó Katalin[1], Gesztelyi Rudolf[1], Lampé Nóra[1], Erdei Tamás[1], Kurucz Andrea[1], Varga Balázs[1], Bombicz Mariann[1], Remenyik Judit[2], Pesti-Asbóth Georgina[2], Kiss Rita[1], Szilvássy Zoltán[1], Juhász Béla[1]

[1] Debreceni Egyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

[2] Debreceni Egyetem, MÉK, Élelmiszertechnológiai Intézet

A görögszéna (Trigonella foenum-graecum) a távol-keleti országok elterjedt gyógy- és fűszernövénye, mely igazoltan kedvező hatású a szénhidrát- és zsíranyagcsere zavaraiban. Mivel az endothelium funkcionális integritásának védelme fontos eleme a metabolikus szindrómát jellemző patológiás állapot kezelésének, munkánk során a görögszéna-mag őrlemény és a diosgenin hatását vizsgáltuk az endotélium-függő vazorelaxációra a korai stádiumú metabolikus szindróma patkánymodelljében.

A vizsgálat során 60 db hím Wistar patkányt 6 csoportra osztottunk, melyek a következő kezeléseket kapták 6 hétig: normál táp és csapvíz (negatív kontroll); zsírdús táp + 5% cukros víz = HFHSD (pozitív kontroll); HFHSD + 1, 10 vagy 50 mg/ttkg/nap diosgenin; HFHSD + 2 g/ttkg/nap görögszéna-mag őrlemény. A kezelési időszak végén az állatok aorta abdominalis-ának proximalis szakaszát izoláltuk és belőle 2 mm-es gyűrűket vágtunk le. A gyűrűket 36 ^{o}C-os, oxigenizált Krebs oldattal feltöltött szervkádakban 10 mN alapfeszülés mellett felfüggesztettük. 60 perc inkubációt követően az ereken noradrenalin koncentráció-hatás (E/c) görbe (0,1 nM – 1 μM) segítségével meghatároztuk a noradrenalin félhatásos koncentrációját (EC_{50}). 60 perc mosás után a noradrenalin EC_{50}-nel végzett prekontrakciót követően acetilkolin E/c görbét vettünk fel (0,1 nM – 1 mM).

A HFHSD (high-fat, high-sugar diet) önmagában (pozitív kontroll) 6 hét alatt még nem befolyásolta érdemben a plazma glükóz- és inzulin-szintjét, ugyanakkor már szignifikánsan csökkentette a negatív kontrollhoz képest az acetilkolinnal kiváltható relaxációt, melyet azonban mind a diosgenin (10 és 50 mg/ttkg/nap), mind a görögszéna-mag kezelés szignifikánsan ellensúlyozott. A görögszéna-mag alapú készítmények tehát, akár mint funkcionális élelmiszerek, kedvezően egészíthetik ki a nyugati típusú táplálkozás okozta metabolikus zavarok (pl. metabolikus szindróma) farmakoterápiáját.

Tématámogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-00062

59

A PACAP ENDOMETRIOSISBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA

Szegeczki Vince[1], Fekete István[3], Reglődi Dóra[2], Zákány Róza[1], Juhász Tamás[1]

[1] Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet[2] Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Anatómiai Intézet, PTE-MTA, „Lendület PACAP kutatócsoport”[3] Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

A pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) a központi idegrendszer jellegzetes hormonja, azonban számos perifériás szövetben is kimutatták. Jelenléte igazolt a női nemi traktusban is: PACAP pozitív idegvégződések találhatóak a vagina falában, ismert általános simaizom relaxáns hatása, szerepe van a gonádtelepek kialakulásában és az ovarium sejtjeinek osztódásának szabályozásában. Az irodalmi adatok a peptid fontos szerepét körvonalazzák a női ivarszervek biológiai folyamataiban különböző állatmodellekben, azonban a humán relevanciák még elég hiányosak.

Kísérleteinkben az endometriosis kórfolyamatában bizonyítottuk a PACAP szignalizáció jelentőségét és esetleges hatásait. Műtétileg eltávolított, humán endometriosisos szövetmintákat in vitro körülmények között tovább tenyésztettünk, majd a szövetek továbbélése után PAC1 receptor agonista PACAP1-38-at adtunk a szövettenyészetekhez.

Aszövettenyészetekben HE festést követően megállapítottuk, hogy a kezelés hatására a mirigyes állomány csökkent, valamint PCNA pozitivitás kimutatásával kevesebb osztódó sejtet észleltünk. A PACAP-ot kötő receptorok közül immunhisztokémiai festés segítségével a PAC1 és VPAC1 receptorokat azonosítottuk, RT-PCR-rel és Western blot analízissel a kezelést követően ezek expressziójának csökkenését detektáltuk. PACAP adagolás hatására, a PAC1 receptor aktiváció célmolekulája, a PKA foszforilát formájának jelenléte csökkent fehérjeexpressziót mutat, míg a PKA fehérjeexpressziója nem változott. Az endometriosis kialakulása során az Oct4 és Nanogőssejtfaktorokexpressziója jelentősen változhat, ennek szerepe lehet a sejtek migrációjában. A PKA mindkét transzkripciós faktor aktivitását szabályozhatja. PACAP jelenlétében az Oct4 és Nanogexpressziója jelentősen csökken. Az Oct4 foszforilált aktívabb formájának jelenléte is redukálódik a neuropeptid jelenlétében.

Kísérleteink során sikeresen beállítottunk egy, a humán endometriosisos szövet in vitro tenyésztésére alkalmas módszert, továbbá feltételezhető, hogy a PACAP adagolása az Oct4 és Nanog transzkripciós faktorokra gyakorolt közvetett hatásán keresztül visszaszoríthatja a patológiás sejtburjánzást.

PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, Oct4: octamer-binding transcription factor 4, Nanog: DNA binding homeobox transcription factor involved in embryonic stem cell

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

60

TRPV4 OKOZTA MORFOLÓGIAI ELTÉRÉSEK PORCOSODÓ KULTÚRÁKBAN

Szűcs Csilla, Matta Csaba, Fürstál Barbara, Zákány Róza

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

A chondrocytákon kifejeződő Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4 (TRPV4) ioncsatorna a porcszövet extracelluláris mátrixában lezajló mechanikai és ozmotikus változások detektálásában és az azokhoz való alkalmazkodásban jelentős szerepet tölthet be. A TRPV4 főként kálciumra permeábilis multimodális kation csatorna, melynek egyre jelentősebb szerepet tulajdonítanak a porcsejtek differenciációjában és mechanoszenzitivitásában. Funkciónyeréses mutációja súlyos vázrendszeri dysplasiát idézhet elő. Célul tűztük ki a TRPV4 csatorna kimutatását és szerepének vizsgálatát porcosodó micromass kultúrákban.

Kísérleti modellként 11,5 napos egér embriók végtagtelepeiből létrehozott nagy sejtsűrűségű mesenchymális kultúrákat (micromass kultúrák) használunk, melyekben 7 tenyésztési nap alatt *in vitro* spontán lejátszódik a multinoduláris jellegű porcképződés. Az internoduláris terekben nyúlványos differenciálatlan, illetve fibroblast jellegű sejtek, míg a nodulusokon belül kerekded porcsejtek vannak. A TRPV4 ioncsatorna jelenlétét fehérje szinten vizsgáltuk, míg a csatorna modulálása során monitoroztuk a kultúrák morfológiáját, a metakromáziásan festődő mátrix mennyiségét, a sejtek osztódóképességét.

A micromass kultúrákból az 1-3-6 tenyésztési napokon learatott mintákban emelkedő TRPV4 fehérje mennyiséget mutattunk ki western blot technikával. Immunhisztokémiai festést alkalmazva a TRPV4 eltérő mennyiségben van jelen a noduláris és az internoduláris terekben. A fáziskontraszt felvételeken a TRPV4 agonista (4α-PDD) kezelés hatására a nodulusok szegélye elmosódott 6 napos kultúrákban, metakromáziás festődése gyengébb, mint a kezeletlen kultúráké. Az antagonisták (HC06707 és ruténium vörös) alkalmazása során a kultúrákban nagy internodularis terek és kisméretű porcnodulusok láthatóak a metakromáziás és a fáziskontraszt felvételeken. Az agonista fokozza a chondroprogenitor sejtek osztódóképességét, míg az antagonista HC06707 csökkenti.

A TRPV4 jelen van porcosodó egér micromass kultúrákban és eredményeink azt bizonyítják, hogy aktivitásának modulálása *in vitro* jelentősen befolyásolja a kultúrák morfológiáját, a kondrogenikus sejtek osztódóképességét és mátrixtermelését.

61

A SEPTINEK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PORCOSODÓ CSIRKE HIGH DENSITY KULTÚRÁKBAN

Takács Roland Ádám, Vékony Viktória, Vágó Judit, Pappné Karanyicz Edina, Horváth Tamás, Zákány Róza

Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,

A septinek egy eukariótákban erősen konzervált fehérjecsaládhoz tartoznak, amelynek tagjait egyre szélesebb körben a citoszkeleton új komponenseiként tartják számon. Az összes septin rendelkezik GTP-kötő doménnel, jellemzően heterohexamer alapszerkezeteket képeznek, illetve olyan magasabb rendű struktúrákat alkotnak, mint filamentumok és gyűrűk. Ismert, hogy plazmamembrán doméneket alkotnak az endoplazmás retikulum punktáinak közelében, aminek a STIM1–Orai1 összerendeződésben kardinális szerepet tulajdonítanak. Bizonyos septin típusok csendesítése vagy az átrendeződésének gátlása akadályozza a raktárvezérelt kalciumbelépést (store-operated calcium entry; SOCE), továbbá a kapcsolódó downstream jelátviteli folyamatokat. A septinek szerepe a porcosodás folyamatában nem ismert és általánosan elmondható, hogy a septineket más differenciációs folyamatokkal is igen kevés tanulmány hozza összefüggésbe.

Mivel laboratóriumunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a SOCE elengedhetetlen a porcfejlődés folyamatában, a célunk a septinek mint SOCE regulátorok funkcionális tanulmányozása volt az általunk jól ismert porcosodó csirke high density (HD) modellben.

Kísérleteinket a porcképződés meghatározó periódusában, a tenyésztés első vagy mádosik napján 24 óráig a septinek átrendeződésének gátlószerével kezelt (forchlorfenuron; FCF) HD kultúrákon végeztük. A SOCE-vel összefüggésben leírt septin típusok valamint a SOCE folyamatában résztvevő komponensek expresszióját mRNS és bizonyos esetekben fehérje szinten is megerősítettük (részben korábbi munkáink során). Kezelt és kontroll kultúrákon követtük számos kondrogenikus marker mRNS expressziós szintjét. Vizuális és szemikvantitatív szövettani módszerekkel elemeztük a telepek által termelt metakromatikus extracelluláris mátrix mennyiségét. Továbbá megvizsgáltuk az FCF hatását a kollagéntermelésre, valamint a chondrogenikus sejtek mitokondriális aktivitására és osztódóképességére. A kondrogenikus sejtek intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció váltazásainak FCF hatására bekövetkező feltételezett módosulásait jelenleg vizsgáljuk.

Eredményeinkből kiderül, hogy a septinek átrendeződésének gátlása a sejtek életképességére kifejtett negatív hatás nélkül csökkentette jelentősen azok proliferációját és porcspecifikus mátrixtermelését. Adataink az irodalmi ismeretekkel együtt értelmezve jól demonstrálják a septinek, a SOCE és a kondrogenikus folyamatok között található szoros kapcsolatot az általunk vizsgált porcosodó kultúrákban.

62

A MEMBRÁN MIKROKÖRNYEZET ÉS AZ AKTIN CITOSZKELETON HATÁSA A P-GLIKOPROTEIN (ABCB1) MŰKÖDÉSÉRE

Tarapcsák Szabolcs, Bársony Orsolya, Bacsó Zsolt, Szabó Gábor, Goda Katalin

DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Bevezetés: A P-glikoprotein (Pgp, ABCB1) az ATP-kötõ kazettás (ABC) transzporterek családjába tartozó multidrog transzporter. A Pgp mûködése során az intracelluláris tér felé nyitott, nagy affinitású és az extracelluláris tér felé nyitott alacsony affinitású konformációk között alternál. A konformáció érzékeny UIC2 antitest segítségével ezek a konformáció változások nyomon követhetõek. Munkacsoportunk korábbi kísérletei során kimutatta, hogy intakt sejtekben a Pgp molekulák 20-30%-a az intracelluláris tér felé nyitott, UIC2 reaktív konformációban található (Pool I) míg a Pgp-k további 70-80% nem UIC2-reaktív (Pool II). Mikroszkópos és immunprecipitációs kísérleteink alapján a Pool I Pgp-k elsõsorban a membrán raftokban találhatóak és szoros kapcsolatban állnak az aktin citoszkeletonnal. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy az aktin citoszkeleton latrunkulin B toxinnal történõ dezorganizációja illetve a sejtmembrán permeabilizációja streptolizin-O toxinnal (SLO) milyen hatással van a Pool I és Pool II Pgp-k konformációs flexibilitására.

Alkalmazott módszerek: Kísérleteink során humán Pgp-t expresszáló NIH 3T3 sejteket alkalmaztunk. Az UIC2 antitest segítségével vizsgáltuk a Pool I és Pool II Pgp-k konformáció változásait illetve detergens rezisztenciáját latrunkulin B illetve SLO kezelt sejtekben. Konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a Pool I és Pool II Pgp-k aktin citoszkeleton kapcsolatát SLO vagy latrunkulin B kezelést követõen.

Eredmények: UIC2 disszociációs kísérleteinkben kimutattuk, hogy intakt sejtekben a Pool I Pgpk alacsonyabb konformációs flexibilitással rendelkeznek, illetve magasabb detergens rezisztenciát mutatnak. SLO vagy latrunkulin B kezelés hatására a Pool I Pgp-k azonban visszanyerik aktivitásukat. Mikroszkópos kísérleteinkben kimutattuk, hogy a latrunkulin B kezelés szignifikánsan csökkentette a Pool I Pgp-k aktinhoz és filaminhoz való kapcsolódását.

Következtetések: Eredményeink alapján elmondható, hogy a Pool I és Pool II Pgp-k eltérõ membrán mikrokörnyezete és citoszkeleton asszociáltsága hatással van a fehérjék aktivitására. A Pool II fehérjék nagyobb aktivitást mutatnak intakt sejtekben, azonban a kortikális aktinhálózat SLO vagy latrunkulin B toxinnal történõ perturbációjának hatására a Pool I Pgp-k visszanyerik konformációs aktivitásukat.

Rövidítések: Pgp (P-glikoprotein), SLO (Streptolizin O)

Finanszírozás:TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 és 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023; OTKA PD75994, K72762és K124815

63

A RENDEZETLEN SZERKEZETŰ MIOZIN 16 C-TERMINÁLIS DOMÉN INTERAKCIÓI

Telek Elek[1,2], Holló Alexandra[1], Bécsi Bálint[4] Kengyel András[1,2] Erdődi Ferenc[4] Nyitrai Miklós[1,2,3]

[1] Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet
[2]Szentágothai János Kutató Központ
[3]MTA-PTE Nukleáris-Mitokondriális Interakciók Kutató Csoport
[4]Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet

A miozin 16 (Myo16) egy nemrégiben felfedezett nem-konvencionális motorfehérje, mely fontos szerepet játszhat a sejtciklus szabályozásban, valamint az idegrendszer fejlődésében. Korábbi kísérletekben kimutatták a Myo16 megnövekedett expressziós szintjét skizofréniában, illetve a Myo16 gén delécióját autizmusban.

A Myo16 motorfehérje négy szerkezeti alegységből épül fel: tartalmaz egy motor domént, egy könnyű lánc kötő IQ motívumot, egy ankyrin ismétlődéseket tartalmazó N-terminális domént (Myo16Ank) és egy, a miozinok között egyedülálló, rendezetlen szerkezetű, prolinban gazdag C-terminális farki domént (Myo16Tail). Ez utóbbi képes lehet profilint kötni, illetve foszforilációja a PI3K jelátviteli útvonalon keresztül aktiválhatja a WAVE-komplexet, ezáltal szabályozva az aktin citoszkeleton átrendeződést. Célunk ennek a rendezetlen szerkezetű Myo16Tail doménnek az előállítása és interakcióinak jellemzése volt.

Kísérleteinkben az IQ motívumot is tartalmazó Myo16Tail domént bakulovírus/Sf9 rendszerben expresszáltuk, denaturáló körülmények között tisztítottuk, majd sikeresen renaturáltuk. Fluoreszcens spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk a Myo16Tail szerkezeti rendezetlenségét, illetve a Myo16Tail kölcsönhatásait profilin1, aktin, Myo16Ank és skHMM fehérjékkel.

Habár a Myo16Tail és a profilin között koimmunprecipitációs kísérletek alapján interakciót feltételeztek, steady-state anizotrópia kísérleteinkkel nem mutattunk ki kötődést. A Myo16Tail és Myo16Ank között gyenge interakciót mértünk (K_D ~ 2,7 μM), a kötődést felületi plazmon rezonancia mérések is megerősítik. Korábbi kísérleteink kimutatták, hogy a Myo16Ank képes kötődni a skHMM-hez és szabályozza a motor domén működést. Ezért a továbbiakban azt is vizsgáltuk, hogy a Myo16Tail hogyan befolyásolja a Myo16Ank-skHMM interakciót.

Eredményeink szerint a Myo16Tail nem köt a profilin1-hez és közvetlenül nem befolyásolja a profilin1-
aktin komplexet, viszont az N-terminális Myo16Ank doménnel való gyenge kapcsolata egy visszahajló típusú szabályozási mechanizmust valószínűsít a Myo16 motorfehérje esetén.

A kutatás „Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-1 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.”.

Myo16 - Miozin 16 fehérje
Myo16Ank - Miozin 16 ankyrin domén
Myo16Tail - Miozin 16 C-terminális domén
PI3K - Foszfoinozitol-3 kináz jelátviteli útvonal
WAVE-komplex - Wiskott-Aldrich szindróma (VASP) fehérje család öt fehérje alegységből álló tagja
Sf9 – Spodoptera frugiperda rovar expressziós sejtvonal
skHMM – Vázizom miozin II nehéz meromiozin

64

NT-proBNP SPECIFIKUS APTAMEREK SZELEKTÁLÁSA

Tolnai Zoltán, Nagyné Scholz Éva, Szeitner Zsuzsanna, Harkai Ákos, Mészáros Tamás

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

Az aptamerek olyan in vitro előállított egyszálú oligonukleotidok, melyek az antitestekhez hasonló specificitással és szelektivitással képesek célmolekulájukhoz kapcsolódni. Az aptamerek számos előnyének és felhasználási lehetőségének köszönhetően a közeljövőben várható a diagnosztikában történő alkalmazásuk.

A BNP fehérje fő feladata a vér nátriumion tartalmának és térfogatának vizeletkiválasztáson keresztüli szabályozása. A vér proBNP szintjének mérése alapján képet kaphatunk a páciensek kardiovaszkuláris rendszerének állapotáról. A manapság használt antitest alapú immunoassay módszerek viszonylag drága anyag és eszköz használathoz kötöttek. Célul tűztük ki egy olcsóbb, egyszerűbb, aptamer alapú proBNP kimutatásra alkalmas módszer kidolgozását.

NT-proBNP fehérje C terminális részére specifikus aptamerek szelektálását SELEX módszerrel végeztük el. A szelekció során célmolekulaként a NT-proBNP C-terminálisán elhelyezkedő peptid szakasza, valamint az in vitro transzlációval előállított teljes fehérje került alkalmazásra. Az aspecifikus aptamerek eltávolítására 3 negatív szelekciós lépést végeztünk el. Szelekció végén 96 aptamer szekvenciáját meghatároztuk, majd motívumok és másodlagos szerkezet szempontjából in silico elemeztük. Az aptamerek karakterizálásához szükséges nagyobb mennyiségű fehérjét E. coli fehérjetúltermelő rendszerben állítottuk elő. Az egyes aptamerek ellenőrzése AlphaScreen módszerrel került kivitelezésre. A legígéretesebb aptamerek diagnosztikában való alkalmazhatóságát vérplazmát tartalmazó mintákban is ellenőriztük.

Laborunkban korábban létrehozott, NT-proBNP fehérje N terminális részére specifikus aptamerekkel, valamint a most szelektált C terminálisra specifikus aptamerek szelektálásával egy olyan proBNP vizsgálatra alkalmas szendvics típusú mérési rendszer létrehozásához járultunk hozzá, mely reményeink szerint a jelenlegi módszerekhez képest jelentősen megkönnyíti a kardiovaszkuláris biomarker mennyiségének meghatározását, így lehetőséget nyújthat a betegség gyors, egyszerű és költséghatékony diagnosztizálására.

Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-III-SE-25 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült”

BNP: B-típusú nátriuretikus peptid

proBNP: szignálpeptid nélküli, hasítatlan hormon előalak

NT-proBNP: N-terminális proBNP

E. coli: Escherichia coli

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

65

A GUILLAIN-BARRÉ SZINDRÓMA POTENCIÁLIS LIPIDMARKEREI

Petrovics-Balog Anna[1], Török Wanda[1], Péter Mária[2], Tajti János[1], Vígh László[2], Vécsei László[1,3], Balogh Gábor[2]

[1]SZTE ÁOK, Szent Györgyi Albert Klinikai Központ, Neurológiai Klinika
[2]MTA SzBK Biokémiai Intézet
[3]MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoport

A Guillain-Barré szindróma (GBS) egy általában fertőzést követően kialakult immunmediált polineuropátiával járó betegség, mely a perifériás idegrendszert érinti [1]. Ugyan a betegség incidenciája (1-2/100ezer fő) nem túl magas, a kórkép lefolyása során a betegek egyharmada mesterséges lélegeztetésre szorul, mely szükségessé teszi a betegség pontosabb diagnózisát.
A GBS gyakran érinti az ideggyököket is [1], melyeknek a cerebrospinális folyadékhoz (CSF) való közelségét figyelembe véve elsőként vetettük fel, hogy a demyelinizációval összefüggésbe hozható lipidváltozások a CSF-ben is megjelenhetnek. Kutatásunk célja ezen változások feltérképezése volt.
A szegedi Neurológiai Klinika liquor adatbázisát felhasználva a GBS betegek a jelenleg elfogadott klinikai kritériumok (szenzoros és motoros tünetek, hypo-/areflexia, a diagnózist támogató CSF eltérések) alapján kerültek kiválasztásra.

Liquor-specifikus, komprehenzív tömegspektrometriai lipidanalízisünk során a fehérje szinttel szoros korrelációban álló jelentős és gyakorlatilag minden lipidosztályra kiterjedő mennyiségi emelkedést találtunk a GBS csoportban a kontrollokhoz képest. A lipidom egészére kiható kvantitatív változás mögött számos kvalitatív különbséget is sikerült kimutatnunk. Hangsúlyozandó továbbá, hogy a GBS csoport lipidmintázata nagyon jól elkülönült a párhuzamosan elemzett sclerosis multiplex betegekétől.

Legjobb tudomásunk szerint a GBS betegek liquorjának ilyen széleskörű lipidomikai analízise a klinikai irodalomban teljesen újdonságnak számít. Az általunk feltárt, a lipidmetabolizmus komplex megbomlására utaló adatok fontos új információt szolgáltathatnak a betegség patomechanizmusának jobb megértéséhez.
Mivel a GBS egy multifaktoriális kórkép, az egyes esetek klinikai lefolyását az azokhoz tartozó lipidmintázatokkal összevetve lehetőségünk lehet a betegség további klasszifikációjára, illetve differenciáldiagnózisra. Ez a későbbiekben segíthet a pontosabb prognózis felállításában és specifikusabb terápia megválasztásában.

Rövidítések:
GBS: Guillain-Barré szindróma
CSF: cerebrospinális folyadék

Irodalom:
[1] Pritchard, Hughes (2004) Lancet Journal, **Volume: 363, No. 9427,** 2186-2188.

66

EPIGENETIKAI FAKTOROK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ CHONDROGENIKUS MODELLEKBEN

Karanyicz Edina[1], Vágó Judit[1], Rauch Tibor[2], Zákány Róza[1]

1 DE-ÁOK Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
2 Section of Molecular Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, IL, USA

Sejtjeink működését az őseinktől megörökölt genetikai információk mellett számos környezeti faktor is befolyásolja. Ezen faktorok hatását epigenetikai vizsgálatokkal követhetjük nyomon. Ezáltal olyan öröklődő és reverzibilis változásokat figyelhetünk meg a génaktivitásban, amelyek során nem történik változás a DNS nukleotid szekvenciájában. Az epigenetikai szabályozó faktorok a chondrogenezis normális folyamatában, illetve az ízületi porc degenerációjával járó megbetegedésekben is kritikus szereppel bírnak. Jelen kutatásunk a porcszövet fejlődésében szerepet játszó epigenetikai mechanizmusok megismerésére irányul.

Az epigenetikai szabályozás számos tényezője közül kísérleteinkben a DNS és a hiszton metilációt vizsgáltuk. Az epigenetikai módosítások mesterségesen is befolyásolhatók különféle vegyületekkel, melyek a végrehajtó enzimek működését, vagy magát a folyamatot gátolják. Kísérleteink során két gátlószert alkalmaztunk: az 5-azacitidint, mely a DNS-be beépülve gátolja annak metilációját; illetve a GSK126-ot, amely az EZH2 enzim hiszton metiltranszferáz aktivitását gátolja. E két gátlószer hatását Hamburger-Hamilton 22-24-es fejlődési stádiumú csirke embriók végtagtelepeiből származó nagy sejtsűrűségű (high density, HD) kultúrákon vizsgáltuk. A GSK126-ot 2 µM-os, az 5-azacitidint 10 µM-os koncentrációban alkalmaztuk. Különböző időpontokban indított kezelésekkel tanulmányoztuk a két szer hatását a porcosodás irányába történő differenciáció eltérő stádiumainál. A kezelési idők lejártával metakromáziás festéssel követtük nyomon a porcspecifikus extracelluláris mátrix mennyiségét. Emellett RT-qPCR reakciókkal elemeztük porcspecifikus marker gének (Sox9, Col2a1, Aggrecan) expresszió változásait. Micromass kultúrákból kinyert mintákon végzett RNS chip-assay eredményei alapján kísérleteinkhez három olyan gén is kiválasztásra került, melyek érintettek a chondrogenezisben, emellett géntermékeik epigenetikai szabályozó szereppel bírnak. A Dnmt3 (de novo DNS metiltranszferáz), Tet1 (DNS demetiláz) és Ogt (N-acetilglukozamin-transzferáz, Tet1 regulátor) gének jelenlétét in situ hibridizációval vizsgáltuk 15 napos egér embriókból készített metszeteken.

Eredményeink alapján mindkét gátlószer jelentős változásokat idézett elő a porcképződésben, melyeket mind szövettani festéssel, mind mRNS szintű vizsgálatokkal sikerült igazolnunk. Továbbá RNS-RNS hibridizációval sikeresen jelöltük mindhárom epigenetikai markerünket, így bizonyítottuk jelenlétüket az egérembriók differenciálódó porcszövetében.

Rövidítések:

- EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
- HD: high density
- Sox9: SRY-box 9
- Col2a1: collagen type II alpha 1 chain
- Dnmt3: DNA methyltransferase 3
- Tet1: tet methylcytosine dioxygenase 1
- Ogt: O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase

67

A HEADCASE A *DROSOPHILA* VÉRSEJTKÉPZŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÓ FAKTORA

Varga B. I. Gergely[1], Csordás Gábor[1], Jankovics Ferenc[1], Cinege Gyöngyi[1], Sinka Rita[2], Kurucz Éva[1], Andó István[1] és Honti Viktor[1]

[1]MTA, SZBK, Genetikai Intézet, Szeged
[2]SZTE, TTIK, Genetikai Tanszék, Szeged

Az immunrendszer hatékony működésének alapvető feltétele a vérsejtek képződésének pontos szabályozása. Az ecetmuslica központi nyirokszervében számos jelátviteli kaszkád összehangolt működése irányítja az immunsejtek, a hemociták – a fagocitáló plazmatociták, a melanizációban szerepet játszó kristálysejtek és a kizárólag immunindukció hatására képződő, tokképző lamellociták - differenciálódását. Korábbi kísérleteink során megfigyeltük, hogy a HECA humán tumorszuppresszor *Drosophila* homológja, a *headcase* (*hdc*) kifejeződik a központi nyirokszervben, azonban immunindukció hatására a nyirokszervből a keringésbe jutó és differenciálódó vérsejtekben a gén aktivitása megszűnik, ezért megvizsgáltuk a faktornak a hemociták érésében betöltött szerepét.
P-elem konverzió módszerrel *hdc-Gal4* genetikai meghajtóelemet hoztunk létre, melynek segítségével a lárva fejlődése során követtük a gén kifejeződésének változását. P-elem remobilizációval amorf *hdc* allélt állítottunk elő a faktor vérsejt differenciálódásban betöltött szerepének vizsgálatához. A mutáció fókuszának felderítésére különböző mintázatban kifejeződő meghajtóelemeket és a *hdc*-t csendesítő transzgéneket alkalmaztunk. A hemocita képződést szabályozó jelátviteli útvonalak résztvevőinek túltermelésével, illetve csendesítésével azonosítottuk a Hdc lehetséges együttműködő partnereit.
Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a *hdc* kifejeződése a második stádiumú lárva központi nyirokszervének mindhárom funkcionális egységére (a progenitorok és a differenciálódott sejtek zónáira, valamint a vérsejtképző niche-re is) kiterjed, de ez a mintázat az egyedfejlődés során fokozatosan szűkül, míg a vándorló lárva nyirokszervében már csak néhány sejtcsoportot érint. A *hdc* mutáns lárvák keringésében spontán lamellocita képződést detektáltunk; a mutáció fókuszát a vérsejtképző niche-be térképeztük. Genetikai kölcsönhatást figyeltünk meg a *hdc* és a *Drosophila* vérsejtképzését szabályozó legfontosabb jelátviteli kaszkádok - a Hedgehog, a Decapentaplegic és a JAK/STAT útvonalak - elemei között. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a *Drosophila melanogaster*ben a Hdc a vérsejt-differenciálódás szabályozásának kulcseleme.

68

DIGITÁLIS GÉNEXPRESSZIÓS ELEMZÉSEK SZOFTVERES TÁMOGATÁSA

Virág Eszter[1], Hegedűs Géza[2]
Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Növénytudományi és Biotechnológiai Tanszék, Keszthely[1]Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Gazdaságmódszertani Tanszék, Alkalmazott Informatika Csoport, Keszthely[2]Educomat Kft, Keszthely[1,2] www.educomat.hu

A transzkripciós mintázat a sejt egyik legösszetettebb és dinamikusan változó aspektusa. Az RNA-seq (NGS) technológiával a legrészletesebb képet kaphatjuk a sejtben kifejeződő steady-state RNS állapotáról, strukturális felépítéséről, valamint mennyiségéről. Az RNA-seq egy viszonylag gyors és pontos lehetőséget nyújt különböző minták gén kifejeződésének vizsgálatára, valamint a mintákon belüli génexpressziós szintek összehasonlítására, akár *de novo* szekvenálás esetén is. Azonban ahhoz hogy a nyers leolvasásoktól eljussunk a minták génexpressziós mintázatáig komoly bioinformatikai ismeretekkel valamint optimális hardver és szoftver felszereltséggel kell, hogy rendelkezzünk, amely jelentős költségigényű. Informatikai munkánk során törekszünk a minták legpontosabb *in silico* elemzésére, melyhez az elérhető open source programokat saját fejlesztésű alkalmazásokkal egészítjük ki az adott mintára optimalizálva. Jelen publikációban egy ilyen génexpresszió-szint kiértékelő applikációt *(GenoUtils)* mutatunk be növényi mintára alkalmazva. A kísérletes munkát az ürömlevelű parlagfű virágzásbiológiájának genetikai vizsgálata adta. A hím, nő virágzat és levélminták *de novo* RNA-seq összehasonlító elemzését végeztük el különös tekintettel a virágzati merisztéma és a virágszervek differenciálódásáért felelős génekre nézve.

A fejlesztéshez Illumina HiSeq2000 (2x100) és Illumina NextSeq500 (2x80) paired-end leolvasásokat vettünk alapul. A minták *de novo* összerakásai Trinity programmal készültek. Az ebből származó transzkripteket, valamint UNIPROT és NCBI adatbázisból gyűjtött referencia gének CDS adatállományait használtunk input file-ként (continuous FASTA). A nyers leolvasásokat FastQC kiértékelést követően tisztítottuk a megfelelő minőségűre, ehhez a *GenoUtils* mintázat rendező modulját alkalmaztuk.

A tisztított leolvasások referenciához való illesztését a Bowtie parancssoros program végzi, amely a *GenoUtils*-ban grafikus felületet kapott, ennek output-ját vizsgálja tovább a *GenoUtils* algoritmusa. Az output file-ok a FASTA rekordok RPKM és TPM értékeit tartalmazzák, amelyek alapján különböző diagramok készíthetők. A fejlesztés felhasználóbarát, Windows alapú és grafikus felülettel rendelkezik.

Rövidítések: NGS, Next Generation Sequencing; RNA-seq, RNS szekvenálás; CDS, kódoló szekvencia; RPKM, Reads per kilobase per million; TPM, Transcripts per million.

A munkát az Emberi Erőforrások Minisztériumának Új Nemzeti Kiválóság Programja, ÚNKP-2017-4-IV-PE-1 támogatta (V.E.).

69

ORAI1 CSATORNA KIHORGONYZÁSA AZ IMMUNOLÓGIAI SZINAPSZISBAN

Vörös Orsolya[1], Panyi György[1], Hajdu Péter[2]

1: Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen
2: Debreceni Egyetem, FOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A CRAC csatornáknak kiemelt szerepe van a T-limfocita aktivációhoz szükséges Ca^{2+} jel kialakításában. A CRAC csatorna két szerkezeti egységből épül fel: az ER membránjában található STIM1-ből és a plazmamembránbeli Orai1-ből; melyek a T-sejt APC-vel történő találkozása során kialakuló immunológiai szinapszisban (IS) felhalmozódnak. Továbbá ismert, hogy aktin-kötő fehérjék (HS1/WASp/WAVE2) - melyek felelősek lehetnek az ioncsatornák IS-beli kihorgonyzásáért - az IS-ben feldúsulnak, valamint géncsendesítésük gátolja az IS kialakulását és a Ca^{2+}- függő jelátviteli útvonalat a T sejtben. Kísérleteinkben ezen aktin-kötő fehérjék és az Orai1 közötti kölcsönhatás meglétét és funkcionális következményeit tanulmányoztuk.

Munkánk során az Orai1 különböző hosszúságú N- illetve C-terminálisát (N1: 1-74, N2: 1-88, C: 259-301) GST fehérje fúziós plazmidba klónoztuk be. Emellett PCR-rel létrehoztunk EGFP-vel jelölt, vad-típusú Orai1, illetve különböző N-terminális deléciós mutánsokat (Orai1-ΔN1: 1-74 aminosav levágva, Orai1-ΔN2: 1-88 aminosav eltávolítva), melyeket Jurkat T sejtekben expresszáltunk.

GST affinitás kromatográfiát alkalmazva kimutattuk, hogy a HS1 az Orai1 csatorna N-terminálisához képes kötődni. Az EGFP-vel jelölt, vad típusú illetve különböző N-terminális deléciós mutáns (Orai1-ΔN1, Orai1-ΔN2) csatornákat stabilan expresszáló Jurkat T sejteket CD3-CD28 beaddel konjugáltatva immunológiai szinapszist hoztunk létre, majd különböző időpillanatokban (1, 5, 15, 30 perc) meghatároztuk az Orai1 és a HS1 IS-beli feldúsulását és kolokalizációját. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az Orai1 N-terminális rövidebb szakaszának eltávolítása (Orai1-ΔN1) esetén az Orai1 továbbra is képes a HS1-gyel kolokalizálódni az IS-ben a T sejtekben. Az N-terminális nagyobb részének eltávolítása (Orai1-ΔN2) során az Orai1 IS-beli feldúsulása elmaradt, és nem mutat HS1 kolokalizációt.

Mindezek alapján megállapítható, hogy a HS1 szerepet játszik az Orai1 csatorna IS-beli kihorgonyzásában, és feltételezhetően az N-terminálisán lévő SH2-kötő doménhez (80-83) képes kapcsolódni. Az Orai1-HS1 interakció funkcionális szerepének megértéséhez további kísérletek elvégzését tervezzük.

Rövidítések:

CRAC: calcium release-activated calcium channel/ Ca^{2+} felszabadulás aktivált Ca^{2+} csatorna

Ca^{2+}: calcium /kalcium **STIM1:** stromal interaction molecule 1/ sztróma interakciós molekula 1

APC: antigen presenting cell/ antigén prezentáló sejt **IS:** immunological synapse/ immunológiai szinapszis

ER: endoplasmic reticulum/ endoplazmatikus retikulum **SCID:** *severe combined immunodeficiency/* súlyos kombinált immundefektus

HS1: hematopoietic lineage cell specific *protein* 1/ hematopoietikus sejtvonal-specifikus fehérje 1

WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome *protein/* Wiskott–Aldrich szindróma fehérje

WAVE2: Wiskott–Aldrich Syndrome *protein* family verprolin-homologous *protein*-2/ Wiskott–Aldrich szindróma fehérje család verprolin-homológ fehérje-2 **PCR:** polymerase chain reaction/ polimeráz láncreakció

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*/ "fokozott" zöld fluoreszcens fehérje **GST:** glutathione S-transferase/ glutation-S-transzferáz

CD3/CD28: cluster of differentiation 3/28 / differenciálódási csoport 3/28 SH2/SH3: *Src Homology 2/3/* SRC homológ 2/3

70

KRÓNIKUS SRTESSZNEK KITETT PATKÁNYOK VIZSGÁLATA *IN VIVO* DIFFÚZIÓS TENZOR KÉPALKOTÁSSAL

Vranesics Anett[1,2], Nagy Szilvia Anett[3,4,6], Berente Zoltán[2,5], Varga Zsófia[3], Csabai Dávid[3], Perlaki Gábor[6], Orsi Gergely[6], Dóczi Tamás[4,8], Czéh Boldizsár[3,7]

[1]PTE-ÁOK Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola, [2]PTE-ÁOK Kísérletes Képalkotó Diagnosztikai Kutatócsoport, [3]MTA-PTE-SzKK Stressz Neurobiológia Kutatócsoport, [4]Pécsi Diagnosztikai Központ, [5]PTE-ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, [6]MTA-PTE Klinikai Idegtudományi Képalkotó Kutatócsoport, [7]PTE-ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet, [8]PTE-ÁOK Idegsebészeti Klinika

Napjainkban a stressz hatására kialakuló megbetegedések elsődleges népegészségügyi problémát jelentenek. A stressz, különösen a krónikus stressz fontos szerepet játszik számos szomatikus és központi idegrendszeri megbetegedés kialakulásában. A traumatikus vagy hosszan tartó stressz megváltoztatja az agy strukturális felépítését, sőt, annak működését is, de azt hogy pontosan milyen neurobiológiai változások vezetnek a neuro-pszichiátriai betegségek kialakulásához azt ma még nem tudjuk. Célkitűzésünk az volt, hogy az agyi szerkezeti elváltozásokra érzékeny MR felvételek elkészítéséhez diffúziós tenzor képalkotást (DTI) optimalizáljunk, adatfeldolgozó műveletsort dolgozzunk ki és a kapott adatokat statisztikai elemzésekkel összehasonlítsuk krónikus stressznek kitett patkányokban. 32 fiatal hím Sprague-Dawley patkányt (kontroll csoport: 16 állat, stressz csoport: 16 állat) napi 6 órában 21 napon keresztül mozgáskorlátozásnak vetettünk alá, ezzel indukálva a krónikus stressz állapotot. Négy időpontban készítettünk MR-felvételeket egy 4.7T Bruker PharmaScan pre-klinikai MR szkennerrel (Bruker Biospin GmbH). A kiindulási (baseline) felvételeket a kézhez szoktatás után, de még a stresszelés megkezdése előtt vettük fel. Az akut stressz hatását 1 héttel a stressz megkezdése utáni felvételekkel vizsgáltuk. A krónikus stressz hatását a 3.-ik stressz héten készült képalkotással vizsgáltuk. Végül volt egy negyedik mérés is, amit 4 héttel a stressz befejezése után mértünk. Ennek a negyedik mérésnek a célja az volt, hogy feltárjuk van-e regenerálódás a stressz hatása alól, vagy pedig az elváltozások tartósak maradnak-e. Ezek után elkészítettünk egy pipeline-t az adatok feldolgozására, melynek első lépéseként az elkészült nyers adatokat NiFTi adatokká alakítottuk és átméreteztük FMRIB Software Library (FSL) program segítségével, majd elkészítettük a csak agyi struktúrákat tartalmazó maszkokat. Fontos lépésként korrigáltuk az Eddy-áram és az alanyok mozgásából származó műtermékeket. Szintén az FSL szoftver segítségével elkészítettük minden méréshez a frakcionált anizotrópia (FA), az átlagos diffúzivitás (MD), a sajátértékek ($L_{1,2,3}$) és a sajátvektorok ($V_{1,2,3}$) térképeit. A kapott adatok feldolgozása folyamatosan zajlik, a jelen munkában a frakcionális anizotrópia térképeket mutatjuk be, amely a DTI-ről alkotott mai álláspontunk szerint a legjobban adja vissza a rostszerkezet irányultságát.

Rövidítések jegyzéke:
DTI - diffúziós tenzor képalkotás
FSL - FMRIB Software Library program
FA - frakcionált anizotrópia
MD - átlagos diffúzivitás
$L_{1,2,3}$ - sajátértékek
$V_{1,2,3}$ – sajátvektorok

A kutatás támogatói: A Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_NAP_13-2-2014-0019 és 20017-1.2.1-NKP -2017-00002), valamint az EFOP-3.6.2-16-2017-00008 „A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegeneratív folyamatokban: A molekulától a betegágyig” voltak.

71

LIPID-KETTŐSRÉTEGEK OXIDÁLÓ ÁGENSEK ÁLTAL OKOZOTT SZERKEZETVÁLTOZÁSAI

Zolcsák Ádám[1], Bőcskei-Antal Barnabás[1], Bozó Tamás[1], Kósa Nikoletta[1], Csík Gabriella[1], Voszka István[1], Tóth Katalin[2], Herényi Levente[1]
[1] Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológia Intézet, Budapest
[2]DKFZ - Biophysics of Macromolecules, Heidelberg

Kutatócsoportunk korábbi munkáiban a biológiai membránok fény hatására bekövetkező károsodásait tanulmányozta modellrendszereken. Mások mellett ez az alapja az orvosi gyakorlatban széles körben használt fotodinamikus terápiának is.

Jelen munkánkban a membránok szerkezeti és mechanikai tulajdonságainak külső hatásokra, elsősorban oxidáló ágensek által bekövetkező változásainak nyomon követését tűztük ki célul. Ennek érdekében olyan modellrendszer létrehozását terveztük, amely alkalmas a fotoszenzibilizáció során bekövetkező membránkárosodások kimutatására. Ezért eljárást dolgoztunk ki többkomponensű felületasszociált lipid-kettősréteg előállítására. Ehhez DPPC és DOPC lipidek keverékét használtuk, amelyből kis unilamelláris vezikulákat állítottunk elő. Ennek segítségével csillámfelületen, meghatározott hőmérsékleten történő inkubációval felületasszociált lipid-kettősréteget hoztunk létre.

A membránrendszert ezután potenciálisan membránkárosító ágensek hatásának tettük ki. Az így nyert rendszerek topológiáját nagyfelbontású AFM képalkotás segítségével tanulmányoztuk. A kettősrétegek szerkezeti-mechanikai tulajdonságainak külső hatásokra létrejövő változásait AFM „erőspektroszkópiával” vizsgáltuk.

Eredményeink egyikének tekinthető az, hogy a liposzómák megfelelő körülmények között összefüggő felületasszociált lipid-kettősréteget hoztak létre a csillámfelszínen. A kettősrétegben a DPPC és a DOPC lipidek külön, 1 nm magasságkülönbséggel jellemezhető fázist alkotnak. Ezt követően „erőspektroszkópiai” mérések során rögzítettük a lipid-kettősréteg átszúrására jellemző nanomechanikai ujjlenyomatot. Az átszúráshoz szükséges erők külső hatásokra létrejövő megváltozásából következtethetünk a membrán szerkezeti változásaira. A kapott eredmények lehetőséget biztosítanak arra, hogy tovább lépve a kis unilamelláris liposzómák esetében korábbi méréseink során tapasztalt, fény hatására bekövetkező változásokat is felderíthessük ezzel a módszerrel.

DPPC – dipalmitoil-foszfatidilkolin

DOPC – dioleoilfoszfatidilkolin

AFM – atomierő-mikroszkóp