

1

OXIDATÍV METABOLIT MEGJELENÉSÉNEK VIZSGÁLATA A 4-NITROFENOL
FELSZÍVÓDÁSA SORÁN FIZIOLÓGIÁS ÉS DIABÉTESZES KÖRÜLMÉNYEK
KÖZÖTT

Almási Attila¹, Sikó Melinda¹, Verkman Nóra¹, Fischer Emil², Perjési Pál¹

¹Pécsi Tudományegyetem, GYTK, Gyógyszerészi Kémiai Intézet

²Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

A gyógyszerek per os történő bevétele után, a gyomor-bél traktusból felszívódva a venaeportae-n keresztül a májba kerülnek, majd innen a szisztémás keringésbe és a hatás helyére jutnak. Ezek során a vegyületek és metabolitjaikkiválasztódhatnak a bélbe, a májon keresztül az epébe, vagy a vesén keresztül a vizeletbe. Vizsgálataink során a korábbi kísérleteinkben használt - főként konjugációs (glükuronidáció és szulfatáció) folyamatok révén átalakuló - 4-nitrofenolnál, a CYP2E1 enzimen kis mennyiségben képződő oxidatívmetabolit megjelenését vizsgáltuk in vivo, fiziológias és patológias (kísérletes diabétesz) körülmények között. Vizsgálatainkat hím Wistar patkányokon végeztük. A vékonybél egy kb. 10 cm-es jejunális szakaszát kanüláltuk és rajta 500 μM 4-nitrofenol oldatot áramoltattunk keresztül, majd a perfundált oldatból időközönként mintákat vettünk. Egyidejűleg az epéből is meghatározott időközönként frakciókat gyűjtöttünk. A kísérletet elvégeztük olyan állatokon is, amelyek a vizsgálat előtt egy héttel, kísérletes hiperglikémia létrehozása céljából streptozotocint kaptak. A 4-nitrofenol és az oxidatív metabolit 4-nitrocatechol vékonybélperfuzátumból és epéből történő meghatározását a gyűjtött minták extrakciója után végeztük. A kísérlet során gyűjtött szövetekből meghatároztuk a CYP2E1 aktivitást. Azt tapasztaltuk, hogy a 4-nitrocatechol folyamatosan jelen van a vékonybélperfuzátumban, de az epében nem volt mérhető. A kísérletes hiperglikémia során a CYP2E1 aktivitása megnőtt.

A PARP INHIBITOR, HO-3089 HATÁSA JELÁTVITELI ÚTVONALAKRA
PULMONÁRIS HIPERTÓNIABAN

Andreidesz Kitti¹, Kovács Krisztina¹, Sümegi Balázs¹, ifj. Gallyas Ferenc¹
1 Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi
Kémiai Intézet,

A pulmonális hipertónia (PH) egy ritka és progresszív betegség, melynek patogenezise tisztázatlan. A PH-ra jellemző a tüdőartériák simaizom- és endotél sejteinek az abnormális proliferációja, ami hipertrófiához és strukturális újrendeződéshez vezet. A betegség jelenleg nem gyógyítható, a mai napig csak különböző tüneti kezelések léteznek.

A monokrotalin (MCT) indukálta PH patkány modell az egyik leggyakrabban használt rágcsló modell. A pontos mechanizmus, amely során a vegyület PH-t okoz, nem teljesen ismert.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek különböző fehérjék ADP-ribozilációját katalizálják. Mivel számos funkciójuk közül talán a legfontosabb, a DNS hibajavításban betöltött szerepük, emiatt különböző gátló szereket fejlesztettek, melyek az enzimfunkciót gátolva befolyásolják a DNS repair mechanizmust.

Pulmonális hipertóniára jellemző, hogy a reaktív oxigén gyökök és az oxidatív stressz jelentősen megnő mind a tüdőben, mind a teljes kardiovaszkuláris rendszerben.

Kimutatták, hogy a PARP gátló olaparib védő hatást mutat oxidatív stressz körülményei között patkány kardiomiocitákban.

Kutatásunk során MCT-indukálta patkánymodellben vizsgáltuk egy PARP gátló – HO-3089 védő hatását. Vizsgáltuk a PI3K-Akt és MAP kináz útvonalakban történő változásokat, a fehérjék nitrozilációját, az alveoláris falvastagság változását, a szív/testtömeg arányt és az állatok túlélését.

Eredményeink alapján a PARP inhibitor HO-3089 pozitív hatása látható az állatok túlélésének, a szív/testtömeg arányának, a vizsgált jelátviteli útvonalak, a fehérje nitroziláció és az alveoláris falvastagság vizsgálatában.

Ezen adatok alapján elmondható, hogy a HO-3089 potenciális gyógyszerjelölt lehet pulmonális hipertónia terápiában.

PH pulmonális hipertónia
MCT monokrotalin
PARP poli(ADP-ribóz) polimeráz

MATRIPTÁZ INHIBITOR TESZTELÉSE PRIMER MÁJSEJTEKEN ÉS
BÉLHÁMSEJTVONALON

Barna Réka Fanni, Pomothy Judit Mercedesz¹, Pásztiné Gere Erzsébet¹
¹ Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest

A TTSP család számos tagját kutatják napjainkban, mint a MT-1 és MT-2 enzimet is. A MT-1 felel az epiteliális szövetek homeosztázisának kialakításáért és fenntartásáért a TJ kapcsolóstruktúrák szabályozásán át. A MT-2 pedig a vasanyagcsere szabályozásában vesz részt a hepcidin termelődésének csökkentésén keresztül.

Kutatásunk során egy kereskedelmi forgalomban nem kapható, 3- Apha származékú MT inhibitorot teszteltünk, hogy képes-e hatékonyan gátolni mindkét enzimet, és hogyan befolyásolja a sejtek életképességét.

A MI-432 inhibitor MT-1 gátló hatását nem daganatos, sertés IPEC-J2 sejtvonalon, MT-2 enzimre gyakorolt hatását pedig patkány és sertés primer májsejteken teszteltük. A sejtleletképességet MTS módszerrel, az extracelluláris H₂O₂ szintet Amplex Red reagenssel, a sejtréteg elektromos ellenállását TER mérésével, a hepcidin termelődés változását pedig ELISA módszerrel vizsgáltuk.

A kutatás során a MI-432 a vizsgált koncentrációkban a kezelési idő alatt nem csökkentette az életképességet a primer májsejteken és az IPEC-J2 sejtvonalon sem, illetve nem indukált H₂O₂ termelődést. Az IPEC-J2 sejtréteg elektromos ellenállása szignifikánsan csökkent az inhibitor hatására. A primer májsejteknél pedig szignifikánsan nőtt a hepcidinszint.

Az eredmények alapján az MI-432 későbbiekben szerepet kaphat, mint matriptáz aktivitást befolyásoló gyógyszerjelölt vegyület, például a hemokromatózis gyógykezelésében.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.2-16-2017-00012).

3-Apha: 3-amidino-fenilalanin

H₂O₂: hidrogén-peroxid

IPEC-J2: intestinalporcineepithelialcell line- J2, nem daganatos, újszülött sertés jejunális sejtvonal

MI: matriptáz inhibitor

MT-1: matriptáz-1

MT-2: matriptáz-2

MTS:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxi-fenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium

TER: transzepiteliális elektromos ellenállás

TJ: tightjunction, szoros sejtkapcsoló struktúra

TTSP: kettes típusú transzmembrán szerin proteáz

4 A SZINDEKÁN-4 SZEREPE A MIOBLASZTOK MIGRÁCIÓJÁBAN

Becsky Dániel¹, Szabó Kitti¹, Gyulai-Nagy Szuzina¹, Gajdos Tamás², Bálint Árpád³, Horváth Péter³, Erdélyi Miklós², Dux László¹, Dr. Keller-Pintér Anikó¹

1 SZTE ÁOK, Biokémiai Intézet, Szeged

2 SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

3 MTA SZBK Biokémiai Intézet BIOMAG Kutatócsoport, Szeged

Bevezetés: A vázizomzat sérülését követően nagyfokú regenerációra képes, melynek során a prekursor (szatellita) sejtek a sérülés helyére migrálnak. A sejt migráció a sejt-mátrix kapcsolatok átépülésével jár. A sejtek mozgásához szükséges a sejtalkotók megfelelő lokalizációja, többek közt a centroszómáknak a mozgás irányába (a vezető oldal és sejt-mag közé) történő rendeződése. A SDC4 génkiütött egerekben a vázizom morfológiája és regenerációja sérült, de nem ismert a jelenség pontos mechanizmusa. Célunk volt a SDC4 mioblasztok migrációjában betöltött szerepének vizsgálata.

Módszerek: Kísérleteinkhez a SDC4 expresszióját shRNS-sel csökkentettük C2C12 egér mioblaszt sejtekben. A direkcionális, 2D migráció vizsgálatához a sejt kultúra inszert eltávolítását követően, élősejtes mikroszkópia során készített sorozatfelvételeken az individuálisan mozgó sejteket (n=84-150 sejt/sejtvonal) CellTracker és ImageJ képfeldolgozó programokkal analizáltuk, valamint mértük a sejtmentes zóna nagyságát. A centroszómák helyzetét sebzés hatására történő irányított migráció során (n=30 sejt/sejtvonal) anti-gamma-tubulin immuncitokémiával vizsgáltuk.

Eredmények: Mindkét csendesített sejtvonalban a 8 óra alatt megtett teljes út hossza, a kezdőponttól mért maximális távolsága, vektoriális távolsága, a sejtek átlagsebessége és maximális sebessége szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. A SDC4 csendesítés hatására az inszert eltávolítását követően a sejtmentes terület záródása csökkent a kontrollhoz képest. A csendesített sejtvonalak esetén a mozgás irányába mutató 30 fokos körcikkekbe eső centroszómák aránya szignifikánsan csökkent, jelezve polarizáció csökkenését.

Megbeszélés: Kutatásaink alapján a SDC4 csendesítése csökkenti a mioblasztok migrációját, illetve a SDC4 befolyásolja centroszómák pozícióját, ezáltal a sejtek polaritását. A SDC4 csendesített sejtekben megfigyelhető migrációs zavar hátterében így többek között a polaritás zavara állhat. Eredményeink hozzájárulhatnak ezen általános sejtbiológiai folyamatok molekuláris mechanizmusainak pontosabb megértéséhez.

Támogatók: GINOP 2.3.2-15- 2016-00040.
Richter Gedeon Nyrt.

Rövidítések jegyzéke:
SDC4 : Szindekán-4

VÉDŐOLTÁS ÉS AZ AUTOIMMUNITÁS KAPCSOLATA: PILOT STUDY EGY INFLUENZA VAKCINA ÉS A KRÓNIKUS RHEUMATOID ARTHRITIS KAPCSOLATÁRÓL EXPERIMENTÁLIS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Bombicz Mariann¹, Kurucz Andrea¹, Priksz Dániel¹, Varga Balázs¹, Szentesi Nikolett², Horváth Ádám², Helyes Zsuzsanna², Szilvássy Zoltán², Juhász Béla²

1Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debreceni Egyetem ÁOK,

2Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Pécsi Tudományegyetem ÁOK,

Bevezetés és célkitűzés. A nem infekciózus gyulladásoz ízületi kórképek leggyakoribb, és lefolyását tekintve, legsúlyosabb képviselője a rheumatoid arthritis (RA). Egyes kutatók szakirodalmi eredményekkel támasztják alá, hogy a különböző védőoltások tehető felelőssé, autoimmun folyamatok, köztük a RA fellángolásáért. Kutatásunk célja tehát a „3Fluart szuszpenziós injekció influenza vakcina” tesztelése volt, CFA-indukált krónikus arthritis patkány modellen.

Metodika. Lewis-patkányokat 6 csoportra osztottunk: CFA-előkezelte állatok: I: CFA Flu early; II: CFA Flu late; III: CFA; CFA-kezelés nélküli csoportok: IV: Flu early; V: Flu late; VI: Control. A gyulladás mértékének meghatározására Pletizmó méter segítségével mértük a lábterfogatot; Dinamikus plantáris észtezióméterrel a mechanikai fájdalom küszöböt a kísérlet 0., ., 4., 7., 11., 14., 18. és 21. napján, valamint *in vivo* mieloperoxidáz aktivitást illetve plazmafehérje extravazációt határoztunk meg a 2. és a 9. napon. Az állatokat a kísérlet 21. napján extermináltuk valamint exanguináltuk, a vérmintákat, a tibiotarzális ízületeket, valamint a szíveket további vizsgálatokra előkészítve eltároltuk.

Eredmények. A CFA kezelés hatására az állatok testsúlya jelentősen csökkent. Sem az ödémásodás mértékét, sem a fájdalomküszöböt nem befolyásolt a vakcina, ellenben a kezelés 9. napján szignifikánsan emelkedett az *in vivo* neutrofil MPO aktivitás mértéke mindkét vakcinával kezelt csoportban az alapvetően is emelkedett CFA csoporthoz képest.

Következtetések. Molekuláris szinten végbemenő változást tapasztaltunk, mely funkcionális mérésekkel még nem észlelhető, így célunk megismételni a kísérletet a megfelelő elemszám elérése, továbbá a már most látható különbségek realizálása, tisztázása céljából.

Tématámogatás. A prezentáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 számú projekt, illetve a 20428-3/2018/FEKUTSTRAT támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

CFA- komplett Freud-adjuváns, CFA Flu early- Oltóanyag korai beadás, CFA Flu late- Oltóanyag késői beadás, FLU- influenza vakcina, FLU early- Oltóanyag korai beadás, FLU late- Oltóanyag késői beadás, MPO- mieloperoxidáz

GYORS TRIPLEXELISA AZ MMR VAKCINA HATÁSOSságÁNAK
DETEKTÁLÁSÁRA / SZERONEGATIVITÁS KIMUTATÁSÁRA

Böröcz Katalin¹, Csizmadia Zsuzsanna¹, Markovics Ákos², Farkas Kornélia³, Najbauer József¹, Berki Tímea¹, Németh Péter¹

1 Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

2 Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Általános Fizikai és Kémiai Tanszék

3 Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Bioanalitikai Intézet

Magyarországon a kanyaró vírusfertőzés elleni feltételezett átoltottság 99% ugyan, de legutóbbi tanulmányaink rámutattak, hogy a 95%-os védettségi szint - mely a nyáj-immunitás kritériuma – hazánkban sem teljesül.

Célunk volt egy olyan triplex indirekt ELISA (IgG) teszt létrehozása, mely gyors, olcsó, és az MMR oltás mindhárom komponense (kanyaró, mumpsz és rubeola) elleni humorális ellenanyagszintről egyidejűleg információt szolgáltat. Jel-zaj aránya legyen kiváló, lehetővé téve így az alacsony méréstartományokban való megbízható detektálást; a szeronegatív minták kiszűrését.

Anonim klinikai reziduum szérumok közül 3523 mintát használtunk kanyaró-, 1736-ot mumpsz- és rubeola- ellenes ellenanyag mérésre. A natív, inaktivált patogének teljes antigén-készletével érzékenyített lemezeink tisztaságát rekombináns antigénnel érzékenyített lemezek ekvivalens eredményeivel igazoltuk vissza. A mérések automatizáltak; Siemens BEP 2000 Advance System automatákon futottak. Az eredmények kiértékelésére szolgáltak: MS Excel, OriginLab, IBM SPSS, RStudio. A referencia értékek meghatározása ROC analízis segítségével történt.

Eredményünk egy költséghatékony, könnyen automatizálható triplex tesztformátum lett, mellyel relatíve gyorsan; 3x 15 perc alatt egyszerre 24 minta kanyaró, mumpsz és rubeola ellenes ellenanyagszintjéről megbízható információt nyerhetünk. Esszénk a piacon elérhető tesztekkel összehangban van (ROC Area; kanyaró 0.92, mumpsz 0.95, rubeola 0.99). A natív és rekombináns érzékenyítések parallelitása megfelelő (R^2 Slopes; 0.92-0.99). Adataink szerint kereskedelmi forgalomban ilyen típusú hármas tesztformátum pillanatnyilag nem elérhető. A teszt nagyszámú mintán való kipróbálása során kitűnt, hogy mindhárom ellenanyagcsoport esetén még a kumulált klaszterek összesített szeronegativitása is meghaladja a nyáj-immunitás kiritériumaként 5%-ban maximált értéket, nem is beszélve az egyes vakcinálási csoportok közti jelentős különbségekről; alátámasztva esszénk továbbfejlesztésének létjogosultságát.

Rövidítések

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay, MMR –measles, mumps, rubella

ROC- receiver operating characteristic

ANTIOXIDÁNS MECHANIZMUSOK SZEREPE A KARDIOVASZKULÁRIS REMODELLINGBEN

Börzsei Denise¹, Szabó Renáta^{1,2}, Pósa Anikó^{1,2}, Hoffmann Alexandra³, Karácsonyi Zoltán⁴, Juhász Béla⁴, Amin Al-awar¹, Török Szilvia¹, Magyariné Berkó Anikó¹, Takács István¹, Kupai Krisztina¹, Varga Csaba¹

1SZTE, TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, GLP Toxikológiai Labor, Szeged

2 Szegedi Tudományegyetem, Interdiszciplináris Kiválósági Központ, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

3HR-Pharma Kft., Szeged, ⁴DE, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Debrecen

Számos kutatás alátámasztja, hogy a kardiovaszkuláris betegségek jobban manifesztálódnak a posztmenopauzális korú nőkben, mint az azonos korú férfiakban. Kutatásunk célja az ösztrogénhiány, valamint a magas zsír tartalmú étrend kardiovaszkuláris hatásainak, továbbá a fizikai aktivitás terápiás szerepének vizsgálata.

Kísérletünk során áloperált (SO) és ovariektomizált (OVX) nőstény Wistar patkányokat 4 hetes pihenést követően tréning (futóketrec), valamint étrend alapján alcsoportokra osztottuk: futó, nem futó, normál tápon és magas triglicerid tartalmú étrenden (HT) tartott állatok. 12 hetes kísérleti periódusunk után meghatároztuk a szív 64 kDa-s és 72 kDa- MMP-2 aktivitását, az I-es típusú kollagén, a TIMP-2 koncentrációját, a 3-NT és a GSH szintjét, valamint az infarktusos terület nagyságát.

OVX, valamint HT étrend hatására szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az I-es típusú kollagén szintjében, valamint az infarktusos terület nagyságában. Ezzel szemben a TIMP-2 koncentrációja, a 3-NT és a GSH szintje, valamint a 64 -és 72 kDa-s MMP-2 aktivitása nagymértékben lecsökkent. 12 hetes testmozgás hatására a 3-NT, GSH és TIMP-2 szintjében egyaránt szignifikáns növekedést tapasztaltunk, emelkedett az MMP-2 izoformáinak aktivitása, míg a kollagén felhalmozódás, valamint az infarktusos terület nagysága szignifikáns csökkenést mutatott.

Az ösztrogénhiány és a triglicerid-dús étrend hatással van a miokardiális extracelluláris mátrix homeosztázisára, melyet a kollagén felhalmozódása, továbbá az infarktusos terület nagysága is alátámaszt. A rendszeres testmozgás azonban, az MMP-2 enzim modulálásán keresztül részt vesz a kóros értékek normalizálásában.

Munkánk az EFOP-3.6.1-16-2016-00008 projekt keretein belül készült, továbbá a kutatást az Emberi Erőforrások Minisztériuma támogatta 20391-3/2018/FEKUSTRA.

3-NT: nitrotirozin, GSH: glutationHT: magas triglicerid tartalmú étrend, MMP-2: mátrix metalloproteáz-2, OVX: ovariektomizált, SO: áloperált, TIMP-2: szöveti metalloproteáz inhibitor

**A CONNEXIN43, MINT PREDIKTÍV ÉS PROGNOZTIKUS BIOMARKER
VIZSGÁLATA FEJ-NYAKI TUMOROKBAN**

Brauswetter Diána¹, Gurbi Bianka¹, Varga Attila¹, Gyulavári Pál¹, Péntes Kinga¹,
Murányi József¹, Dános Kornél²

1 MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport, Budapest

2 Semmelweis Egyetem, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Budapest

A fej-nyaki laphámrák (head and necksquamouscellcarcinoma, HNSCC) egy gyűjtőfogalom, amely magába foglalja a szájüreg, a garat és a gége ilyen típusú megbetegedéseit. Hazánkban a férfiak körében a negyedik leggyakoribb tumortípus, halálozást tekintve pedig a harmadik helyen áll. Jelenleg a fej-nyaki rákokat a HPV státusz, a p53 mutáció, a p16 és az EGFR expresszió alapján sorolják négy molekuláris osztályba.

A connexin43 (Cx43) a connexinek családjába tartozó fehérje, amely sejtkapcsoló stuktúrák (gapjunction, GJ) kialakításában vesz részt. Ezeknek a sejtkapcsoló struktúráknak a szomszédos sejtek közötti mechanikai kapcsolat és kommunikáció kialakításában van szerepük. Emellett GJ független tumorszuppresszor funkciójuk is régóta ismert. A Cx43 szabályozza a proliferációt, apoptózist és a differenciációt is. Fej-nyaki tumorokban prognosztikus marker, a fehérje magasabb expressziója jobb prognózissal társul.

Munkánk során célul tűztük ki a Cx43 expressziójának vizsgálatát és az fehérjeszint összefüggésének feltárását a daganat viselkedésével, taxán alapú kezelésre adott válaszával. Kutatásunk során vizsgálatainkat HPV-negatív fej-nyaki tumoros sejtvonalakon végeztük (Detroit 562, FaDu, SCC25). MTT módszer segítségével mértük a sejtproliferáció gátlását paclitaxel kezelés hatására. A sejtvonalak Cx43 expresszióját, valamint a paclitaxel hatását a fehérje expresszióra immuncitokémia és Western-blot módszerrel vizsgáltuk. A paclitaxel hatására bekövetkező apoptózist fluoreszcens áramlási citométerrel vizsgáltuk.

A vizsgált sejtvonalak közül az SCC25 a legérzékenyebb taxán alapú kezelésre, vagyis kisebb az IC₅₀ érték, valamint kisebb paclitaxel koncentrációnál tapasztalható apoptózis. Ez feltételezéseink szerint azzal magyarázható, hogy ebben a sejtvonalban a legtöbb a Cx43 fehérje mennyisége. Tehát a Cx43 magas expressziója paclitaxel kezelésre adott pozitívabb válasszal társul. Ennek jelentősége, hogy előre jelezheti a fej-nyaki daganatok esetében alkalmazott neoadjuváns taxán-alapú kezelés sikerét.

HNSCC - head and necksquamouscellcarcinoma, HPV – human papillomavirus, p53 - tumor protein p53, p16 - cyclin-dependentkinase inhibitor 2A, EGFR – epidermalgrowthfactor receptor, Cx43 – connexin43, MTT - 3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide, GJ- gapjunction

MŰGYANTÁS ÉRFELTÖLTÉSEN ALAPULÓ MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK
MÁJBAN ÉS TÜDŐBEN

Bugyik Edina¹, Dezső Katalin¹, Bárány Nándor¹, Nagy Péter¹, Paku Sándor¹,
1 Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A különböző szervek érrendszerének vizsgálatára a korróziós készítmények és a pásztázó elektronmikroszkópos technika ötvözésével rendkívüli részletességgel nyílt mód. Ezt elsősorban a normál érhalózat 3D struktúrájának elemzésére használták, de az érhalózat fejlődését, valamint különböző patológiás folyamatokban megváltozott vaszkulatúrát vizsgáló tanulmányok is fellelhetők.

Munkacsoportunkban a műgyantás érfeltöltést a máj posztnatális egyedfejlődés alatti és regeneratív növekedésének monitorozására, máj-, valamint tüdőmetasztázisok vérellátásának tanulmányozására állítottuk be. Vizsgálatainkhoz a máj érhalózatának egy vagy többszínű gyantával való feltöltését a portális véna, a centrális véna vagy a májartéria felől végeztük el. Tüdőmetasztázisok vérellátásának tanulmányozásához a pulmonális artéria és a bronchiális artéria felől töltöttük fel az érrendszert, valamint műgyantát juttattunk a tracheo-bronchiális rendszerbe is. A teljesség érdekében a vizsgálatokat immunhisztokémiai és scanningelektronmikroszkópos módszerrel is kiegészítettük.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy: 1. Patkánymájban az egyedfejlődés során a májlebenyek mérete és száma is nő. 2. A parciális hepatektómiát követő májregeneráció kizárólag a májlebenyek megnagyobbodásával valósul meg. 3. A máj kötőszövetes áttépülésének késői stádiumában megjelenő nodulusok mind humán, mind pedig patkány májakban a portális véna ágai mentén alakulnak ki. 4. Egérmájban a metasztázisok 2-2,5mm-es méret felett artériás vérellátásra tesznek szert. 5. A patkány tüdőben a metasztázisok 5 mm felett bronchiális artéria által ellátottak.

AZ ARHGAP25 HIÁNYA SZIGNIFIKÁNSAN CSÖKKENTI A KONTAKT
DERMATITISZ TÜNETEIT EGEREKBEN.

Czárán Domonkos, Pusztai Réka, Sasvári Péter, Ella Krisztina, Sűdy Ágnes, Aradi
Petra, Jakus Zoltán, Csépanyi-Kömi Roland

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

Bevezetés

A kontakt allergiás dermatitisz egy komplex, T-sejt mediáltagyulladásos bőrbetegség, melynek kialakulásához, a kontakt allergénnel való többszöri érintkezés szükséges.

A betegség érzékenyítési fázisában a természetes immunrendszer sejtjei, így a neutrofilgranulociták is kulcsszerepet játszanak. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a fehérvérsejt-specifikus ARHGAP25 az elemi fagocita funkciók szabályozás mellett a komplex, gyulladásos betegségek effektor fázisának is lényeges szereplője. Ezen fehérje szerepét ugyanakkor a fagocitákon kívül más fehérvérsejtekben még soha nem vizsgálták.

Jelen munkánk során így azt a kérdést tettük fel, hogy miként befolyásolja az ARHGAP25 a kontakt allergiás dermatitisz kialakulását / lefolyását.

Módszerek

Kísérleteinkhez olyan csontvelő-kiméra egereket használtunk, melyek hematopoetikus eredetű sejtjei ARHGAP25-hiányosak (KO kiméra), vagy vad típusúak (WT kiméra) minden más sejtjük vad típusú. A kontakt dermatitisz indukció céljából az azonos korú, hím egerek hasát a 0. napon 3%-os TNBC oldattal (ill. a kontroll csoport esetén acetonnal) kezeltük, majd az 5. napon 1%-os TNBC oldattal kezeltük mindkét csoport fülét. A gyulladás mértékét a fülvastagság mérésével, ill. szövettani metszeteken vizsgáltuk.

Eredmények

A kontroll csoportban, ahol nem történt érzékenyítés, az 1%-os TNCB kezelés csak kismértékű növekedést eredményezett a fülvastagságban, ugyanakkor a WT és KO kimérák között nem volt szignifikáns különbség. Ezzel szemben, ha 3%-os TNBC oldattal érzékenyítettük az állatokat, majd 1%-os TNCB oldattal kezeltük, a KO kimérákban szignifikánsan kisebb mértékű volt a gyulladásra jellemző fülvastagodás, a WT-hez képest.

Következtetések:

Eredményeink arra utalnak, hogy a hematopoetikus sejtekben kifejeződő ARHGAP25 szükséges a kontakt allergiás dermatitisz kialakulásához, hiányában a gyulladás mértéke szignifikánsan csökken.

Támogatás: OTKA FK128376

Rövidítések: WT: wildtype; KO: knockout; TNCB: 2-chloro-1,3,5-trinitrobenzene

**MONOTON NÖVEKVŐ MULTIMERGLIKOPROTEINAFM VIZSGÁLATA:
ELEKTROSZTATIKUS KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE**

Csányi Mária Csilla¹, Feller Tímea¹, Kellermayer Miklós¹, Hársfalvi Jolán¹
1 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A vérkeringés legnagyobb multimerглиkoproteinje, a von Willebrand faktor (VWF). A globuláris VWF érsérüléskor, nagy sebességgradiensű helyeken kinyúlik, kriptikus kötőhelyek válnak szabaddá a szubendoteliális kollagén pozitív- és a trombocita GPIIb₃ receptor negatív helyeihez való kötődésre, így közvetíti a trombocita adhéziót. Patológias esetben intakt endotélhez is közvetíti az adhéziót heparán szulfáthoz kötődve.

Célom atomi erő mikroszkóppal (AFM) vizsgálni, hogy különböző elektrosztatikus tulajdonságú felszínnekhez kötött VWmultimer morfológiája eltérő-e.

Módszer: plazma készítményből tisztítottam a VWF-t heparin affinitás kromatográfiával. 7,4 vagy 6,0 pH-jú PBS-sel 1 ng/ul-re hígított oldatából 10 ul-t cseppentettem negatív töltésű csillámpalára vagy pozitív töltésű poli-L-lizinnel (PLL) bevont csillámpalára. 1 percig inkubáltam, 18 MΩ*cm tisztaságú vízzel mostam, N₂-vel szárítottam. CypherAFM-mel, AR14 programmal, AC módban analizáltam a felszíneket.

A VWmultimer PLL felszínen gyöngyhalmaz, csillám felszínen a gyöngyosor struktúrát mutattak. A struktúrák (n~1000) alakját területük körterülethez viszonyított arányával (kör-arány) számszerűsítettem. Minél közelebb van egyhez a szám, a gyöngyhalmaz annál inkább kör területű. Minél közelebb van nullához a szám, a gyöngyosor annál fonálszerűbben terül el. Eredményeim táblázatba foglalva:

Kör-arány medián (IQD)	Csillámpala		PLL	
	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0
	0,48 (0,33-0,67)	0,51 (0,36-0,67)	0,60 (0,43-0,76)	0,66 (0,50-0,79)

Az AFM képek alapján a VWmultimer a negatívan töltött csillámpalán fonálszerű, míg a pozitív töltésű PLL-en inkább körszerű struktúrát vesz fel pH 7,4-en. Ismert, hogy a Golgiban (pH 6,0-on) a VWmultimer kompakt szerkezetű. Ilyen pH-jú oldatból a VWmultimer morfológiája csillámpalán hasonló a pH 7,4-en látszóhoz, míg PLL-en kompaktabb körszerű. Csillámpala és pH 7,4 megfelelőbb a multimer vizsgálatára.

VWF- von Willebrand faktor; AFM- atomi erő mikroszkóp; PLL- poli-L-lizin; PBS- foszfáttal puffereelt fiziológias sóoldat; IQD- interkvartilisdisztáns; GPIIb₃- glikoproteinIb₃ trombocita receptor

FOTOSZINTETIKUS REAKCIÓCENTRUM FEHÉRJE ORIENTÁLT FELÜLETI
KÖTÉSE

Csekő Richárd¹, Szabó Tibor^{1,2}, Nagy László¹

1 Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Fizikai és Informatikai Intézet,

2 MTA Atommagkutató Intézet,

Régóta fennálló probléma a biológiai rendszerek modern technológiába való integrálásának nehézsége. A hatékonyság és specifitás, ami ezeket jellemzi, igen értékes komponense lehetne számos rohamosan fejlődő ágazatnak. A Rhodobactersphaeroides bíborbaktérium fotoszintetikus membránjában található reakciócentrum (RC) fehérje a fényenergiát közel 100%-os hatásfokkal tudja hasznosítani, ennek számos előnye volna az optoelektronika, bioszenzorika, képalkotás területein.

Kutatásaink során ezt a RC fehérjét a baktériumból izolálva, majd szervesen hordozón immobilizálva vizsgáltuk. Érdeklődésünk középpontjában a fehérjeaktivitás fenntartása illetve a biológiai és mesterséges komponensek egymásra hatása állt. Korábbi eredményeink [1] alapján fontosnak ítéltük a fehérje orientációjának egyértelmű meghatározását a rendszer működésének megfelelő jellemzéséhez és optimalizálásához. A tisztított RC fehérjét kémiai kötéssel rögzítettük indium-ón-oxid félvezetővel (ITO) borított üveglap felületére. Az ITO felületet merkaptoszilánnal funkcionáltuk, azután az így felvitt SH csoportok segítségével kötöttük a RC fehérjét. Az így készült mintákat elektrokémiai cellában vizsgáltuk kinon és ferrocén jelenlétében. A helyes orientáció és a kívánt fehérje-hordozó kapcsolat létrehozásához szükségessé vált egy RC/citokróm komplex létrehozása, amit a citokrómon keresztül tudunk a felületre rögzíteni.

A méréseink során a RC fehérje fényreakciójának vizsgálatával elektrokémiai cellában bizonyítottuk, hogy a RC kívánt csoportjai blokkolhatók az N-etilmaleimiddel. A Drepper és mtsai. [2] által leírt módszer segítségével a RC fehérjét kémiai kötéssel rögzítettük a dokkolt állapotban lévő citokróm fehérjéhez. A reakcióelegyet oszlopkromatográfiával tisztítottuk. Az összekötés sikerességét illetve hatékonyságát UV-Vis spektroszkópia és kinetikai abszorpciómérés segítségével igazoltuk. A kapott eredmények alapján a komplex mutatja a RCfotoaktivitását is és a kémiailag kötött citokróm képes visszaredukálni a RC oxidálódott elsődleges bakterioklorofill donorját. Az így készült komplex működését a fent leírt módon ITO felületre rögzítve vizsgáltuk elektrokémiai cellában.

[1] Szabó et al. (2017) Sensingphotosynthetic herbicides in an electrochemical flow cell, PhotosynthRes 132: 127–134.

[2] Drepper et al. (1997) Cross-Linked ElectronTransferComplexbetweenCytochrome c2 and thePhotosyntheticReaction Center of Rhodobactersphaeroides, Biochemistry, 36: 1418-1427.

RC reakciócentrum; ITO indium-ón-oxid

A munka az EFOP-3.6.2-16-2017-00005 "Ultragyors fizikai folyamatok atomokban, molekulákban, nanoszerkezetekben és biológiai rendszerekben" projekt támogatásával készült.

A FOSZFORILÁCIÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ ARHGAP25 SEJTEN BELÜLI ELHELYEZKEDÉSÉRE ÉS MŰKÖDÉSÉRE

Csépányi-Kömi Roland, Szabó Balázs, Czárán Domonkos, Wisniewski Éva, Kovács Fanni, Pusztai Réka, Bahurek Enikő, Ligeti Erzsébet

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

Bevezetés: Az immunválasz sejtszintű szabályozásának kulcsszereplői a Rho családba tartozó kis G-fehérjék, így a Rac is. Működésük feltárása közelebb vihet a betegségek patomechanizmusának megértéséhez, és hatékonyabb terápia tervezéséhez. Munkacsoportunk korábban felfedezett egy GTPáz aktiváló fehérjét, az ARHGAP25-öt, melyről kimutattuk, hogy a Rac-ot szabályozza, és elengedhetetlen az elemi fagocita funkciók, valamint a komplex, gyulladással járó betegségek kialakulásában. A fentiekből következő kritikus lépés, hogy megértsük ezen fehérje szabályozódását. Jelen munkánk elsődleges célja megvizsgálni, hogy a foszforiláció miként befolyásolja az ARHGAP25 membránhoz való kötődést.

Módszerek: Olyan CFP-vel jelzett ARHGAP25 konstruktokat hoztunk létre, melyekben a korábban azonosított foszforilációs helyeket (S363, S379-380, S488) Alaninra mutáltuk. A konstruktokkaltranszfektált COS-7 sejtekben EGFstimulussal membránfodrozódást váltottunk ki, mely a Rac aktivációjának jelzője, és ezt, ill. az ARHGAP25 sejten belüli lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az ARHGAP25 aktivitását BRET módszerrel mértük.

Eredmények: Azt tapasztaltuk, hogy a pontmutációk nem befolyásolják jelentősen az ARHGAP25 sejten belüli elhelyezkedését: a fehérje nagyobb része citoplazmatikus, kisebb hányada membrán-lokalizációt mutat, és ko-lokalizál a filamentárisaktinnal.

Megfigyeltük továbbá, hogy a foszforiláció szignifikánsan csökkenti a GAP aktivitást in vitro. Ugyanakkor, az EGF-re bekövetkező membránfodrozódás gátlását, mely a vad típusú ARHGAP25-re jellemző, az S363A és S363AS488A mutációk csökkentik.

Következtetés: A foszforiláció csökkenti az ARHGAP25 GAP-aktivitását, azonban a membránhoz történő lokalizációt nem befolyásolja. Kísérleteink ugyanakkor felvetik annak lehetőségét, hogy az EGF-receptorból induló jelátvitelnek szerepe lehet az ARHGAP25 szabályozásában, melynek feltárása további kísérleteket igényel.

Támogatás: OTKA K108382; FK128376

Rövidítések: CFP: cián fluoreszcens protein; EGF: epidermális növekedési faktor; BRET: biolumineszcencia rezonancia energia transzfer; GAP: GTPáz aktiváló protein.

A PATIENT-DERIVED TUMOR XENOGRAFT, MINT AZ IN VIVO ÁLLATKÍSÉRLETI
RENDSZEREK ÚJ, FEJLETTEBB MODELLJEI

Cserepes T. Mihály^{1,2}, Hegedüs Zita², Ivan Randelovic^{1,2}, Dezső Katalin³, Kóbori László⁴, Kenessey István^{5,6}, Attila Kigyós¹, Tóvári József^{1,2}

1 KINETOLab Kft, Budapest

2 Kísérletes Farmakológiai Osztály, Országos Onkológiai Intézet, Budapest

3 I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

4 Transzplantációs és Sebészeti Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

5 2. sz. Patológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

6 Nemzeti Rákregiszter, Országos Onkológiai Intézet, Budapest

Hagyományosan in vitro sejtes vizsgálatok és in vivo allograft/xenograft modellek használata terjedt el a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy az in vitro növekvő sejtvonalakból származó tumorképzések drasztikusan különböznek a klinikai tumoroktól, az onkológiai állatmodellekben sikeres hatóanyagok mindössze 8%-a hatékony klinikai teszteken (1). A klinikai vizsgálatok idő- és költségigénye megköveteli a hatékonyabb preklinikai szűrési módszerek kidolgozását. A legelterjedtebb stratégiák a genetikailag módosított egértörzsek (GEMMs) spontán kialakuló tumorai, illetve a humán klinikai tumorból közvetlenül származó xenograftok (PDX). Állatházunk összesen tíz klinikai centrummal működik együtt, hogy a lehető legtöbb lokalizáció és tumortípus rendelkezésünkre álljon. A műtétet követően a tumor minta 5 percen belül fiziológiás sóoldatba, 60 percen belül pedig az állatházba kerül, ahol immunosuprimált állatokba való szubkután beoltásra kerül (1. nemzedék). A tumor növekedést követően a tumorszövet új állatba kerül átoltásra (2. nemzedék). A felnövő tumorképzések archiválásra kerülnek, később a 3. nemzedékben szaporításuk, 4-10. nemzedékekben kísérleti felhasználásuk valósul meg.

Archiváláskor további mintákat nyerünk genotipizálás, morfológiai, immunhisztokémiai vizsgálatok rutin elvégzéséhez. A molekuláris és szövettani adatok mellett fenotípusos információkat is gyűjtünk, így felhasználáskor kiválasztható a legalkalmasabb modell. Emellett a modelljeinkből in vitro sejtvonalakat is indítunk az eredmények összehasonlíthatósága érdekében. Célunk a nemzetközi trendhez igazodva egy minden gyakoribb szövettani, molekuláris és fenotípusos variációt lefedő tumorbank létrehozása, primer és áttéti tumorképzések gyűjtésével. Távlatos célunk a hatékony preklinikai szűrés megalapozása, a gyógyszerfejlesztés hatékonyabbá és olcsóbbá tétele. Jelenleg 35 modell alapításán vagyunk túl, ide értve tüdő-, vastagbél-, gyomor-, máj-, hólyag-, bőr-, és központi idegrendszeri daganatokat is. A közeli jövőben emlő-, prosztata-, pancreastumorképzések PDX alapítását tervezzük.

Rövidítések:

PDX: Patient-derived tumor xenograft

GEMM: Genetically engineered mouse model

Hivatkozott irodalom: 1: I Maketal. Am J Transl Res. 2014; 6(2): 114–118.

A fenti eredmények a KFI_16-1-2017-0439 sz. K + F pályázat támogatásával készültek.

A MÁJ ÉRHÁLÓZATÁNAK SZEREPE AZ ŐSSEJT-MEDIÁLT
MÁJREGENERÁCIÓBAN

Dezső Katalin¹, Bugyik Edina¹, Bárány Nándor¹, Nagy Péter¹, Paku Sándor¹
1 Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A máj közismerten kiváló regenerációs képességgel rendelkezik, tömege jelentős részének elvesztését is képesek pótolni a differenciált hepatociták. Ha a májsejtek olyan károsodást szenvednek, hogy nem képesek hatékonyan részt venni a regenerációban, aktiválódnak a Hering-csatornákban elhelyezkedő szomatikus őssejtek. Az őssejt-mediált májregeneráció az őssejtekből származó progenitorsejtek közvetítésével, az ezekből differenciálódó, kis hepatocitákból felépülő regenerációs fókuszokon keresztül valósul meg. Az őssejtek progenitorait patkánymájban ovális sejteknek, humán májban intermedier hepatobiliáris sejteknek nevezzük.

Az őssejt-mediált májregeneráció során kialakuló regenerációs fókuszok vaszkulaturáját fulmináns májelégtelenség miatt eltávolított humán májban és egy olyan patkány modellben vizsgáltuk ahol a hepatociták osztódása gátolt. Emiatt a májsejtek képtelenek reagálni a parciális hepatektómia által indukált proliferatívstimulusra, ezért a Hering csatornákat felépítő őssejtek aktiválódnak. Vizsgálati módszereink között szerepelt fluoreszcens immunhisztokémia, sorozatmetszetek 3D rekonstrukciója. A fókuszok vérellátásának vizsgálatához a patkánymáj vaszkulaturáját műgyantával töltöttük fel. A portális vénába kék színű műgyantát juttattunk, a centrális véna ágait piros színű műgyantával töltöttük fel. Eredményeink alapján mind patkánymájban, mind pedig a humán májban a regenerációs fókuszok a portális véna terminális ágai körül alakultak ki. A növekvő regenerációs fókuszok centrumában portális vénaágot, epeutat és májartéria ágot tartalmazó, komplett portális triászok voltak jelen. A centrális vénák a regenerációs fókuszokon kívül helyezkedtek el.

A portális triászokat tartalmazó regenerációs fókuszok a hatszögletű májlebenyke mintegy egyhatod részét teszik ki, így egyetlen centrális vénaág köré rendeződő, majd egymással fuzionáló fókuszokból regenerálódik a máj alapegysége, a klasszikus májlebenyke.

A DANTROLEN MOLEKULÁRIS HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

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

A RyR az izom SR membránjában található ioncsatorna, mely fiziológias körülmények között idegi ingerület hatására megnyílik és Ca^{2+} -t szabadít fel az SR-ből, ami kiváltja az izom összehúzódását. A megfelelő kezelés hiányában halálhoz vezető idioszinkrziás állapot, a MH-roham során azonban az arra genetikai okok miatt érzékeny RyR illékony altatószerek hatására ingerület hiányában is megnyílik és kontraktúrát okoz. A dantrolen az egyetlen RyR támadáspontú gátlószer, mely a MH-rohamokban klinikai alkalmazásba került, de a pontos hatásmechanizmusa ismeretlen. Ez az ellentmondás abból ered, hogy a dantrolen gátolja a Ca^{2+} -felszabadulást intakt vázizomrostból és izolált SRvezikulákból, de SR-ből tisztított RyR 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 gátló hatásához szükséges faktor a Mg^{2+} . Munkánk során ezen eredmények alátámasztását tűztük ki célul Ca^{2+} -felszabadulás mérésekkel és single-channel árammérésekkel, amelyek kivitelezéséhez nyúl vázizomból izolált SRvezikulákat és szolubilizáltRyR csatornákat használtunk. A Ca^{2+} -felszabadulás mérések alapján az látható, hogy a dantrolen és a Mg^{2+} önmagában is gátol, de együtt alkalmazva őket erősítik egymás gátló hatását. A gátlást a RyR agonista ATP koncentrációjának növelése tovább fokozza. A single-channel árammérések megerősítik a Ca^{2+} -felszabadulás mérések eredményeit, ugyanis 10 μM dantrolen ~50%-kal csökkenti a RyR nyitvatartási valószínűségét 3 mM Mg^{2+} és 1mM ATP jelenlétében, míg 2 mM-ra emelve az ATP koncentrációját ~20%-ra esik a csatorna aktivitása a kontrollhoz képest.

Eredményeink alátámasztják a dantrolen Mg^{2+} -függő gátló hatását RyR-on, kiegészítve azzal, hogy ATP is szükséges a gátlás erősítéséhez.

RyR: rianodin receptor, SR: szarkoplazmatikusretikulum, MH: Malignushyperthermia

ENYHE HŐSTRESSZ OKOZTA KORAI ESEMÉNYEK VIZSGÁLATA EMLŐS
SEJTEKBEN

Dukic Barbara¹, Tizslavicz Ádám¹, Gombos Imre¹, Begüm Peksel¹, Péter Mária¹,
Balogh Gábor¹, Horváth Ibolya¹, Vígh László¹, Török Zsolt¹

¹Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet,
Molekuláris Stresszbiológia Kutatócsoport

A sejtek környezeti változásokra adott válaszának, ill. alkalmazkodóképességének megértése rendkívüli jelentőséggel bír különösen patofiziológiás körülmények között. Csoportunk nemrég jellemezte az enyhe, lázszerű hősokk membránszerveződésre, valamint a hősokkfehérjék szintézisére és lokalizációjára gyakorolt hatásait. Ultraszenzitív fluoreszcencia mikroszkópia és lipidomika kombinációjával elsőként azonosítottuk az ún. „eustressz” tartomány molekuláris részleteit, melynek során az emlős sejtek termotoleranciája a hősokkfehérjék indukciója nélkül növekszik. Jelen munkában a termotoleranciáig vezető membránváltozások és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli események legelső lépéseinek felderítését tűztük ki célul. Emlős sejtvonalakon vizsgáltuk a különböző dózisú lázszerű hőkezelés vagy az azzal ekvivalens membránfluidizációt okozó benzilalkohol kezelés hatásait. A korábban azonosított stressztoleranciával összefüggő lipidomikai profil módosulás mélyebb feltárása céljából fluoreszcencia mikroszkópiával követtük a kezeléseket első másodperceiben megfigyelhető diglicerid szint, valamint a plazmamembrán és mitokondriális membrán potenciál változását. A membránpotenciál érzékeny próbákkal végzett mérések optimalizációja mellett beállítottunk és teszteltünk egy újonnan kifejlesztett, a diglicerid szintjének változására szelektív fluoreszcens próbát, ami lehetővé teszi a digliceridnek, mint ismert jelátviteli molekulának a időbeli monitorozását. A sejtszintű stresszválaszok korai eseményeinek feltérképezése közelebb vezethet bennünket a membránban lokalizált stressz-szenzor(ok) azonosításához és egyben új, membrán-lipidterápiás farmakológiai alkalmazások alapjául szolgálhat.

Támogatta: GINOP-2.3.2-15-2016-00001

AZ FSCPX (IRREVERZIBILIS A₁ADENOZIN RECEPTOR ANTAGONISTA) HATÁSA
A PITVARI KONTRAKTILITÁS A₁ADENOZINERG SZABÁLYOZÁSÁRA

Erdei Tamás¹, Lampé Nóra¹, Viczján Gábor¹, Zsuga Judit², Juhász Béla¹, Szilvássy Zoltán¹, Gesztelyi Rudolf¹

1 Debreceni Egyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2 Debreceni Egyetem, NK, Egészségügyi Menedzsment és Minőségirányítási
Tanszék

Egy adott sejttípuson levő, adott receptor ingerlésével kiváltható, adott hatásra vonatkozó receptor rezerv azt jelenti, hogy a receptorállomány egy bizonyos százalékának stimulálása a maximális hatás egy ennél nagyobb százalékának kiváltására képes. A receptor rezerv meghatározása nehéz rövid féléletidejű agonisták, pl. adenzin esetében. Noha az adenzin metabolizmusa könnyen gátolható (a meghatározáshoz szükséges koncentráció-hatás (E/c) görbékhez használt exogénadenzin eliminációjának lassítása érdekében), az endogén adenzin következményes felhalmozódása torzíja az eredményt. A probléma megoldására korábban közöltünk egy eljárást, amellyel ez a torzulás korrigálható. Az eljárás in silicovalidálása során azonban interakciót találtunk két anyag, az FSCPX (irreverzibilis A₁adenzin receptor antagonist) és az NBTI (nukleozid transzport gátló) között. Jelen munkánk célja ennek az interakciónak az ex vivo kimutatása volt. Izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvarokon kumulatív E/c görbéket vettünk fel adenzinnal és CPA-val (hosszú féléletidejű A₁adenzin receptor full agonista) natív körülmények között, továbbá NBTI, FSCPX, illetve e két szer együttes hatása alatt. Az endogén adenzin NBTI okozta felhalmozódásának torzító hatására az RRM (receptorial responsiveness method) segítségével korrigáltunk azon adenzin E/c görbék esetében, ahol NBTI is volt jelen. Eredményeink szerint az FSCPX az A₁adenzin receptoron kívül olyan molekulá(ka)t is befolyásol, mely(ek)nek szerepe van az NBTI adenzin-akkumuláló hatásának létrejöttében. A legegyszerűbb kölcsönhatást feltételezve az FSCPX gátolhatná az NBTI gátló hatását az ENT1 nukleozidtranszporterén, eredményeink azonban nem támogatják ezt a lehetőséget. Sokkal valószínűbb, hogy az FSCPX gátolja az extracelluláris adenzin termelésben részt vevő enzimek valamelyikét /az ekto-apiráz (CD39) vagy az ekto-5'-nukleotidáz (CD73)/. Ezáltal az FSCPX gátolhatja az endogén adenzin interstitialis felhalmozódását NBTI hatására anélkül, hogy befolyásolná az NBTI akkumuláló hatását az exogénadenzinra.

Témátámogatás: EFOP-3.6.2-16-2017-00015 (HU-MATHS-IN)

FSCPX: 8-cyclopentyl-N³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N¹-propylxanthine;

NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; CPA: N⁶-cyclopentyladenosine;

CD39 és CD73: lymphocytá felszíni „Cluster of Differentiation” molekulák

AMILOID B-PEPTID HATÁSA A FIBRINHÁLÓ SZERKEZETÉRE ÉS LÍZISÉRE

Feller Tímea, Hársfalvi Jolán, Csányi Csilla, Kiss Balázs és Kellermayer Miklós S.Z.
Simmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

Az Alzheimer kór neurodegeneratív betegség, melyben fontos vaszkuláris komponens is jelentkezik. Az agyi erekben nem csak a kórra jellemző amiloidpeptidek, hanem fibrinogén felhalmozódása is megfigyelhető. Amiloid jelenlétében a fibrinogénből kialakuló alvadék mechanikai és morfológiai tulajdonságai is megváltoznak, a kialakult fibrinháló lízise is gátlódik. Az emésztésnek ellenálló alvadék elzárja a véráram útját, gyulladást indukál és további neurovaszkuláris károsodáshoz vezet.

Az amiloid β -peptidneurotoxikusfragmense az A β 25-35. Ezen fragmensből csillámfelszínen epitaxiálisan növesztett amiloid szálakat állítottunk elő fibrinogén jelenlétében. Az amiloid szálak környezetében megfigyelhető a fibrinogén monomerek felhalmozódása.

Amiloid jelenlétében csillámfelszínen alvasztott fibrinháló mikrostruktúráját atomi erőmikroszkópiával (AFM) vizsgáltuk. A háromdimenziós hálóból egy kvázi kétdimenziós struktúrát hoztunk létre. Az egyedi szálak átlagos magasságát és szélességét vizsgáltuk, mely 20 μ Mamiloid jelenlétében szignifikánsan csökkent (magasság 18,0 nm (\pm 5,09 nm) 21,8 nm (\pm 5,47 nm) helyett, szélesség 122,7 nm (\pm 28,4 nm) 141,7 nm (\pm 32,5 nm) helyett).

Az alvadék mechanikai tulajdonságait a munkacsoportunk által kifejlesztett nanoreológiai méréssel, a nano-trombelasztográfiával (nTEG) vizsgáltuk. Amiloid jelenlétében az alvadás folyamán végig nagyobb maximális erőkülönbség értékeket mértünk. Ebből az egyedi fibrinszálak megnövekedett Young-modulusára következtethetünk.

Összességében amiloidpeptid jelenlétében kisebb szálakból felépülő fibrinháló alakul ki. A kisebb szálakra megnövekedett merevség jellemző, amit nTEG méréseink megnövekedett erőkülönbség-értékei alátámasztanak.

A MÁJ ELIMINÁCIÓS FUNKCIÓJÁ A p-NITROFENOL ÉS A METABOLITJAINAK AZ
INTESZTINÁLIS PERFÚZIÓJA SORÁN

Fischer Tamás 1, Almási Attila 2, BojcssevSztosan 1, Kovács Noémi-Piroska 3, Perjési
Pál 2, Fischer Emil 1

1 Pécsi Tudományegyetem ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet,
2 GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézet
3 Gyógyszertár Marosvásárhely

Ismert, hogy a farmakonok eliminációjában a májnak döntő szerepe van mind a vegyületek metabolizmusát, mind azok biliárisexkrécióját illetően. Az utóbbi időben azonban egyre több adat szól amellett, hogy a per os adott gyógyszerek esetén a béltraktus is jelentős szerepet játszhat az eliminációs folyamatokban. Saját korábbi vizsgálataink szerint például a p-nitrofenol /PNP/ intesztinális perfúziója során rövid idő alatt már megjelennek a bélben a metabolitok p-nitrofenolglukuronid /PNP-G/ és p-nitrofenol szulfát /PNP-S/ formájában.

Elméleti és gyakorlati szempontból, de metodikai aspektusból is fontos az a kérdés, hogy mi történik ezekkel a metabolitokkal, kiürülne-e a szervezetből a széklettel, vagy bejutnak a szisztémás keringésbe a felszívódásuk következtében.

Jelen kísérlet sorozatunkban a fenti kérdés vizsgálatára a PNPmetabolitjait helyeztük olyan izotóniás oldatba, amellyel az altatott patkányok vékonybelének egy in vivo izolált szakaszát perfundáltuk.

Egyidejűleg megkánuláltuk az állatok epevezetékét, ezen keresztül gyűjtöttük az epét, amelyben meghatároztuk a PNP, PNP-G és a PNP-S koncentrációját HPLC segítségével. Az így kapott adatok információt nyújtanak arról, hogy a metabolitok a vékonybélből eljutnak-e a májba, illetve, hogy ott mi történik velük.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy mind a PNP-G, mind a PNP-S intesztinális perfúziója során részben eltűnik a vékonybélből, illetve, hogy elérik ezek a metabolitok a májat. Érdekes továbbá, hogy a PNP-G perfúziója esetén a két metabolit nagyjából egyforma arányban jelenik meg az epében, továbbá, hogy ezeknél nagyobb mértékben exkretálódik maga az anyavegyület is az epével. A PNP-S lumenális perfúziójánál a PNPbiliárisexkréciója volt a legnagyobb mértékű, ezt követte a PNP-S, majd a PNP-G kiválasztódása az epével.

A fenti adatok arra utalnak, hogy a PNPmetabolitjai felszívódnak a vékonybélből és elérik a májat, ahol, további biotranszformációs lépések következtében az anyavegyülettel együtt kiválasztódnak az epével.

Rövidítések: PNP: p-Nitrofenol
PNP-G: p_Nitrofenolglukuronid
PNP-S: p-Nitrofenol szulfát

BERLINI KÉK NANORÉSZECSEPEGILÁLÁSI PROTOKOLLJÁNAK
KIDOLGOZÁSA ÉS TESZTELÉSE IN VIVO RENDSZERBEN FOBI SEGÍTSÉGÉVEL

Forgách László¹, Horváth Ildikó², Hegedűs Nikolett², Máthé Domokos^{2,3}, Szigeti Krisztián²

1 Gyógyszerésztudományi Kar, V. évfolyam, Semmelweis Egyetem, Budapest

2 Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

3 CROmedTranslational Research Centers, Budapest, Magyarország

A polietilén-glikol (PEG) egy széles körben alkalmazott polimer a nanotechnológiában. Ez a hidrofil, nem toxikus vegyület képes elrejteni a nanorendszert az immunsejtek elől, illetve sztérikusan stabilizálni őket, megakadályozva ezzel az idő előtti kiürülésüket a szervezetből. Munkám során célul tűztem ki egy ismert berlini kék alapú nanorészecske (PBNP) pegilálási protokolljának kidolgozását (reprodukálható mérettel és alacsony PDI-vel). Különböző molekulatömegű polietilén glikol-polimereket használva vizsgáltam a részecskék in vitro viselkedését. A berlini kék nanorészecske fluoreszcens jelölését (metilénkék) követően pedig in vivo követtem nyomon a beadott nanorendszert az élő szervezetben. A biokompatibilis felszínnel rendelkező nanorészecskék a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet által korábban kifejlesztett egylépéses szintézismódszerrel készültek [1, 2]. Ezt követően crosslinker alkalmazásával különböző molekulatömegű (3000 g/mol, 6000 g/mol, 8000 g/mol) PEG polimereket kapcsoltam a részecskéhez. A rendszer diszperzitás fokát és stabilitását 4 hetes időtartamban követtem DLS berendezés segítségével. A metilénkéssel történő fluoreszcens jelölésre ezt követően került sor. A minta diszperzitását és stabilitását további 4 héten át követtem. Az in vivo fluoreszcens képalkotást FOBI készülékkel végeztem. Vizsgáltam a szöveti biodisztribúciót ex vivo adatok felhasználásával. A PEG 6000-rel kapcsolva a PBNP-t alacsony PDI-vel jellemezhető rendszert sikerült létrehoznom, mely a vizsgált időtartamban stabilnak bizonyult. A fluoreszcensen jelölt mintát egér szervezetébe juttatva a nanorészecskék azonnal megjelentek a májban, bélben, illetve a kiválasztó szervrendszerben. Ezt követően ex vivo mérések során meghatároztam a minta szervek közti százalékos eloszlását. Összességében elmondható, hogy sikeresen kidolgoztam egy pegilálási és fluoreszcens jelzési protokollt berlini kék nanorészecskére, mely által egy ún. stealthliposzómás, in vivo és ex vivo optikai képalkotásra alkalmas nanorendszert állítottam elő.

Irodalom:

1. Máthé D, Szigeti K. Prussianbluebasednanoparticleasmultimodalimagingcontrastmaterial. International Patent No. PCT/HU2012/000010 (2012).
2. Prussianbluenanoparticles and itsanaloguesasnew-generation T1-weighted contrastagentsforcellularimaging; MohammadrezaShokouhimehr; 2010 Kent State University, PhD munka

Rövidítések:

FOBI: FluorescencelabeledOrganismBioimagingInstrumentPDI: polidiszperzitás index

BERLINI KÉK ALAPÚ T1 MRI KONTRASZTANYAG FEJLESZTÉSE ÉS
TESZTELÉSE IN VITRO- ÉS ÁLLATMODELLBEN

Forgách László¹, Horváth Ildikó², Hegedűs Nikolett², Máthé Domokos^{2,3}, Szigeti Krisztián²

1 Gyógyszerésztudományi Kar, V. évfolyam, Semmelweis Egyetem, Budapest

2 Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

3 CROmedTranslational Research Centers, Budapest, Magyarország

Vastartalmú nanorészecskéket régóta kutatnak szuperparamágneses tulajdonságuk miatt. Ezek T2 MRI kontrasztanyagok, melyek negatív kontrasztanyagok, sötétedést váltanak ki a szövetben. E tulajdonságuk nehézkessé teszi az endokrin rendszer tumoros elváltozásainak diagnosztikáját. Jelenleg erre célra Gd és Mn tartalmú anyagok vannak forgalomban, melyekről azonban ismert, hogy felléphetnek toxikus mellékhatásaik.

Munkám során célul tűztem ki egy berlini-kék (PBNP) alapú MRI kontrasztanyag kifejlesztését, valamint in vitro és in vivo vizsgálatát egér modellben. A szintézishez PBNP-AC, illetve PBNP-HCl berlini kék nanorészecskéket használtam fel különböző arányokban. A rendszer diszperzitás fokát és stabilitását DLS berendezés segítségével ellenőriztem. In vitro MRI mérések során mintáim T1 és T2 kontraszt képző tulajdonságát a klinikumban széles körben használt kontrasztanyagokhoz, valamint Salsolhoz hasonlítottam. Ezt követően in vivo kísérletemben már csak az optimális relaxációs idővel rendelkező mintát használtam. Az előállított rendszer stabilitását 6 hetes intervallumban vizsgáltam. In vitro MRI felvételeken jól látható a különböző koncentrációjú minták által eredményezett jelintenzitás változás. Kiértékelve a kapott T1 és T2 súlyozott szignál intenzitás görbéket, a PBNP-AC:PBNP-HCl 1:2 arányú minta jelintenzitása volt a legmegfelelőbb a további in vivo méréshez. A kontrasztanyag intravénás beadását követően vizsgáltam a nanorészecskébiodisztribúcióját az egér szervezetében, melynek során az említett minta erőteljes jel intenzitás növekedést eredményezett T1-súlyozott képeken, míg T2-súlyozott felvételeken csökkent jelintenzitás volt tapasztalható az érrendszerben a környező szövetekhez képest. Összességében elmondható, hogy sikeresen kifejlesztettem és teszteltem egy berlini-kék alapú nanorendszert, mely alkalmas kontrasztanyagnak bizonyult in vivo MRI képek készítésére. Tekintve a nanorendszer korábban már kidolgozott fluoreszcens jelzését, illetve pegilálási protokollját, elmondható, hogy képalkotó diagnosztikai szempontból hatalmas innovációs potenciállal bírhat a bemutatott vegyület.

Irodalom:

Máthé D, Szigeti K. Prussianbluebasednanoparticleasmultimodalimagingcontrastmaterial. International Patent No. PCT/HU2012/000010 (2012).

Szigeti K. et al (2018). ThalliumLabeledCitrate-

CoatedPrussianBlueNanoparticlesasPotentialImagingAgent. Contrast Media Mol Imaging, 2018, 2023604.

Rövidítések:

PBNP-AC: Biokompatibilis felszínnel rendelkező berlini kék nanorészecskék MRI: Mágneses rezonancia képalkotás PBNP-HCl: Burok nélküli berlini kék nanorészecskék, DLS: Dinamikus fényszórás mérés

MEK, MINT POTENCIÁLIS INDIREKT CÉLPONT VIZSGÁLATA FEJ-NYAKI
TUMOROK IN VITRO MODELLJÉBEN

Gurbi Bianka¹, Brauswetter Diána¹
1 MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport, Budapest

A Ras/Raf/MEK/ERK jelátviteli útvonal a sejtek proliferációjának, túlélésének, migrációjának és differenciációjának szabályozásában vesz részt. Klinikai relevanciája fej-nyaki tumorokban a KRAS G12C és a BRAF G464R/G469R mutációnak lehet, bár egyik sem túl gyakori. Vizsgálatuk mégis fontos lehet, mivel jelenlétük EGFR inhibitorokkal szembeni rezisztenciát okoz.

Mivel a Ras/Raf/MEK/ERK útvonal tagjai közül az első kettő génjei gyakran mutálódnak ugyan, azonban eddig nem találtak megfelelő gátlószert, így logikus lépés, hogy az útvonalat az ezek alatt szerepelő fehérjék gátlásával inaktiválják. Ezt általában MEK inhibitorokkal teszik. Több MEK-gátlót is sikeresen alkalmaztak az utóbbi években különböző daganat típusoknál. Ezek közül kiemelkedően teljesít a trametinib, a selumetinib és a PD-0325901.

Munkánk során célul tűztük ki a potenciális terápiás célpontok azonosítását és gátlásuk vizsgálatát fej-nyaki tumoros sejtvonalakon, ezáltal modellezve a személyre szabott daganatterápia lehetőségeit.

Kutatásunk során vizsgálatainkat HPV-negatív fej-nyaki tumoros sejtvonalakon végeztük, amelyek a Detroit 562 (pharynx), a FaDu (hypopharynx) és az SCC25 (lingua) sejtvonalak voltak. MTT módszer segítségével mértük a sejtproliferáció gátlását különböző jelátviteli útvonalon, melyek közül behatóbban a MEK-gátlókkal foglalkoztunk. A sejtvonalak fehérjeexpressziós profilját és a gátlószerek hatását a különböző jelátviteli útvonalakra Western-blot analízissel vizsgáltuk.

Vizsgálatunk során jelentős eltérést tapasztaltunk a különböző daganatsejtvonalak gátlószerek iránti érzékenysége tekintetében. A MEK-gátlószerekre az SCC25 sejtvonal volt a legérzékenyebb. Ez vizsgálataink alapján azzal magyarázható, hogy ebben a sejtvonalban nem érvényesül a MEK gátlás hatására bekövetkező Akt aktiváció.

Feltételezésünk szerint az ERK gátlásakor bekövetkező EGFR aktiváció és ezáltal az Akt fokozott aktivitásának megjelenése nem az EGFR fokozott mennyiségével, hanem az EGFR Y1068 oldalláncának aktivitásával van összefüggésben.

Ras – ratsarcoma protein, Raf – mitogenactivated protein kinasekinase, MEK - mitogenactivated protein kinasekinase, ERK - mitogenactivated protein kinase, EGFR – epidermal growth factor receptor, MTT - 3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide

GLIKÁLT KOLLAGÉN FIBRILLUMOK ATOMIERŐ-MIKROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

Haluszka Dóra, Hársfalvi Jolán, Kellermayer Miklós

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A biológiai szövetekben az I-es típusú kollagén a leggyakoribb szerkezeti fehérje, az extracelluláris mátrix legfőbb építőköve. Különösen nagy mennyiségben fordul elő a bőrben, csontokban, inakban és az erek falában. Szerkezetére hierarchikus felépítés jellemző. Átalánosságban a kollagének tropokollagén alegységekből épülnek fel, amelyekből három egymás köré csavarodva tripla helikális konformációt vesz fel, és ezek összetettebb szerkezetű rostokat hoznak létre. Munkánk során egy gyakori, a kollagén szerkezeti deformációját okozó patofiziológiai folyamatra, a glikációra fókuszálunk. A glikációnemenzimatis, több lépésben zajló, végül irreverzibilissé váló folyamat, amely a redukáló cukrok (glükóz, fruktóz, ribóz) és fehérjék aminocsoportjai között játszódik le, majd előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) képződéséhez vezet. Korábbi kísérletünkben a másodharmonikus keltés módszerével (SHG) igazoltuk, hogy a szöveti glikáció a kollagén rostok degradációját okozza, azonban rejtve maradt, hogy a glikáció befolyásolja-e a kollagénszálak szerkezetét és mechanikai tulajdonságait. Kísérleteinkben humán placentából izolált I-es típusú kollagén fibrillumok glikációját vizsgáltuk atomierő-mikroszkópiával (AFM). A glikációt 0,5 M ribóz oldattal indukáltuk 37 C°-on 5, 10 és 15 napon keresztül. Az egyedi fibrillumok topológiai szerkezetének vizsgálatát az AFMnonkontakt módjában végeztük, majd az egyedi szálak rugalmassági modulusát nanoindentációs erőgörbék felvételével határoztuk meg. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a hiperglikémiás körülmények a kollagén fibrillumok szerkezeti változásához vezetnek, valamint az egyedi szálak rugalmassági modulus értékeinek szignifikáns növekedését tapasztaltuk.

AGE: advanced glycated end-products, előrehaladott glikációs végtermék

SHG: second harmonic generation, másodharmonikus keltés

AFM: atomierő-mikroszkóp

AUTOANTITESTEK DIAGNOSZTIKUS JELENTŐSÉGE AZ IDEGRENDSZER
AUTOIMMUN IONCSATORNA BETEGSÉGEIBEN

Hayden Zsófia¹, Csizmadia Zsuzsanna¹, Böröcz Katalin¹, Balogh Péter¹,
Berki Tímea¹

¹ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai
Intézet, Pécs

Folyamatosan bővül azon neurológiai kórképek száma, melyek kialakulásáért a központi vagy a perifériás idegrendszer ioncsatornáit elleni autoantitestek képződése felelős. A klasszikus autoimmun ioncsatorna betegségek (myastheniagravis, neuromyelitisoptica) mellett az utóbbi évtizedben kerültek leírásra a központi idegrendszert érintő ioncsatorna betegségek (autoimmun encephalitisek). Az autoantitestek patológiás szerepének megismerése a különböző szindrómákban, valamint ezzel egyidejűleg a molekuláris biológiai módszerek fejlődése (célantigének tisztítása, érintett struktúrák génjeinek pontos feltérképezése) tette lehetővé a laboratóriumunkban alkalmazott diagnosztikai eljárások kifejlesztését.

Myastheniagravis esetén a motoros idegvégződéseken található receptorok, illetve fehérjék (kb. 80%-ban az AchR és 8%-ban MuSK) elleni autoantitestek a neuromuszkuláris transzmisszió gátlása révén izomműködési zavart okoznak az érintett betegekben. Az antitestek detektálását rekombináns AchR és MuSK fehérjéket tartalmazó indirekt ELISA módszerrel végezzük.

Neuromyelitisoptica esetén az autoantitestek a központi idegrendszer fő vízcsatornája, az AQP4 ellen irányulnak és elsősorban a célantigént legnagyobb mértékben expresszáló astrocytákat károsítják. A gyulladás az oligodendrocitákat is érinti, mely demyelinizációhoz vezet. A betegek egy részében nem mutatható ki az anti-AQP4 ellenanyagok jelenléte, azonban anti-MOG antitestek detektálhatók. Az antitestek kimutatását az AQP4 és a MOG génjeivel transzfektált sejt-alapú indirekt immunfluoreszcens BIOCHIP esszével végezzük.

Autoimmun encephalitis esetén az ellenanyagok a neuronális sejt felszíni receptorok (NMDAR, GABA_BR, AMPAR1, AMPAR2), illetve ezek asszociált fehérjéi (LGI1, Caspr2) ellen képződnek. Az autoantitestek az antigének extracelluláris epitópjához kötődve eltérő mechanizmussal reverzibilis neuron károsodáshoz vezetnek: NMDAR ellenanyagok receptor internalizációt okoznak, LGI1 elleni autoantitestek fehérje-fehérje interakció gátlása révén, GABA_BR elleni antitestek funkcionális gátlás által. Az antitestek detektálása szintén a 6 féle receptor, illetve fehérje génjeivel transzfektált sejt-alapú indirekt immunfluoreszcens BIOCHIP esszével történik.

Rövidítések:

AchR= acetilkolin receptor

MuSK= izomspecifikus kináz

AQP4= aquaporin 4

MOG= myelinoligodendrocytaglikoprotein

NMDAR= N-metil-D-aszpartát-receptor

GABA_BR= gamma-aminovajsav-receptor

AMPA1,2= 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav receptor 1,2

LGI1= leucinban gazdag gliomainaktivált fehérje-1

Caspr2= kontaktin-asszociált fehérje-2

BRAF SZEREPE AZ ENDOTÉL SEJTEK MECHANIKÁJÁBAN

Hollósi Anna¹, Pászty Katalin¹, Debreczeni Márta², Cervenak László², Kellermayer Miklós¹, Manuela Baccarini³, Guillaume Charras⁴, Varga Andrea¹

1 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

2 Semmelweis Egyetem, III. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

3 Bécsi Egyetem, Max. F. Perutz Laboratories

4 Londoni Nanotechnológiai Központ, London

A vérerek falát alkotó endotél sejtek számos módon hozzájárulnak a tumorok fenntartásához. A tumor metasztázis képzése során a véráramba bekerülő tumorsejtek az endotél sejt-sejt kapcsolatok megbontásával jutnak el a metasztázis képzés helyére. E folyamat molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert. Korábbi, endotél BRAF knockout egerekkel végzett kísérleteink rámutattak e fehérje endotél sejt-sejt kapcsolatok dinamikájában betöltött szerepére: BRAF hiányában a sejt-kapcsolatok megerősödnek, amely együtt jár a permeabilitás csökkenésével, valamint a melanoma sejtek kisebb mértékű transzmigrációjával *in vitro* és extravazációjával *in vivo*. Az endotél sejtek nemcsak biokémiai, hanem mechanikai hatásoknak is kitéttek. A rákos sejtek áthaladását az érfalon az endotél sejtek sejt-felszíni adhéziós molekulái érzékelik és ez specifikus biológiai választ vált ki bennük. Kutatásunk során célul tűztük ki az endotél sejtek különböző nagyságú mechanikai erők által kiváltott biológiai válaszáinak jellemzését. Célunk megvalósításához egy speciális módszert alkalmazunk, amely lehetővé teszi az endotél sejtréteg megnyújtását. A sejtréteg megnyújtása hatására bekövetkező aktin citoszkeleton átrendeződésével járó folyamatok jellemzésére a cofilin és a miozin könnyű lánc foszforilációjának megváltozását követtük a sejtréteg 20 és 30%-os megnyújtásánál. Aktin és miozin könnyű lánc fluoreszcens jelölésével valós időben is követtük a megnyújtás hatására bekövetkező lokalizációs változásokat. A kísérleteket elvégeztük BRAF csendesített sejtrétegen is. Eredményeink alapján a miozin könnyű lánc foszforilációja már kisebb megnyúlásoknál bekövetkezik, míg a cofilin foszforilációja csak nagyobb mértékű megnyúlásnál növekszik jelentős mértékben. Megnyújtás hatására az aktin és a miozin könnyű lánc átrendeződése következik be, amely a megfeszülő sejt-sejt kapcsolatok stabilizálását célozza.

A MITOKONDRIÁLISCIKLOFILIN D HIÁNYA VÉD A BÉTA-AMILOID
SEJTKÁROSÍTÓ HATÁSAIVAL SZEMBEN

Horváth Mátyás¹, Sváb Gergely¹, Horváth Gergő¹, Tretter László¹

¹Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézet

Az Alzheimer-kór a központi idegrendszer degeneratív megbetegedése, amit a béta-amiloid (A β) és a tau fehérjék felhalmozódása jellemez. A betegség kezdetén megjelenő A β károsítja a mitokondriumok működését, ami sejtek bioenergetikájának romlását eredményezi. Kísérleteink során a ciklofilin D fehérje kiütésének központi idegrendszeri bioenergetikára gyakorolt hatását vizsgáltuk A β -t termelő egérmodellben.

Vizsgálatainkban négy különböző genotípusú egeret (vad törzs, Alz (Alzheimer-kór egérmodell, ami mutáns APP és mutáns PSEN1 géneket tartalmazott), CypD-KO (ciklofilin D génkiütött) és Alz/CypD-KO) használtunk.

Előzetes eredményeink szerint a ciklofilin D hiánya fokozta az agyból izolált mitokondriumok oxigénfogyasztását. Jelen kutatásunkban célul tűztük ki, hogy a génmódosított egerekben tanulmányozzuk az ATP szintézis, Ca²⁺-homeosztázis, valamint a mitokondriális légzési lánc komplexek, illetve az α -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex (α KGDH) működésének változásait.

A mitokondriumok ATP-szintézisét kapcsolt enzimreakcióval, online spektrofotometriás módszerrel követtük. A Ca²⁺-felvételt CalciumGreenTM fluoreszcens festékkel mértük, a mitokondriális enzimek aktivitását spektrofotometriás módszerrel detektáltuk. Módszereink kvantitatív eredmények levonására alkalmasak.

Eredményeink szignifikáns különbségeket mutattak az állatmodellek között. A mitokondriális enzimaktivitások vizsgálata során csökkent egyes légzési lánc komplexek (I, II), illetve az α KGDH aktivitása az Alzheimer fenotípusú egerek mitokondriumaiban, amihez csökkent ATP-termelés párosult. Az Alz/CypD-KO egerek enzim aktivitás értékei nem változtak a kontroll csoportéhoz képest. Az A β -t tartalmazó mitokondriumok Ca²⁺-felvétele csökkent, amin a ciklofilin D fehérje kiütése javított.

Az in vitro mitokondriális vizsgálatokból arra következtethetünk, hogy az Alzheimer-kór egérmodellben károsodott a mitokondriumok működése, viszont a CypD fehérje hiánya javította a bioenergetikai funkciókat. A vizsgálat alapján elmondható, hogy a jövőben a CypD akár potenciális gyógyszercélpont lehet a neurodegeneratív betegségekben.

Rövidítésjegyzék:

A β – béta-amiloid

Alz – Alzheimer-kór egérmodell

APP – amiloidprekursor protein gén

PSEN1 – preszenilin 1 gén

CypD – ciklofilin D

CypD-KO – ciklofilin D gén kiütött egérmodell

Alz/CypD-KO – Alzheimer-kóros és ciklofilin D gén kiütött egérmodell

ATP – adenzin-trifoszfát

α KGDH - α -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex

EFFECT OF GNRH-III PEPTIDE-DRUGBIO-CONJUGATES ON TUMOR GROWTH
IN VITRO AND IN VIVO

Ivan Randelovic^{1,3*}, Sabine Schuster⁴, Bence Kapuvári², Gábor Mező⁴, József Tóvári¹

1 Department of Experimental Pharmacology

2 Department of Biochemistry, National Institute of Oncology, Budapest,

3 KINETO Lab Ltd. Budapest

4 Eötvös Loránd University, MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry,
Budapest

* e-mail: ivan.randel@gmail.com

Peptide based drug tumor targeting is a promising therapeutic approach for cancer, developed for the specific delivery of anticancer drugs, based on the discovery that receptors for many regulatory peptides are overexpressed in tumor cells, compared with their expression in normal tissues. Peptides can be used as drug carriers and targeting moieties that have increased selectivity to tumor and decreased side effects. Among various homing devices, gonadotropin-releasing hormone-III (GnRH-III) peptide represents a suitable targeting moiety, and GnRH-III bio-conjugates have been developed as drug delivery systems [1]. Previously it was shown that GnRH-III [⁴Lys(Bu)], [⁸Lys(Dau=Aoa)] peptide-drug bio-conjugate (1) had in vivo antitumor effect on orthotopically developed HT-29 colon tumor [2]. Here is reported antitumor activity of novel GnRH-III [²ΔHis], [³D-Tic], [⁴Lys(Bu)], [⁸Lys(Dau=Aoa)] peptide-drug bio-conjugate (2) containing the anticancer drug daunorubicin attached via an oxime bond to GnRH-III sequence where His is deleted, and Trp changed for D-Tic. It was evaluated mRNA, protein and cell surface GnRH receptor level of expression on several cancer cell lines and normal fibroblast, as well as cellular uptake of bio-conjugates. The in vitro cytotoxic effect of the bio-conjugates was determined on several cancer cell lines with different origin demonstrating high cytotoxic activity of novel peptide (2) in comparison with peptide (1) against cancer cells, where cancer cell lines highly expressing GnRH-R showed better response, over normal fibroblasts. In vivo tumor growth inhibitory and anti-metastasis effect of two bio-conjugates was evaluated on orthotopically developed 4T1 (mouse breast cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer), and HT-29 (human colon carcinoma) tumor bearing mouse models.

Acknowledgement: We thank the European Commission (Marie Skłodowska-Curie ITN MAGIC BULLET 642004) for PhD fellowships (to I.R. and S.S.) and financial support.

[1] Mező G, Manea M., Exp. Opin. Drug Deliv. 2011. 7. 79-96.

[2] Kapuvári B, et al., Invest. New. Drugs. 2016. 34. 416-423.

RÖVID IDEJŰ CUPRIZONE KEZELÉS HATÁSA A VASANYAGCSERÉRE
SCLEROSIS MULTIPLEX EGÉRMODELLBEN

Jánosa Gergely¹, Pandur Edina¹, Pap Ramóna¹, Sipos Katalin¹

¹Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Biológiai Tanszék, Pécs

Bevezetés: A cuprizone egy rézkelátor, amely a központi idegrendszerben többek között a corpus callosum demielinizációját okozza. Cuprizone kezeléssel egér modelleket hozhatunk létre, melyek segítenek megérteni a nem autoimmun mediált demielinizáció által kialakított neurodegeneratív betegségek mögött meghúzódó komplex biológiai folyamatokat. Számos neurológiai rendellenesség, mint például az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór vagy a Sclerosis Multiplex, kapcsolatban áll az agy vas homeosztázisának változásával. A szervezet vas háztartásának fő szabályozója a máj, ám az agy számos vasreguláló mechanizmus és specifikus útvonalak terén hasonlóságot mutat, ezért néhány vasmoduláló fehérje hiánya betekintést enged az agy vas háztartásának szabályozásába.

Célkitűzés: Jelen tanulmányban célunk volt meghatározni a rövid idejű cuprizone kezelés indukálta változásokat.

Anyag és módszer: Vizsgálatunk során C57BL/6 egereket használtunk, melyeket 3 csoportba osztottunk. Az első, vagyis a kontroll csoport normál tápot kapott, a második csoport 0.2% cuprizone tartalmú tápot fogyasztott 8 napig, míg az utolsó csoport ugyanezt a tápot 2 napig kapta. Érzéstelenítéses túlaltatás után kivezetésre került a máj, illetve az agy, melyekből a továbbiakban a corpus callosum lett izolálva. A mintákból RNS izolálás után valós idejű kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk a génexpressziós változásokat.

Eredmények: A corpus callosum-ban az axon növekedését irányító RMGA, illetve receptorának (neogenin) mRNS expressziója jelentős mértékben csökkent a kezelés időtartamának előrehaladtával. A májban a vasanyagcserét befolyásoló RGMcligand, másnéven hemojuvelin, mRNS expressziója nagymértékben növekedett. A fő vasanyagcsere szabályozó hormonnak, a hepcidinnek szérumban mért koncentrációja a kezeléseket követően drasztikusan emelkedett.

Következtetés: Már rövid időtartamú cuprizone kezelés esetén is változásokat indukálhatunk a vasmetabolizmusban, illetve a kezelés a vasanyagcserét nemcsak lokálisan, hanem szisztémásan is befolyásolta.

Rövidítések: C57BL/6: beltenyésztett laboratóriumi egér törzs, RNS: ribonukleinsav, PCR: polimeráz láncreakció, RGMa: repulsive guidance molecule A, RGMc: repulsive guidance molecule C, mRNS: hírvívő ribonukleinsav

APPA FUNKCIONÁLIS DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA TRIPTOFÁN-ANALÓGOT TARTALMAZÓ MUTÁNSON VÉGZETT FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIAI ELJÁRÁSOK SEGÍTSÉGÉVEL

Karádi Kristóf, Kapronczai Róbert, SofiaKapetanaki, Pécsi Ildikó, Fekete Zsuzsanna, Lukács András

Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs

A természetben közel kétszáz flavoprotein létezik, amelyeknek funkciója nagyon változatos. Ezek közül csak három olyan fehérjecsald – BLUF domén fehérjék, a fotoliáz fehérjecsald és a LOV domén fehérjék - létezik, amelyek esetében az enzim funkciója a fény hatására következik be. A BLUF (BluelightsensingusingFAD) domén fehérjék esetében fehérje működése a kék foton abszorpcióját követő strukturális változások határozzák meg. Az abszorpciót követő 1 nanoszekundumon belül kerül sor a FAD-ot körülvevő hidrogén kötés hálózat átrendeződésére, egyúttal a fehérje szignalling (vagy világos) állapotának létrejöttére.

Munkánk során az egyik legismertebb BLUF domén fehérjében a *Rhodobactersphareoids* nevű baktériumban található AppA nevű fehérjében végbemenő strukturális változásokat vizsgáltuk fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek segítségével.

Az AppA-ról készített röntgenkrisztallográfiás szerkezetek eltérést mutattak a FAD-hoz közel elhelyezkedő W104-es triptofán pozíciójában a fehérje sötét és világos állapotában. Tekintettel arra, hogy a különböző csoportok által készített röntgenkrisztallográfiás szerkezetek nem egyeznek abban, hogy a fotoaktiváció során hogyan mozdul el az említett triptofán, FRET, anizotrópia lecsengés és fluoreszcencia kioltási kísérleteket végeztünk. Mivel az AppA-ban található két tirozintirozináttá alakul már alacsony pH esetében is, és ennek a fluoreszcencia emissziója átfed a triptofánéval a kísérleteket egy olyan mutánson végeztük el, amely esetében a 104-es pozícióban található triptofánt a 7-Aza-Trp triptofán analógra cseréltük.

Támogatás: EFOP-3.6.2-16-2017-00005

Rövidítések: AppA = activation of photopigment and PUC A protein; BLUF = Bluelightsensing usingFAD; FAD = Flavinadeninedinukleotid

VIRÁLIS DNS KILÖKÖDÉS BAKTERIÁLIS MEMBRÁN MODELLEKBEN

Kiss Bálint¹, Tordai Hedvig¹, Bozó Tamás¹, Kellermayer Miklós¹

¹ Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

Gram-negatív baktériumok sejtfalának külső felszínét nagyrészt fehérjék és lipopoliszacharidok (LPS) alkotják. Ezen alkotóelemek között található az a molekula melyet a T7 bakteriofágok fertőzésük kezdetén felismernek. Az, hogy a letapadást követően milyen szerkezetbeli változások indítják be és valósítják meg a virális genom bejuttatását a célsejtbe részleteiben feltáratlan. Célünk egy olyan modellmembrán felépítése melynek segítségével a T7 fágok kikötődése és ezt követően a DNS kilökődése megfigyelhető.

Ahhoz, hogy az LPS által alkotott szupramolekuláris struktúrákat, illetve az LPS bakteriális membrán szerkezetére való hatását jobban megérthessük, lipid kettősrétegekhez hozzáadott LPS mintákat készítettünk, illetve különféle összetételű és LPS tartalmú liposzómákat preparáltunk extrúziós módszerrel. A vizsgálatokat atomerőmikroszkópos (AFM) képalkotás segítségével végeztük. Az atomerőmikroszkópos felvételeken azonosítottuk az LPS-eket, megfigyeltük a membránon belüli eloszlásukat és a lipid kettősrétegekre gyakorolt hatásukat. Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van magára a lipid kettősrétegre, illetve a membránban széteső LPS molekulákra a hőmérséklet változtatása és az oldószer összetétele. Ahhoz, hogy a natív állapothoz a lehető legközelebbi modellt alkothassunk E. coli külső membrán kivonatot készítettünk. A virális DNS kilökődést LPS tartalmú minták jelenlétében vizsgáltuk fluoreszcens, illetve lézercsipeszes technikákkal.

Mivel a bakteriofágok vélhetően az LPS-t, vagy az LPS rétegbe ágyazódó fehérjéket ismerik fel a fertőzési ciklus kezdő lépéseként, munkánk hosszútávú célja az LPS tartalmú membránok pontosabb megértésén keresztül egy olyan optimalizált modellrendszer létrehozása, amelyben a T7 bakteriofág fertőzési mechanizmusa viszonylag könnyen tanulmányozhatóvá válik.

LPS: lipopoliszacharid

AFM: atomerőmikroszkóp

HIGANY BIOSZORPCIÓFOTOSZINTETIZÁLÓ BAKTÉRIUMOKBAN

Kis Mariann¹ és Maróti Péter¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet, Szeged

A nehézfém-szennyezés az egyik legfőbb környezeti kockázat a vízi környezetben élő baktériumok számára [1]. A mikroorganizmusok részt vesznek a környezetükbe található fémek átalakításában a fémionokhoz kapcsolt anyagcsere folyamatok révén. Fontos szerepet játszanak a fémionokhoz kapcsolt transzportfolyamatok felderítésében, illetve a sejtekben akkumulálódó nehézfém ionok toxikus hatásainak megfigyelésében.

A higany bioakkumulációjának fizikai-kémiai tulajdonságai a fotoszintetizáló baktériumok kémiai-analitikai módszerrel (dithizon), fényindukált abszorpcióváltozással és bakterioklorofill fluoreszcencia indukcióval vizsgálható. A higanyfelvételtől a következők állapíthatók meg. 1.) Kinetikailag egy gyors (perc alatti időskála) és egy lassabb (1-30 perc) lépésből áll. A gyors fázis (passzív bioszorpció), amely reverzibilis és nem specifikus a fémekre nézve. A lassú fázis az aktív folyamatokat tükrözi (metabolizmus kötődő bioszorpció). 2.) A higanyionok kation csatornákat is használnak az átjutáshoz, ami gátolható 50 μM kalcium koncentrációval és kalcium csatorna blokkolókkal. 3.) Neutrális pH-n a leghatékonyabb (acidikus tartományban a protonokkal versengnek, alkalikus tartományban pedig higany(II)-oxid csapadék keletkezik). 4.) Energiafüggő, ami aktiválható fényvel és gátolható protonofórral [2].

Ezek a baktériumok képesek felhalmozni saját tömegüknél jóval nagyobb mennyiségű (10^5) higanyt biofilmes életmódjuknak köszönhetően. Biofilmben a sejtek hozzáférhetősége megváltozik: 1.) a biofilmben meredek kémiai gradiens alakul ki, 2.) a sejtek köré diffúzió réteg képződik, és 3.) a higany adszorbálódik a biofilm mátrixban.

Két eltérő kötőhely figyelhető meg: egy erős és egy gyenge $1 (\mu\text{M})^{-1}$ illetve $1 (\text{mM})^{-1}$ egyensúlyi kötési állandókkal. Az erős kötőhelyek száma két nagyságrenddel kisebb, mint a gyenge kötőhelyeké. Annak ellenére, hogy a kötőhelyek száma és affinitása hatalmas, a kötőhelyek egymástól függetlenek, vagyis a betöltöttségi állapotuk nem befolyásolja a szomszéd kötőhely kötési tulajdonságait [3].

Köszönetnyilvánítás: A munka az EFOP-3.6.2-16-2017-00005 "Ultragyors fizikai folyamatok atomokban, molekulákban, nanoszerkezetekben és biológiai rendszerekben" projekt támogatásával készült.

Irodalom

[1] Kis M, Sipka G, Asztalos E, Rázga Z, Maróti P (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151:110–117.

[2] Kis M, Sipka G, Maróti P (2017) Stoichiometry and kinetics of mercury uptake by photosynthetic bacteria, *PhotosynthRes* 132:197–209.

[3] Gábor Sipka, Mariann Kis and Péter Maróti (2018) Characterization of mercury(II)-induced inhibition of photochemistry in the reaction center of photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* 136(3):379-392.

BUILTFORENGULFMENT: COMPARISON OF THE PHAGOCYTIMECHANISMS
IN INVERTEBRATE AND VERTEBRATEMACROPHAGES

Bohdana Kokhanyuk

Rebeka Nagy, Kornélia Bodó, Péter Németh, Péter Engelmann

Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Centre, University of Pécs,

It is hypothesized that earthworm immunocytes show functional similarity to human macrophages. For this reason, earthworms are commonly used as research organisms to study immune system processes. Our aim was to compare the engulfment of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by THP-1 human monocytic cells and *Eisenia* and *rei* coelomocytes incubated along with endocytosis inhibitors.

Phagocytic cells were pretreated with different endocytosis inhibitors (colchicine, cytochalasin B and cytochalasin D) and incubated with FITC-conjugated *E. coli* and *S. aureus* in RPMI medium without FBS, RPMI with 10% heat inactivated FBS, or 10% non-heat inactivated FBS. In addition, to test energy-dependent uptake inhibition, cells were incubated at 4°C. Furthermore, we investigated the effects of coelomocyte-preconditioned (heat-inactivated/non-heat inactivated) RPMI on phagocytic capacity. Results were evaluated by microscopy and flow cytometry.

Only cytochalasin B caused strong inhibition of bacterial internalization. The fact that incubation at 4°C revealed partial inhibition of phagocytosis suggests that other uptake pathways might be involved as well. Interestingly, coelomocyte-preconditioned, non-heat inactivated medium increased bacterial uptake, that suggests coelomocytes might secrete certain opsonizing compounds (complement-like factors) to enhance the engulfment of bacteria.

Comparison of the various inhibitory effects has revealed conserved evolutionary mechanisms involved in phagocytic pathways for both human and earth worm immunocytes.

FITC–fluorescein isothiocyanate;

RPMI medium–Roswell Park Memorial Institute;

FBS–fetal bovine serum.

A PARP INHIBITOR OLAPARIB VÉDŐHATÁSA KÍSÉRLETES CROHN
MODELLBEN ÉS MESTERSÉGES EPITHELIÁLIS HATÁRRÉTEGEN: CÉLPONT A
MITOKONDRIUM

Kovács Dominika, Bagóné Vántus Viola, Sümegi Balázs, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Bevezetés: A gyulladásos bélbetegségek kialakulásában a bélnyálkahártya barrierfunkciójának megváltozása bizonyítottan szerepet játszik. A epitheliális határréteg destrukciója a permeabilitás fokozódásához, a patogénekmucosalis immunsejtekkel történő interakciójához, ezáltal kontrollálatlan gyulladáshoz vezet. A szövetkárosodás és gyulladás kialakulásának egyik alapvető tényezője az oxidatív stressz, melynek hatására a PARP enzim túlzott aktivációja a mitokondrium bevonásával nekrotikus és parthanatos sejthalált eredményez. Munkánk célja egy a klinikumban már tumorterápiában alkalmazott PARP gátlószer, az olaparib gyulladásgátló hatásának vizsgálata TNBS indukálta kísérletes Crohn modellben és mesterséges epitheliálisbarrieren.

Módszerek: Az epitheliális határréteg in vitro modellezésére Caco-2 egysejt rétegből álló barriert alkalmaztunk, melynek károsodását H₂O₂-al indukáltuk. A mesterséges barrier integritásának vizsgálatát egy a transepithelialis elektromos ellenállást (TEER) valós időben mérő készülékkel (xCelligenceRTCA) monitoroztuk, valamint egy fluoreszceinizotiocianát- dextrán átjutáson alapuló módszerrel (in vitro FITC-dextranpermeabilityassay) detektáltuk. A sejtek életképességét flow citométerrel (Musecellanalyzer), a mitokondriális funkciót pedig oxigénfogyasztást mérő műszerrel (SeahorseXFp) vizsgáltuk. A kísérletes colitis indukálása TNBS kezeléssel történt, az olaparibot naponta intraperitoneálisan adagoltuk. Az egerek testsúlyát naponta ellenőriztük, a kísérlet végeztével a vastagbél - Crohn megbetegedésre jellemző - szöveti elváltozásait makroszkópiusan értékeltük.

Eredmények: Az olaparib kezelés hatására javult a H₂O₂ által károsított Caco-2 egysejt-réteg „barrier” funkciója: 1) a határréteg integritása jelentősen javult; 2) csökkent a H₂O₂ által indukált sejthalál; 3) mérséklődött a mitokondriális funkció károsodása. Előzetes eredményeink szerint az olaparib csökkentette a kísérletes colitis súlyos tüneteit (fekélyek száma, mérete, véres széklet, hasmenés) és hatására a kezelt állataink súlyvesztésében csökkenő tendenciát (nem szignifikáns) tapasztaltunk.

Következtetések: A PARP inhibitor olaparib tehát védő hatású a TNBS indukálta kísérletes Crohn-betegség modellben, valószínűleg a mitokondriális funkció és ez által az epitheliálisbarrier integritásának megőrzésén keresztül.

Rövidítések: PARP – poli (ADP-ribóz) polimeráz; TNBS - 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav

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



„A Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült”;



„Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült”

A SZINDEKÁN-4 PROTEOGLIKÁN HATÁSA A VÁZIZOMSEJTEK
GLÜKÓZFELVÉTELÉRE ÉS MITOKONDRIÁLIS LÉGZÉSÉRE

Köhler Zoltán Márton¹, Juhász László², Gajdos Tamás³, Erdélyi Miklós³, Trencsényi György⁴, Dux László¹, Keller-Pintér Anikó¹

- 1 Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézet;
- 2 Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet;
- 3 Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék;
- 4 Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Nukleáris Medicina Intézet,

Az inzulinfüggő GLUT4 transzporter felelős a zsír- és vázizomszövet glükózfelvételeért. Alapállapotban perinukleárisak a GLUT4 vezikulák, majd stimulus hatására a plazmamembránba transzlokálódnak. A transzlokáció károsodása szerepet játszik az inzulin rezisztencia és a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásában. A plazmamembránba való kihelyeződés szignálja lehet egyrészt az inzulinfüggő PI3K, Akt, AS160 útvonal, másrészt az LKB1, AMP/ATP arány, valamint a Ca²⁺ indukálta CaMKK szabályozta AMPK szintén befolyásolhatja az AS160 foszforilációját. Az AS160 Rab GAP kulcsfontosságú molekula a GLUT4 transzlokációjában a Rab GTPázok aktivitásának regulálásával. Szindekán-4 (SDC4) egy transzmembrán, heparán-szulfát proteoglikán és az aktin sejtvázhoz kapcsolódik, továbbá képes irányítani az aktin átrendeződését, mely nélkülözhetetlen az exocitózishoz.

Az SDC4 expressziójának csendesítéséhez shRNS-t használtunk C2C12 egér mioblaszt sejtekben. Western blot technikával vizsgáltuk a fehérjék mennyiségét és aktivációját, Oroboros O2k respirométerrel a mitokondriális respirációt, Packard Cobra II gamma counterrel a sejtek ¹⁸FDG felvételét. A GLUT4 intracelluláris eloszlását immunfluoreszcenciával vizsgáltuk.

A csendesítés szignifikánsan fokozta az AS160 foszforilációját és a sejtek ¹⁸FDG felvételét. A SDC4 csendesített sejtek mitokondriálisrezerv kapacitása megemelkedett, de egyéb mitokondriális légzéssel kapcsolatos paraméter (alap, „leak” és reziduális oxigénfogyasztás) nem változott.

Eredményeink arra utalnak, hogy a klinikumban jelenleg használt gyógyszer, a metformin mellett egy új mechanizmus is növelheti a vázizom glükózfelvételét.

A kutatás az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 támogatásával valósult meg.

GLUT4: glükóztanszporter 4, PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz, AS160: Akt-szubsztrát 160 kDa, GAP: GTPáz aktiváló fehérje, AMPK: AMP-aktiváltakináz, LKB1: májkináz B1, CaMKK: Ca²⁺/kalmodulin-függő proteinkinázkináz, SDC4: szindekán-4, ¹⁸FDG: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-β-D-glükóz

A HIPOXANTIN-TRICIKLÁNÓADENOZINERG AKTIVITÁSÁNAK
KARAKTERIZÁLÁSA EX VIVO PATKÁNY PITVARON ÉS ARTÉRIÁKON

Lampé Nóra, Óvári Ignác, Viczján Gábor, Erdei Tamás, Gesztelyi Rudolf, Juhász Béla

Debreceni Egyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Kutatásunk során egy, a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémia Tanszékén újonnan fejlesztett vegyület, a hipoxantin-triciklánóadenozinerg profilját vizsgáltuk. A hipoxantin-triciklánó egy szintetikus adenozin analóg, melyben az adeninthipoxantin, a ribózt pedig egy morfolínóból kiinduló, kondenzált triciklikus molekularész helyettesít. Kísérleteink során elsődleges célunk volt annak feltérképezése, hogy a hipoxantin-triciklánó rendelkezik-e A_1 és/vagy A_{2A} adenozin receptorokra gyakorolt hatással, illetve hatás esetén szerettük volna megvizsgálni annak természetét, a receptorokat befolyásoló tulajdonságait. Fiziológias körülmények között az adenozin a pitvari A_1 adenozin receptor izgatása révén csökkenti a kontrakciós erőt, az ereken pedig az A_{2A} adenozin receptor mediációjával relaxációt okoz.

Vizsgálataink során hím Wistar patkányokból származó bal pitvar fülcsét, valamint aorta thoracicat és truncus pulmonalist izoláltunk. A preparátumokat 36°C -os, karbogénnel szellőztetett ($95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$), Krebs oldattal feltöltött szervkádakban, 10 mN alapfeszülés mellett felfüggesztettük, a pitvarokat ingereltük (3 Hz , 1 ms , $1-1.5 \text{ V}$). A preparátumokon a kontrakciós erő mérésével koncentrációhatás görbéket vettünk fel és meghatároztuk az adenozinra és a hipoxantin-triciklánóra adott kontraktilis választ 8 -szulfofenil-teofillin (a sejtbe nem permeáló A_1 és A_2 adenozin receptor antagonistá) hiányában és jelenlétében. Az érgyűrűket előzetesen 10 nM noradrenalinnal prekontrahtáltuk. Mivel a hipoxantin-triciklánó mennyisége korlátozott mértékben állt rendelkezésünkre, nem volt lehetőségünk nagyobb számú mérésre, így munkánk pilot study jellegű.

Tapasztalataink alapján a hipoxantin-triciklánó eltérő módon hatott a két adenozin receptoron. A pitvari myocardiumon direkt negatív inotrópadenozinnal szemben a hipoxantin-triciklánó direkt pozitív inotróp szernek bizonyult, ami felveti, hogy az A_1 adenozin receptoron inverz agonista. A hipoxantin-triciklánó jelenléte nem gátolta meg az adenozin direkt negatív inotróp hatását, ami reverzibilis kötődésre utal támadáspontján. Az ereken ugyanakkor a hipoxantin-triciklánó az adenozinhoz mindenben hasonlóan viselkedett, vagyis az A_{2A} adenozin receptoron pozitív parciális agonistának mutatkozott. Hatásai mindhárom preparátumon gátolhatóak voltak 8 -szulfofenil-teofillinnel (az adenozinhoz hasonló mértékben), ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a vizsgált hatások szempontjából a hipoxantin-triciklánó támadáspontjai az adenozin sejt felszíni receptorai.

Témátámogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEART)

KALMODULINKONFORMEREK AZONOSÍTÁSA A TIROZINOK FLUORESZCENCIA ÉLETIDŐ MÉRÉSÉVEL

Liliom Károly¹, Schay Gusztáv¹, Arian Jafari¹, Juhász Tünde²

1 Semmelweis Egyetem, ÁOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest,

2 MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag és Környezetkémiai Intézet, Budapest

A kalmodulin (CaM) – az eukarióta sejtek intracelluláris Ca²⁺-szenzor fehérjeje – 148 aminosavból épül fel, amelyek két doménbe rendeződnek. Az N- és C-terminális domének mindegyike két-két Ca²⁺-szelektív kötőhelyet tartalmaz („EF-kéz” motívumok). A kalcium-ionok kötődésének hatására a CaM konformációja megváltozik, a két domént összekötő hélix-hurok-hélix szerkezet iniciációs pontjainál hidrofób felszínek nyílnak meg, együttesen lehetővé téve a kalmodulinnak célfehérjéihez történő kötődését. Nem-aktivált sejtekben az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció ~100 nM, amely aktivált sejtekben ~10 μ M, esetenként ennél is magasabb értéket vehet fel. Rendkívül változatos azonban a Ca²⁺-jelek időbeli és térbeli mintázata a tranziens lefutású jelektől (~0,1-100 s) a Ca²⁺-hullámokig (~0,1 – 10 Hz).

A CaM közvetítésével elméletileg több száz effektor-fehérje is aktiválódhat, azonban adott sejtben az aktivációt kiváltó mechanizmustól függően tipikus jelátviteli útvonalak kapcsolnak be néhány, talán tucatnyi CaM-effektort érintve. Felmerül a kérdés, hogy milyen mechanizmusok biztosítják az aktiváció-specifikus Ca²⁺-CaM-effektor komplexek kialakulását?

Hipotézisünk szerint ebben szerepe lehet a CaM Ca²⁺-jelalak alapján bekövetkező konformációs szelekciójának. Kísérleteinkben módszert dolgoztunk ki a CaM konformációs állapotainak detektálására-követésére. A CaM két tirozin aminosava alkalmas a fehérje intrinszik fluoreszcenciájának követésére. A konformációra legérzékenyebb a fluoreszcencia életidő mérése, amely adatokra multiexponenciális függvényt illesztve azonosíthatjuk a különböző konformereket. Módszerünkkel négy komponenst tudtunk azonosítani, amelyek életideje és a teljes fluoreszcencia-intenzitásbeli részarányuk érzékenyen változik a Ca²⁺-koncentrációval, amit a 0 – 10 μ M tartományban változtattunk 5 μ M állandó CaM (20 μ M Ca²⁺-kötőhely) koncentráció mellett, elkerülve a CaM teljes Ca²⁺-telítését. Terveink között szerepel eredményeink összehasonlítása más „EF-kéz” motívumokat tartalmazó fehérjékkel, illetve a mérések elvégzése Ca²⁺-tranzienseket alkalmazva.

GYULLADÁS HATÁSA A HŐÉRZÉKENY TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL
IONCSATORNÁK KIFEJEZŐDÉSÉRE HUMÁN DENTÁLIS PULPÁLIS SEJTEKBEN

Lisztes Erika, Molnár Dóra², Kelemen Balázs¹, Vladár Anita¹, Hanyicska Martin¹,
Bohács Judit², Bágyi Kinga², Bíró Tamás^{3,4}, Marincsák Rita², Tóth István Balázs¹

1Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet, Debrecen
2Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati nem önálló
Tanszék, Debrecen
3Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Immunológiai Intézet,
Debrecen
4HCEMM Nonprofit Kft., Szeged

BEVEZETÉS: A fogszuvasodás korunk egyik népbetegségének tekinthető idült folyamat, mely a fog keményszöveteinek destrukcióját követően a fogbélbe terjedő gyulladással jellemezhető. Ezen gyulladós folyamatok előrehaladtával az odontoblastok elhalnak és a pulpa belsőbb sejtrétegeiből származó sejtek (immunsejtek, pulpálisfibroblasztok, endotheliális sejtek és őssejtek) válaszolnak a bakteriális támadásra, miközben Toll-like receptoraik (TLR) aktiválódása révén citokineket, kemokineket termelve immunsejtek sokaságát vonzzák. Az így létrejövő fiziko-kémiai változás számos receptor és ioncsatorna működését befolyásolja, feltételezhetően a hő-, ozmo- és mechanoszenzorként ismert Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornákét is.

Célunk a hőérzékeny TRP csatornák expressziójának és működésének vizsgálata volt humán fogbél eredetű primer sejteken, fiziológiás és gyulladós körülmények között.

MÓDSZEREK: Kísérleteinket extrahált humán bölcsességfogak pulpájából izolált sejtek tenyészetein végeztük. Vizsgálataink során a hőérzékeny TRP csatornák génexpressziójának valamint a gyulladós indukció hatásának vizsgálatára is kvantitatív real-timePCR-t alkalmaztunk, az ioncsatornák funkcionalitását pedig Fura-2-AM alapú Ca²⁺ mérésekkel tanulmányoztuk.

EREDMÉNYEK: A pulpális sejtek a vizsgált meleg érzékeny TRP csatornák és a hidegérzékeny TRPA1 transzkriptjeit egyaránt expresszálták, melyek közül a TRPV3, a TRPV4 és a TRPA1 csatornák funkcionális jelenlétét is igazoltuk farmakológiai agonisták alkalmazásával. A sejteken gyulladós folyamatokat indukáltunk egyes TLR-okat szelektíven aktiváló mikrobiális szignálok segítségével, melyek közül a TLR-3 aktivátor, duplaszálú RNS analóg poliinozin:policitidil sav bizonyult a leghatékonyabbnak: jelentős mértékben indukálta a TNF α , IL1a, IL1b és IL6 citokinek expresszióját valamint egyes nociceptívTRP csatornák kifejeződését is fokozta.

MEGBESZÉLÉS: Eredményeink hozzájárulhatnak a fogbélgyulladás molekuláris eseményeinek jobb megértéséhez és felvetik a hőérzékeny TRP csatornák terápiás célpontként történő kiaknázásának jövőbeli lehetőségét a pulpitis és az ahhoz társuló fogfájás kezelésében.

TRP:Tranziens Receptor Potenciál TRPV:Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid alcsalád

TRPA:Tranziens Receptor Potenciál Ankirin alcsalád TLR: Toll-like receptor

PCR: polimerázláncreakcióTNF α : tumor nekrozis factor alfa

IL: interleukin

GLUKOKORTIKOID HORMON HATÁSA A Ca^{++} JELÁTVITELI ÚT AKTIVÁCIÓJÁRA
T-SEJT ALCSOPORTOKBAN

Litvai Tímea¹, Németh Noémi¹, Boldizsár Ferenc¹, Berki Tímea¹

¹ Pécsi Tudományegyetem KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A T limfociták központi szerepet játszanak a sejtes immunválasz működésében. A GC-hormonok a T-sejt fiziológias folyamatainak szabályozásában is részt vesznek, de immunszuppresszív hatásukat a citokin termelés és a sejt aktiváció befolyásolásával érik el. Az intracelluláris szabad kalcium (Ca^{++}) mint másodlagos hírvivő fontos szerepet játszik az IP_3 által közvetített jelátvitel útvonalban, mely döntő fontosságú a sejtek túléléséhez és anyagcseréjéhez.

Munkánk célja a Th és Treg-sejtek alap szabad intracelluláris Ca^{++} szintjének összehasonlítása. Továbbá a GC-hormon hatásának vizsgálata a sejtek TCR-n keresztüli aktivációjára Ca^{++} kinetikus mérésekkel. További célunk, hogy összehasonlítsuk a sejtekben a rövid távú, nagy dózisú GC-hormon hatását a Ca^{++} jelátviteli útvonalra.

Kísérleteinkhez 3-4 hetes Balb/c egerek tímuszából és lépéből izolált $CD4^+$ T-sejteket és $CD4^+CD25^+$ Treg-sejteket anti-CD3 antitesttel stimuláltuk GC-hormon jelenlétében és anélkül, a Ca^{++} szignál változását áramlási citometriával követtük. A $CD4^+$ Th és a Treg-sejtek Ca^{++} jelének kinetikáját 10^{-6} M GC-hormon (Dexamethasone) jelenlétében vizsgáljuk. Az intracelluláris Ca^{++} méréshez Fluo-3-AM fluoreszcens kalcium-indikátort használunk. A TCR stimulációhoz Hörcsög-anti-egér- $CD3\epsilon$ -monoklonális antitestet, majd kecske-anti-Hörcsög-IgG-antitestet, a nemspecifikus stimulációhoz 1 μ g ionomicint használunk.

Vizsgálataink alapján a nTreg és pTreg-sejtekben magasabb az alap intracelluláris Ca^{++} szint, mint a $CD4^+$ Th-sejtekben. In vitro 30 perces DX-előkezelés a Treg-sejtekben tovább emelte az alap Ca^{++} szintet. Ugyanakkor a Treg-sejtek TCR stimulációra alacsonyabb Ca^{++} jel aktivációt mutattak mindkét szervben a $CD4^+$ T-sejtekhez képest. In vitro nagydózisú GC-hormon kezelés magasabb Ca^{++} jelet váltott ki a tímusz $CD4^+$ Th és Treg-sejtjeiben. A lépben lévő $CD4^+$ T-pTreg-sejtekben viszont gátolta a Ca^{++} jelet.

Ez alapján a magasabb intracelluláris Ca^{++} szintnek szerepe lehet a Treg-sejtek gyengébb aktiválhatóságában ami a központi tolerancia fenntartásával lehet összefüggésben. A GC-hormon eltérő hatása a tímusz és perifériás Th és Treg-sejtekre az éretlen sejtek GC rezisztenciájával lehet összefüggésben.

GC: Glükokortikoid, IP_3 : Inozitol- trifoszfát, Th: Helper T sejt, Treg: Regulatórikus T sejt, TCR: T sejt receptor, nTreg: Természetes regulatórikus T sejt, pTreg: Perifériás regulatórikus T sejt, DX: Dexamethasone

A CHLORANTRANILIPROLE ROVARÖLŐ SZER HATÁSA EMLŐS VÁZIZOM
TÍPUSÚ RIANODIN RECEPTORRA

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

A közelmúltban kimutatták, hogy a diamid típusú chlorantraniliprole (CAP) inszekticid Ca^{2+} -felszabadulást vált ki az emlős vázizomrostokból izolált szarkoplazmásretikulum (SR) vezikulákból az SR Ca^{2+} -csatornáján – a rianodin receptoron (RyR) – keresztül. Ez az eredmény a szer használatának súlyos élelmiszer egészségügyi kockázatát veti fel. Emiatt munkánk célja a CAP hatásmechanizmusának részletes tanulmányozása volt egyedi RyR-okon végzett mérésekkel. Ennek érdekében nyúl vázizomból származó tisztított RyR-okat építettünk sík lipid kettősrétegbe és a CAP hatását különböző koncentrációk mellett teszteltük. Az izolálás során a nyúl vázizom homogenizátumból differenciálcentrifugálással RyR-t tartalmazó vezikulákat nyertünk ki. A RyR-t a vezikulákból 1% detergens- és foszfolipid oldattal szolubilizáltuk, majd szacharóz grádiensen ultracentrifugálással tisztítottuk. A singlechannel áramméréshez a szolubilizáltRyR molekulákat mesterséges lipid kettősrétegbe építettük, és feszültség-clamp körülmények között mértük a rajtuk keresztül folyó áramot.

CAP hatására a csatornák áramán nagy aktivitású események kitörésszerű megjelenését („burst-ök”) figyeltük meg, amelyek frekvenciája a koncentráció növelésével egyre fokozódott. Méréseink során burst-ként definiáltunk minden olyan eseményt, amely során a csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) az átlagos aktivitás több, mint tízszeresére emelkedett, valamint 200 milliszekundumnál hosszabb ideig fennállt. Eredményeink szerint a 3 μM koncentrációban alkalmazott CAP $0.77 \pm 0.43/\text{min}$ frekvenciával jelentkező burst-ök megjelenéséhez vezetett, míg az inszekticidet 10 μM -ban alkalmazva a burst-ök frekvenciája több mint kétszeresére ($1.74 \pm 0.56/\text{min}$) emelkedett ($n=3$). A burst-ök megjelenésével egyidejűleg a CAP a burst-ök közötti szakaszok P_o -ját is növelte, ami arra enged következtetni, hogy a szer a nyitott állapotú csatornához képes kötődni. ACAPcardiotoxikus hatásait mindeddig egy kutatócsoport sem vizsgálta, viszont a szer hatásmechanizmusából adódóan veszélyt jelenthet olyan arrhythmiaokban, amelyek oka a RyR aktivitásának fokozódása diasztolé során, így például katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardiában. Ennek ellenőrzése a közeljövőben feltétlenül szükséges.

CAP – chlorantraniliprole, SR – szarkoplazmásretikulum, RyR – rianodin receptor, P_o – nyitvatartási valószínűség

KÁLCIUM HATÁSA A TITIN RUGALMASSÁGÁRA

Mártonfalvi Zsolt¹, Bánkuti Stefánia¹, Guy Ben-Arie¹, Kellermayer Miklós¹
1 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A titin a harántcsíkolt izom rugalmasságát meghatározó szarkomerikus óriásfehérje, mely egyetlen polipeptidláncként a teljes félszarkomert áthidalja a Z-lemeztől az M-csíkgig. Habár elsősorban a megnyújtott szarkomerekben ébredő passzív izomerő kialakításában játszik fontos szerepet, feltételezhető, hogy a kontraktilis apparátus aktivációja dinamikusan változtatja a titinnanomechanikai tulajdonságait. Korábbi kísérletek rámutattak, hogy a titinPEVK doménjének glutaminsavban gazdag polyE szekvencia motívumai nagy affinitással kötik a kalciumot. Feltételezhető, hogy a kalcium ionok a PEVK domén glutaminsav oldalláncait keresztkötik, ezzel lerövidítik és mechanikai értelemben passziválják, vagyis nyújthatatlanná teszik a domén egyes motívumait. Annak vizsgálatára, hogy ezen kalcium kötő szekvenciák milyen módon befolyásolják a titin rugalmasságát, egyedi titinmolekulákon végeztünk nyújtási kísérleteket lamináris áramlási folyadékcellában lézercsipesszel. A kísérleti elrendezésben a csapdázott molekulát körülvevő puffer kalcium koncentrációja gyorsan változtatható volt, miközben ismétlődő ciklusokban nyújtás-visszaengedési kísérleteket végeztünk. Mikor a molekulákat magas koncentrációjú (pCa 3) pufferben nyújtottuk, a titin látszólagos perzisztenciahossza csökkent.

Ennek következményeként a titinmolekulák egy kompaktabb szerkezetet vettek fel, ami a csapdázott polipeptidlánc rövidülését okozta. Eredményeink arra utalnak, hogy a titin egy kalcium érzékeny rugalmas fehérje, következésképp a szarkomerben ébredő passzív erőkifejtés kalcium jelenlétében nagyobb, mint relaxált állapotban.

MUTÁCIÓK ALAPJÁN AZONOSÍTOTT ÚJ TERÁPIÁS CÉLPONTOK
KOLOREKTÁLIS KARCINÓMÁBAN

Menyhárt Otília^{1,2}, Tatsuhiro Kakisaka³, Pongor Lőrinc^{1,2}, Hiroyuki Uetake⁴, Ajay Goel³, Györfly Balázs^{1,2}

1 Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyermekklinika, H-1094, Budapest

2MTA TTK Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet, Magyar tudósok körútja 2, H-1117, Budapest

3Center for Gastrointestinal Research & Center for Translational Genomics and Oncology, Baylor Scott & White Research Institute and Charles A. Sammons Cancer Center, 3410 Worth Street | Suite 610 | Dallas, Texas 75246, USA

4Department of Specialized Surgery, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

A kolorektális karcinóma (CRC) kialakulásában szerepet játszó legfontosabb mutációk ismerete ellenére a jóváhagyott célzott terápiás szerek spektruma limitált, és az új gyógyszerek fejlesztése lassan halad. A mutációk az érintett jelátviteli útvonalakon hatva befolyásolhatják a jelátvitelben szerepet játszó gének expresszióját. Ezt kihasználva célunk a driver mutációkhoz köthető, felülexpresszált, potenciálisan célozható gének azonosítása volt, melyek új terápiás célpontok lehetnek CRC kezelése során.

Vizsgálataink alapját 582 CRC-vel diagnosztizált beteg mutációs és génextpressziós adata képezte, mely összességében 39.916 gén mutációs státuszának és 20.500 gén expressziójának elemzését tette lehetővé. Első lépésben a leggyakrabban előforduló romboló mutációkat azonosítottuk, majd Mann-Whitney U-teszt segítségével a mutáns és vad típusú minták közötti génextpressziós különbséget határoztuk meg. Ezután 2.100 páciens génextpressziós és túlélési adatai alapján kiszűrtük a rossz prognózissal társuló felülregulált géneket, végül ezek listáját potenciális gyógyszer-célpontokra szűkítettük. Az azonosított mutációk és felülexpresszált gének szerepét 171 független klinikai minta bevonásával igazoltuk.

Összességében 426, romboló mutációk jelenlétében felülregulált gént vizsgáltunk, melyek közül 95 gén expressziója társult rossz prognózissal (Recurrence Free Survival; $p < 0.05$). Ebből expresszió alapján 7 potenciálisan célozható gént választottunk ki, melyek túlélésben betöltött szerepét független klinikai populáción igazoltuk. Ezek közül négy gén, a TRIB2 ($p = 0.0003$), VSIG4 ($p = 0.0003$), BMP4 ($p = 0.023$) és DUSP4 ($p = 0.043$), magas expressziója társul rossz prognózissal az ACVR2A, ANK3, SOX9 és az AMER1 gének romboló mutációja jelenlétében.

Az azonosított biomarkerek bepillantást nyújtanak a CRC kialakulásának és progressziójának mechanizmusába. A TRIB2 és DUSP4 a mitogén szignál transzdukcióban vesznek részt, a makrofágok felületi VSIG4 expressziója a T sejt immunválaszt gátolja, a BMP4 által kódolt ligand a TGF-beta útvonal révén a SMAD-transzkripciós faktorok aktiválását teszi lehetővé. Összességében az azonosított romboló mutációk lehetővé teszik a kolorektális karcinóma páciensek terápiás szempontból releváns felosztását, míg a mutációk által befolyásolt, potenciálisan célozható gének új terápiás célpontot nyújthatnak.

ÚJ, NAGY SZELEKTIVITÁSÚ KV1.3 INHIBITOR PEPTID ELŐÁLLÍTÁSA
E.COLI-BAN

Nagy Endre¹, Csóti Ágota¹, Panyi György¹

¹Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

Az elmúlt évtizedekben az autoimmun betegségek a klinikai orvostudomány egyik legkutatatottabb területévé váltak. Az autoimmun betegség gyakori tünete a szövetek károsodása a test különböző területein. Ezért a megfelelő diagnózis felállításához és a kezelés elvégzéséhez elengedhetetlen a betegség mélyebb megértése. Tudott, hogy az effektor memória T-sejtek folyamatos aktivációja és proliferációja felelős a betegség kialakulásáért. Ezeknek a T-sejteknek a megfelelő működése a Kv1.3 ioncsatornáktól függ, így a T-sejtek hiperaktiválódását a Kv1.3 ioncsatornák blokkolásával el lehet nyomni. (1) Az elmúlt években számos peptidet izoláltak, mérgező állatokból, melyek gátlólag hatnak a Kv1.3 ioncsatornákra. A mikroszkopikus rendszerek alkalmazása, ezen peptidek előállításához, hatékonyabb, etikusabb és gazdaságosabb, mint a mérgező állatokból kivonni. Kutatásunk során többszörös restriktív és ligációs lépéseket végeztünk a toxin peptidet tartalmazó vektor előállításához. Az általunk termeltetett peptidetsVmKTx-nek nevezik, amely egy Vm24 analóg, nagyobb Kv1.3 szelektivitással. (2) Különböző Escherichia coli törzsekben végeztünk transzformálást és optimalizáljuk a termelési eljárás paramétereit.

Kv1.3: Feszültség kapuzott kálium csatorna (shaker-related subfamily, 3. tag)

Vm24: Vaejovismexicanus skorpió mérgének egy peptid komponense.

1) Z.Varga, P.Hajdu, G.Panyi. Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases. Immunol Lett 2010, 130: 19-25.

2) Z.Varga, F. Papp, G Panyi. Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells. Mol Pharmacol. 2012, 82(3): 372-382.

IN VITRO MÁJ MODELL FELÁLLÍTÁSA ZSÍRSAV OKOZTA MÁJTOXICITÁS
MIKROPARTIKULUM FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATÁHOZ

Németh Krisztina¹, Békés-Kanalas Márta¹, Buzás Edit¹, Tamási Viola¹

¹ Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológia Intézet, Budapest

Háttér: A máj központi szerepet tölt be az idegen molekulák és a nagyobb képletek, pl. mikropartikulumok eltávolításában. Azonban hiperlipidémia kialakulása során a májsejtek zsírfeltevő képessége megnő és a bekerülő zsírsavak hatására zsírmáj jöhet létre. Ilyenkor sok egyéb paraméter mellett, megváltozhat a hepatocyták és a Kupffer sejtek mikropartikulum (exoszóma, mikrovezikula) felvétele is, ami hatással lehet az idegen mikropartikulumokklírenszerére, a saját sejtek közötti kommunikációjára, valamint a munkacsoportunk által felismert exoszóma és mikrovezikula asszociált LDL felvételére. Munkánk során egy olyan in vitro rendszert szeretnénk beállítani, ami jól modellezi az elmondottakat.

Módszerek: Kísérleteink során C57BL/6 egerek májából perfúzióval májsejteket izolálunk. A hepatocitákat, illetve Kupffer-sejteket differenciál és sűrűség-gradiens centrifugálással szeparáljuk, a Kupffer sejtek szelektív adherenciájuk révén tovább tisztíthatjuk. A zsírsavak által kiváltott májtoxicitást olajsav, palmitinsav eleggyel történő kezeléssel modellezzük. A hepatociták EV felvételére vonatkozóan, előkísérleteinket HepG2 sejtvonalon végeztük, melynek segítségével beállítottuk a mikroszóma/exoszóma felvétel modellrendszerét, fluoreszcenciás detektálás mellett. A hepatocitákat CCRF-CEM sejtvonalon eredetű, fluorofórral jelölt mikropartikulumokkal kondicionáltuk, majd a felvételt immuncitokémiával igazoltuk.

Eredmények: A májsejtek izolálását és a sejtek fenntartási körülményeit sikeresen optimalizáltuk. A zsírsavak által előidézett májtoxicitás in vitro modellezésére legoptimálisabbnak az olajsav: palmitinsav, 2:1 (400 μ M:200 μ M) arányú kezelése bizonyult. A normál médiumban tartott hepatociták a fluoreszcensen jelölt mikropartikulumokat koncentráció függő módon felvették. A magas zsírsavtartalmú tápon tartott hepatociták mikrovezikula felvétele csökkent.

Következtetések: A felállított in vitro máj modellrendszer alkalmas a mikropartikulum felvételének vizsgálatára mind normál, mind zsírsav okozta májtoxicitás során.

Előzetes eredményeink alapján a magas zsírsavtartalmú médiumban tartott sejteknél a májsejtek mikrovezikula felvételének kapacitása csökken.

Támogatás: ÚNKP-18-4-SE-127, Bolyai János kutatási Ösztöndíj

LDL – lowdensitylipoprotein

EV – extracelluláris vezikula

HepG2 – liverhepatocellularcells

CCRF-CEM - human T celllymphoblast-like cell line

A KOMPLEMENT MASP-1 HATÁSA AZ ENDOTÉLSEJTEKANGIOGENETIKUS FOLYAMATAIRA

Németh Zsuzsanna¹, Doleschall Zoltán², Dobó József³, Gál Péter³, Cervenak László¹
1 Semmelweis Egyetem, III. Sz Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium, Budapest
2 Országos Onkológiai Intézet, Patogenetikai osztály, Budapest
3 Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest

A komplementrendszer lektin-útjának egyik legfontosabb enzime a mannoz-kötőlektin-asszociált szerin proteáz 1 (MASP-1). A komplementrendszer aktiválódása szerepet játszik az ateroszklerózis következtében kialakuló infarktus és stroke patomechanizmusában is. A MASP-1, a lektin út elindítása mellett, képes az erek belső felszínét borító endotélsejtek közvetlen aktiválására, korábbi transzkriptomikai szintű vizsgálatainkban pedig kimutattuk, hogy a MASP-1 jelentősen megváltoztatja az angiogenezis folyamataihoz kötődő gének expresszióját. A neovaszkularizáció fontos szerepet játszik az infarktus utáni regenerációban, kutatásunkban tehát a MASP-1 angiogenezisre gyakorolt hatását kívántuk részletesebben megvizsgálni.

A humán köldökzsinór véna endotélsejteket (HUVEC) egészséges újszülöttekből származó köldökzsinórból preparáltuk, a kísérleteket 2-4 passzázsú sejtekkel végeztük. A kezelésekhöz 2 μ M-os rekombináns MASP-1-et használtunk. A MASP-1 citotoxicitását mikroszkópos morfológiával és SYBRGreen alapú sejtszámolással ellenőriztük. A növekedési faktorok expresszióját qPCR-el vizsgáltuk, a proliferáció vizsgálatához SYBRGreen segítségével számoltuk meg a sejteket. A sebgyógyulást Ibidi 3 wellculture-insert-ek segítségével modelleztük. Az hálózatok kialakulását és szétesését Mátrigélen tenyésztett sejtekkel vizsgáltuk.

A MASP-1 nem volt citotoxikus az endotélsejtekre, ugyanakkor 4 és 6 óránál vizsgálva, nem indukált sejtosztódást sem. Nem befolyásolta a vizsgált, legfontosabb, endotélsejteken jelen lévő növekedési faktorok expresszióját mRNS szinten (VEGF receptor 1 és 2, angiopoetin receptor 1 és 2, FGF receptor 2). A MASP-1 ugyanakkor jelentősen gátolta a sebgyógyulást, és elősegítette a Mátrigélen kialakult sejhálózatok szétesését.

Az aktivált MASP-1 kísérleteinkben lassította a sebgyógyulás folyamatát, és elősegítette a sejhálózatok szétesését annak ellenére, hogy közvetlen sejtpusztulást nem okozott. Eredményeink alapján tehát egy infarktus során a komplementrendszer lektin útjának aktiválódása lassíthatja az érfal regenerációját.

Rövidítések: MASP-1 – mannoz-kötőlektin asszociált szerin proteáz 1, HUVEC – humán köldökzsinór véna endotélsejt

A FRAKTALKIN HATÁSA AZ IMPLANTÁCIÓBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA ENDOMETRIUM ÉS TROPHOBLAST SEJTVONALAKON

Pandur Edina¹, Pap Ramóna¹, Jánosa Gergely¹, Kovács L. Gábor^{2,3}, Sipos Katalin¹

1 Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerészi Biológiai Tanszék, Pécs

2 Pécsi Tudományegyetem, Szentágothai János Kutatóintézet, Pécs

3 Pécsi Tudományegyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs

Bevezetés: Az embrió implantációja hormonok, citokinek és kemokinek által szabályozott folyamat. A fraktalkin, egy kemokin, melynek membránhoz kötött és szolubilis formáját is termelik az endometrium sejtek. A fraktalkin receptorát, a CX3CR1-et a trophoblast sejtek fejezik ki, melynek a kutatások szerint szerepe van a magzati-anyai kommunikációban. A membránhoz kötött fraktalkin direkt kapcsolatot alakít ki az endometrium és a trophoblast sejtek között, míg a szolubilisfraktalkin szignál molekulaként befolyásolhatja a sejtek működését.

Célkitűzés: A fraktalkin hatásának vizsgálata a kiválasztott, implantációban szerepet játszó gének expressziójára HEC-1A és JEG-3 sejtvonalakon.

Anyagok és módszerek: A sejteket 5, 10 és 20 ng/ml koncentrációban fraktalkinnal kezeltük (szolubilis forma), 6, 24 és 48 órán át. A kezelést követően a mintákból RNS-t izoláltunk, majd komplementer DNS-t szintetizáltunk. A génexpressziós vizsgálatokhoz SYBRGreen alapú realtimePCR-t készítettünk a vizsgált génekre. Az expressziós értékeket β -aktinra normalizáltuk, a kontroll sejtek expresszióját 1-nek tekintettük. A relatív expressziós értékeket Livak ($\Delta\Delta Ct$) módszerrel határoztuk meg. Ezt követően a HEC-1A sejtekben a progeszteron receptor, activin receptor, IGF receptor-1, a JEG-3 sejtekben pedig a fentiek mellett a fraktalkin receptor kifejeződését vizsgáltuk Western blottal.

Eredmények: A fraktalkin befolyásolta a vizsgált gének expresszióját. A JEG-3 trophoblast sejtekben szignifikánsan emelkedett a progeszteron és CX3CR1 receptorok expressziója mind mRNS, mind pedig fehérjeszinten. Ugyanakkor az MMP2, MMP9 és IGFB1 gének expressziója is szignifikánsan növekedett. A HEC-1A endometrium sejteknél a fraktalkin inkább negatív hatást gyakorolt a vizsgált gének kifejeződésére.

Következtetés: A fraktalkin a trophoblast és az endometrium sejteken eltérő hatást fejt ki, mellyel megváltoztatja az implantációban szerepet játszó gének expresszióját.

Rövidítések: CX3CR1: fraktalkin receptor; PCR: polimeráz láncreakció; MMP2: mátrix metalloproteináz 2; MMP9: mátrix metalloproteináz 9, IGF: inzulinszerű növekedési faktor, IGFB1: inzulinszerű növekedési faktor B1

Támogatás: 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” című pályázatok támogatásával valósultak meg.

A LUTEIN OXIDATÍV STRESSZ ELLENI VÉDŐ SZEREPE BV-2 SEJTEK BEN

Pap Ramóna¹, Pandur Edina¹, Jánosa Gergely¹, Deli József², Sipos Katalin¹
1Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Biológiai
Tanszék, Pécs
2Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognózi Intézet,
Pécs

Bevezetés: A karotinoidok a természetben előforduló tetraterpének képviselői és minden növényi szervben előfordulnak, valamint megtalálhatók emberi és állati szervezetekben. Az oxidatív stressz különböző humán megbetegedések egyik komponense lehet, beleértve a daganatokat is. Számos tudományos tanulmány foglalkozik a karotinoidok oxidatív stressz elleni védő hatásával, de ennek vizsgálata idegrendszeri sejteken még nem történt meg.

Célkitűzés: A karotinoidok és származékainak reaktív oxigén gyökökkel szembeni antioxidáns preventív és/vagy protektív szerepének feltérképezése idegrendszeri sejteken.

Anyagok és módszerek: A mikroglia sejtek életképességének vizsgálatát különböző lutein és/vagy H₂O₂ koncentrációjú, 6, 24 illetve 48 óra időtartamú kezeléseket követően CCK-8 viabilitásassayvel végeztük. 5000 BV-2 sejtet kezeltünk 5µM illetve 10µM H₂O₂-dal, valamint 7.5ng és 10ng/µl luteinnel 6, 24 és 48 órán át. A kezeléseket után 10, 20, 30, 40, 50 és 60 percet követően mértük a reaktív oxigén gyök képződését deepred fluoreszcens ROS kit segítségével. A gyulladáshoz és anti-inflammatórikus citokinek (IL-4, IL-6, IL-10 és TNFα) génexpressziós vizsgálata real-timePCR segítségével történt actin housekeeping génre normalizálva.

Eredmények: BV-2 sejtekben a 10ng/µl lutein szignifikánsan csökkentette a TNFα gyulladáshoz citokinek expresszióját, ugyanakkor szignifikánsan emelte az IL-10 szuppresszor citokinek expresszióját a 24 órás kezelésben.

Következtetés: A lutein kezelés megváltoztatja a mikroglia sejtekben az inflammatórikus és anti-inflammatórikus citokinek génexpresszióját.

Rövidítések: CCK-8: cell counting kit 8, ROS: reaktív oxigén szabadgyök, RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció

OTKA K 128253

E.COLI FOTOLIÁZ MUTÁNS VIZSGÁLATA INFRAVÖRÖS TRANZIENS
ABSZORPCIÓS SPEKTROSKÓPIA SEGÍTSÉGÉVEL

Lukács András¹, Pasitka Jonatán¹, Grama László¹, Fekete Zsuzsanna¹, Stephen R. Meech²

1 Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai Intézet

2 University of East Anglia, School of Chemistry, Norwich, UK

A flavoproteinek családjának prominens képviselői a fotoliázok és kriptokrómok. Bár e két fehérje jelentős szekvenciahomológiát mutat, funkciójuk igencsak eltérő. A fotoliáz az UVfény hatására keletkező ciklobután-pirimidin és pirimidin-pirimidone DNS léziók javításáért felel baktériumokban, növényekben és egyes állatokban, míg a kriptokróm a cirkadián ritmus

sejtszintű befolyásolásában tölt be kulcs szerepet, főleg növényekben, állatokban és az emberben is. A funkciójuk betöltéséhez mindkét protein számára esszenciális a FADkofaktor jelenléte, melynek redox-állapot változása határozza meg, hogy az fehérjék képesek-e betölteni a feladatukat. A fotoliáz a FAD teljesen redukált állapotában képes a fent említett DNS hibák korrekciójára, míg a működőképes kriptokrómokban a FAD oxidált formában található. Az általunk először vizsgált E.coli fotoliázmutans előállításánál kapcsán feltételeztük, hogy amennyiben a 378. helyen található aszparagint (N378D) egy aszpartátra cseréljük, a FAD oxidált állapotba kerül és gyakorlatilag egy kriptokrómszerűfotoliázt fogunk nyerni. A vizsgálataink a hipotézisünket igazolták.

Növényi és állati eredetű kriptokrómok aminosav szekvenciájában a fotoliáz 378. aminosavjával identikus helyen többnyire nem aszpartát, hanem cisztein szerepel, ezért megkonstruáltuk az N378C mutánst, annak érdekében, hogy ennek a fotodinamikáját is feltérképezzük. Jelen munkában az N378C fotoliáz mutans infravörös tranziens abszorpciós spektroszkópiai karakterizálását mutatjuk be.

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

DNS: dezoxiribonukelinsav

„Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-2.-I. kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program támogatásával készült”

MATRIPTÁZ ENZIM AKTIVÁTOR ÉS INHIBITOR TESZTELÉSE PATKÁNY ÉS
HUMÁN PRIMER MÁJSEJT MODELLEKEN

Pomothy Judit Mercedesz¹, Barna Réka Fanni¹, Pásztiné Gere Erzsébet¹
1 Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest

A MT-2 egy TTSP, amely a vasanyagcsere szabályozásában vesz részt. A MT-2 a m-HJV hasításával képes megakadályozni a hepcidin átíródását. A hepcidin gátolja a vas felszívódását, illetve annak vasraktárakból való kijutását.

Kutatásunk során egy MTaktivátort, a S1P-ot és egy kereskedelmi forgalomban nem kapható 3-Apha alapvázú MT inhibitor (MI-460) használtunk annak kiderítésére, hogy ez a két vegyület milyen hatással van a patkány és a humán primer májsejt sejtéletképességére, hogyan változtatják meg a hepcidin termelődését, okoznak-e oxidatív stresszt és emelik-e egy gyulladáskeltő citokin, az IL-6 szintjét 24 órás kezelést követően.

A sejtéletképességre gyakorolt hatásukat MTS módszerrel, az oxidatív stresszt Amplex Red reagenssel, a hepcidin és az IL-6 mennyiségi változását patkány illetve humán specifikus ELISA kit segítségével határoztuk meg.

Az általunk tesztelt MTaktivátor és inhibitor a 24 órás kezelés alatt, a választott koncentrációkban nem bizonyult toxikusnak, nem növelte a hidrogén-peroxid termelődését és nem emelte meg az IL-6 gyulladáscitokin szintjét. A hepcidin expressziójának mintázata követi a MT enzim modulálásának jellegét, ami előrevetítheti a matriptáz aktivitását befolyásoló gyógyszerjelölt vegyületek terápiában való alkalmazásának lehetőségét.

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.2-16-2017-00012).

Apha: 3-amidino-fenilalanin

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat

H₂O₂: hidrogén-peroxid

IL-6: interleukin-6

m-HJV: membránhoz kötött-hemojuvelin

MI-460: matriptáz inhibitor 460

MT-1: matriptáz-1

MT-2: matriptáz-2

MTS:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxi-fenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium

S1P: szfingozin-1-foszfát

TMPRSS2: transmembraneserinprotease 2 (transzmembrán szerin proteáz 2)

TTSP: kettes típusú transzmembrán szerin proteáz család

A ROZMARINSAV VÉDŐ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MIKOTOXIN
EXPOZÍCIÓNAK KITETT IPEC-J2 SEJTVONALON

Pomothy Judit Mercédesz¹, Barna Réka Fanni¹, Szóládi Áron¹, Pásztiné Gere Erzsébet¹

¹ Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest

A trichotecén vázas *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok közé tartozik a DON és a T-2. Ezek a toxinok a mérsékelt égövön gyakran fordulnak elő a gabonafélék magvaiban és mérgezőek mind a haszonállatokra, mind az emberre. A rozmarinsav egy növényi polifenol vegyület, amely antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik.

Kutatásunk során az IPEC-J2 sejteket egyszerre kezeltük mikotoxinokkal és rozmarinsavval. Arra kerestük a választ, hogy a rozmarinsav képes-e a mikotoxin kezeléssel együtt adva megakadályozni a sejtréteg integritását csökkenését és alkalmas-e a H₂O₂ termelést mérsékelni.

Az oldatok IPEC-J2 sejtekre gyakorolt hatását MTS módszerrel, az oxidatív stresszt az extracelluláris H₂O₂ szint változás mérésével, a sejtréteg integritásváltozást TER és FD-4 módszerrel vizsgáltuk.

Az MTS módszerrel kiválasztottuk a mikotoxinok legmagasabb, még nem citotoxikus koncentrációikat, a rozmarinsavnál pedig azt, amelyik a legkedvezőbb a sejtleletképesség megtartása szempontjából. A mikotoxinok külön-külön szignifikánsan csökkentették a TER értékeket és szignifikánsan növelték az FD-4 átjutását a membránon. A rozmarinsav kezelés önmagában nem változtatott a sejtréteg integritáson. Az együtt kezelés hatására rozmarinsav alkalmas volt a mikotoxinok által indukált sejtréteg integritásváltozást megakadályozni és a H₂O₂ termelés mérséklésére is.

Támogatás: A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.2-16-2017-00012).

DON: deoxinivalenol

FD-4: fluoreszceinizotiocianát–dextrán 4 kDa (jelölő molekula)

H₂O₂: hidrogén-peroxid

IPEC-J2: Intestinal Porcine Epithelial Cell line-J2

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxi-fenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium

T-2: trichotecén-2 toxin

TER: transzepithéliális elektromos ellenállás

A BGP-15 kezelés javítja a kardiális funkciót Goto-Kakizaki patkánymodellen

Priksz Dániel, Bombicz Mariann, Varga Balázs, Gesztelyi Rudolf, Wilisicz Ticián, Lampé Nóra, Szilvássy Zoltán, Juhász Béla

Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debrecen

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS: A 2-es típusú cukorbetegség incidenciájának növekedésével a diabeteses cardiomyopathia is egyre növekvő egészségügyi terhet jelent. A BGP-15 gyógyszerjelöltről bízató eredményeket közölték diabeteses és izomsorvadásos állatmodelleken, targetként hősokkfehérjéket, mitokondriális proteineket és az energia-homeosztázis egyéb résztvevőit megjelölve. A tanulmány célja a BGP-15 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata diabétesssel összefüggő kardiális diszfunkcióban, Goto Kakizaki (GK) patkánymodellen. **MÓDSZEREK:** Az állatokat 5 csoportra osztottuk: (I) egészséges kontroll (Wistar); (II) kezeletlen GK (beteg kontroll); (III) BGP-15-kezelt GK; (IV) metformin-kezelt GK; (V) pioglitazon-kezelt GK, 12 hétig. A szívfunkciót Doppler echocardiográfiával monitoroztuk, vizsgáltuk az endothel-függő vazorelaxációt, valamint Western blot analíziseket végeztünk myocardium mintákon. **EREDMÉNYEK:** A BGP-15 kezelt állatoknál szignifikáns javulás mutatkozott echocardiográfiás paraméterekben (E/e' , e'/a' , Tei-index), a GK beteg kontrollhoz viszonyítva. A vazorelaxáció szignifikánsan romlott a beteg kontroll csoportban, melyen a BGP-15 kezelés nem változtatott. A foszfodiészteráz 9A (PDE9A) expressziója nem változott a kezelések hatására, ugyanakkor a Protein Kináz G (PKG) által foszforilált VASP protein foszforilációja, illetve a foszforilált foszfolambán (pPLN) mennyisége nőtt a BGP-15 kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva. **ÖSSZEGFOGLALÁS:** A BGP-15 javíthatja a szívfunkciót diabeteses cardiomyopathia modellen, összefüggésben a PKG útvonallal, vaszkuláris hatásoktól függetlenül. További vizsgálatok szükségesek a molekuláris targetek azonosításához és a gyógyszerjelölt preklinikai értékeléséhez.

TÁMOGATÁS: 20428-3/2018/FEKUTSTRAT. A prezentáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

pPLB: foszforilált foszfolambán

PKG: Protein Kináz G

PDE: foszfodiészteráz enzim

VASP: vazodilátor-stimulált foszfoprotein

TRANSZ-ZSÍRSAVAK TOXICITÁSA ÉS ENNEK ÖSSZEFÜGGÉSE A CERAMIDOK ÉS DIGLICERIDEK FELHALMOZÓDÁSÁVAL RINm5F INZULINÓMA SEJTEKBE

Sarnyai Farkas¹, Berinkeiné Donkó Mária², Mátyási Judit³, Gőr-Nagy Zsófia², Marczi Ildikó¹, Simon-Szabó Laura⁴, Zámbo Veronika¹, Somogyi Anna¹, Szelényi Péter¹, Kereszturi Éva¹, Tóth Blanka², Csizmadia Tamás⁵, Löw Péter⁵, Csala Miklós¹

¹Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

²Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Budapest

³B&B Analytics Ltd., Érd

⁴Magyar Tudományos Akadémia-Semmelweis Egyetem (MTA-SE), Patobiokémiai Kutatócsoport, Budapest

⁵Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

A magas szabad zsírsavszint, különböző sejtípusokra kifejtett káros hatásának (lipotoxicitás) kialakulásában kulcsszerepet játszik az emelkedett intracelluláris acil-KoA-kínálat. Ennek következménye a ceramidok felhalmozódása a sejtekben, ami ER-stressz és apoptózis kialakulásához vezethet. A telített palmitát toxicitása felülmúlja a cisz-telítetlen oleátét, valamint bizonyított, hogy az oleát képes csökkenteni a palmitát okozta károsodást. Mindamellet, hogy nagy érdeklődés övezi a transz-telítetlen zsírsavak (TFA) egészségre kifejtett káros hatásait, kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a transz-telítetlen elaidát és vakcenát által kifejtett sejt-károsító hatásokról.

Munkánk során RINm5F inzulinóma sejteken, a már említett négy zsírsav, magas koncentrációkban (250-500 μ M) kifejtett hatását vizsgáltuk életképességre, apoptózisra, ER-stresszre, JNK-foszforilációra és autofágiára. Ezen felül elemeztük a sejtek teljes zsírsavtartalmát, valamint ceramid- és diglicerid-szintjét GC-FID és LC-MS/MS módszerekkel.

A palmitát kiugróan, míg a cisz és transz telítetlen zsírsavak (UFA-k) alig bizonyultak toxikusnak kísérleteinkben. Az UFA-k, a palmitáttal ellentétben alig csökkentették az életképességet, valamint hatásuk az ER-stresszre, apoptózisra és autofágiára marginális volt. A ceramidok és trigliceridszintézis elakadását jelző digliceridek mennyisége palmitátkezelést követően növekedett meg leginkább. Az UFA-k esetében sokkal alacsonyabb felhalmozódás volt tapasztalható, azonban a TFA-kat tartalmazó ceramidok mennyisége jobban megemelkedett, mint az oleátot tartalmazóé. A palmitáttoxicitást mindhárom vizsgált UFA hasonló mértékben enyhítette. A kombinációs kezelések bizonyították, hogy az oleát és a TFA-k egyaránt csökkentik a palmitát okozta ceramid- és digliceridfelhalmozódást, azonban szembetűnő különbségek figyelhetők meg a cisz- és transz-zsírsavak anyagcseréje között. Eredményeink a TFA-k metabolizmusának olyan jellegzetességét tárták fel, amely az általuk kiváltott hosszútávú toxicitással is összefügghet, és ezért további kutatásra érdemes.

Rövidítések: acil-KoA – zsíracil-koenzim-A; ER – endoplazmás retikulum; TFA – transz telítetlen zsírsav; GC-FID – gáz kromatográf - láng ionizációs detektor; LC-MS/MS – folyadék kromatográf - tömegspektrométer/tömegspektrométer; UFA – telítetlen zsírsav.

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH: K 125201) és a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Biotechnológiai Kutatási Területén az Emberi Erőforrások Minisztériumának Felsőoktatási Kiválósági Programja (BME FIKP-BIO).

CERAMIDOK, DIGLICERIDEK ÉS TRIGLICERIDEK EGYIDEJŰ
MEGHATÁROZÁSA SEJTKULTÚRÁKBÓL SZÁRMAZÓ MINTÁKBAN HPLC-MS/MS
MÓDSZERREL

Somogyi Anna¹, Sarnyai Farkas¹, Berinkeiné Donkó Mária², Górnagy Zsófia², Csala Miklós¹, Tóth Blanka²

1 Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

2 Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Budapest

Zsírsvtúlkínálat esetén az acil-KoA-felesleg biztonságos felhasználásában kiemelkedő szerepe van a trigliceridek (TG) képződésének. Ehhez azonban megfelelő összetételű digliceridek(DG-k) felépítése szükséges. Ha a TG-szintézis a DG-k szintjén elakad, a lipidmetabolizmus a szfingolipid-keletkezés irányába tolódhat el. Ilyenkor pedig felhalmozódnak ezen útvonal központi intermedierei, a ceramidok, melyek sejten belüli káros hatásait már számos tanulmány bizonyította. A bioszintetikus lipid intermedierek vizsgálata tehát alapvető fontosságú a zsírsvtúlkínálat okozta stressz hatásainak vizsgálatában. A lipidek vizsgálatára több különböző módszer létezik, például a DG-kináz próba, vékonyréteg-kromatográfia, valamint folyadékkromatográfia, melyekhez detektorként UV vagy tömegspektrometriás detektálást használnak. A három vegyületcsoport (ceramidok, DG-k és TG-k) egyidejű mérésére azonban jelenleg nincs megfelelő módszer. A lipotoxicitásban kialakuló metabolikus stressz átfogóbb vizsgálatára kifejlesztettünk egy tandem tömegspektrometriával kapcsolt folyadékkromatográfias módszert (HPLC-MS/MS). A vegyületeket 26 perces futás alatt egy C8-as kolonnán választottuk el metanol/izopropanol és ammónium-acetát puffer gradiens elúcióval. A hagyományos mintaelőkészítést leegyszerűsítettük, és benne a metanol/kloroform elegyet metanol/izopropanol (1:1) eleggyel helyettesítettük. Belső standardként nem-fiziológiás, heptadekanoát tartalmú ceramid, DG és TG analógokat használtunk. A módszerhepatokarcinóma és inzulinómasejteken teszteltük. A bioszintetikus lipid intermedierek felhalmozódását 8 óra időtartamú palmitátkezelés után mértük. Jelentős ceramid-szint-emelkedés mellett a TG-szintézis csak telített láncot tartalmazó DG-k miatti elakadását észleltük, ami összhangban áll az irodalmi adatokkal. Az általunk kifejlesztett analitikai módszer jól felhasználható a lipotoxicitás vizsgálatára, valamint a szfingolipid- és glicerolipid-metabolizmus alaposabb tanulmányozására.

Rövidítések:

acil-KoA: zsíracil-koenzim A, TG: triglicerid, DG: diglicerid, HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, MS/MS: tandem tömegspektrometria

Támogatások: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K 125201).

CIANOBAKTERIÁLIS OSZTÓDÁS VIZSGÁLATA PROTEINSZÁRMAZÉKOKKAL

Surguta Sára Eszter^{1,a}, Leitner Izabella^{1,a},
Kanna Sai Divya¹, Domonkos Ildikó¹, Kis Mihály¹, Kócsó Annamária¹, Szilák László²,
Ughy Bettina¹

1 Szegedi Biológiai Kutatóközpont MTA, Szeged, Magyarország

2 Szilák Labor Kft., Szeged, Magyarország

a Egyenlő arányban járultak hozzá a kutatáshoz

A sejtosztódás az élő szervezetek egyik legfontosabb tulajdonsága. A bakteriális sejtosztódást évtizedek óta intenzíven tanulmányozzák, de még mindig sok nyitott kérdés van. A baktériumok osztódásakor az egyenlítői síkban megjelenik egy kontraktilis gyűrű, az ún. Z-gyűrű, aminek fő komponense az FtsZ fehérje. Ez egy GTP-áz fehérje, polimerizált formája kortikálisan helyezkedik el a sejtmembránhoz asszociálva. A gyűrű kialakulása, pozicionálása egy bonyolult folyamat eredménye, ami szükséges feltétele az osztódásnak, éppen ezért fontos tudni, hogyan épül fel és mi határozza meg a pontos helyzetét. Csoportunk előzetes kutatásai eredményeképpen megállapítottuk, hogy a foszfatidil-glicerín eloszlása hatással van a gyűrű kialakulására, helyzetére.

A cianobaktériumok fotoszintetizáló gram negatív baktériumok, a növényi plasztiszok ősei. Az osztódási folyamatuk tanulmányozása közvetlenül biotechnológiai, közvetve a növényi plasztisz-kutatási célt szolgál. Célunk, hogy megismerjük az FtsZ fehérje polimerizálásnak, az osztódási sík pozicionálásának, és magának az osztódásnak a pontos mechanizmusát. Ennek nyomán követésére zöld fluoreszcens fehérje (GFP) és FtsZ fehérje kimérát hoztunk létre. Előzetes információk szerint az FtsZ-GFP kiméra gént nem lehet teljesen szegregálni az endogén géntől. Ezért molekuláris szinten megterveztük a GFP pontos helyét, és az illesztési szekvenciákat, hogy lehetőleg ne zavarja a potenciális kölcsönhatásokat. A riporter molekula segítségével láthatóvá tettük az FtsZ-gyűrűt. A konstrukció lehetővé teszi az FtsZ fehérje kölcsönhatásainak feltérképezését, valamint a környezeti tényezők sejtosztódásra gyakorolt hatásának tanulmányozását. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy az osztódási sík kijelölésében, és a kialakuló sejt morfológiában az FtsZ döntő fontosságú, de az osztódásnak csak szükséges feltétele.

Támogatók: Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, Emberi Erőforrások Minisztériuma
UNKP-18-4 Kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja, GINOP-2.3.2-15-2016-
00058

Rövidítések: GFP - zöld fluoreszcens fehérje

A LEGFONTOSABB CITOPLAZMATIKUS LEBONTÓ FOLYAMATOK DINAMIKUS
MODELLJE

Sváb Gergely¹, Szederkényi Gábor², Tretter László¹

1 Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest

2 Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar,
Budapest

Napjainkban a sejtek metabolizmusának vizsgálata egyre fontosabb szerephez jut, mivel a sejtek működésében bekövetkező változások szinte mindig metabolikus eltéréseket okoznak, ezek a változások azonban gyakran nehezen vizsgálhatók. A sejtek metabolikus hálózatának feltérképezésével és egy erre épülő metabolikus modellel vizsgálhatóvá válna a sejtek különböző folyamatainak egymásra hatása.

Az irodalomban több modell is megtalálható, azonban ezek gyakran csak részfolyamatokat modelleznek, így az összefüggések jelentős része nem megfigyelhető, illetve paraméterezésük is komoly nehézségekbe ütközik, mivel az irodalomban az egyes enzimek kinetikai adatai között jelentős eltéréseket lehet találni, illetve az egyes anyagok sejten belüli koncentrációja is gyakran nehezen meghatározható.

Célunk a sejt metabolizmus dinamikus modelljének létrehozása, amely egy moduláris rendszer, az egyes biológiai részfolyamatok alkotják a modulokat, és ezek kapcsolódnak egymáshoz a közös intermediereken keresztül. Korábbi munkáinkban a mitokondrium anyagcseréjét (citrát kör, elektron transzportlánc) és transzportfolyamatait (malát-aszpartát és citrát-piruvát inga) modelleztük, jelen munkánkban további modulok létrehozása történt (glikolízis, urea ciklus, aminosavak lebontási útvonalai).

Eredményeink kvalitatívan jól mutatják a glikolízis intermedierek mennyiségének alakulását, az urea ciklusnál az ammónia eliminációjának dinamikáját, illetve az aminosavak transzaminálódása során tapasztalható folyamatosan változó egymáshoz kapcsolódó egyensúlyi rendszerek alakulását.

Az új modulok vizsgálata kvalitatív szempontból megfelelő eredményeket adott, ezért a későbbiekben (paraméterezésüket követően) integrálhatóak lesznek a korábbi modellbe mint új részrendszer, ezáltal további összefüggések megfigyelésére adhat lehetőséget.

AZ AUTOFÁGIA SZEREPE AZ AXONOK HALÁLÁBAN ÉS BEKEBELEZÉSÉBEN

Szabó Áron^{1,2}, Poulami Banik¹, Galambos Anna¹, Demeter Zsuzsanna¹, Juhász Gábor^{1,3}

1MTA SZBK, Genetikai Intézet, Szeged

2 SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

3 ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

Szöveg:

Az idegrendszer legsérülékenyebb elemei az axonok, amelyek akár egy méterre is nyúlhatnak, miközben külső behatások vagy patológiás állapotok bármely ponton sérülést okozhatnak szerkezetükben. Ilyen körülmények között a disztálisaxonrészben a sejtnyúlvány aktív degenerációja indul be, amely az axonfragmentációjához vezet. Az így keletkező fragmentetigliasejtek vagy makrofágok kebelezik be és takarítják el. Az elsődleges degenerációt másodlagos neurodegeneráció követi, ha a törmelék eltakarítása hibát szenved, illetve ekkor nem tud a sarjadzó új axon utat találni a célsejtjéhez. Nemcsak a sérülés, de az öregedéssel járó változások is axondegenerációhoz vezethetnek, amelynek mechanizmusa alig ismert. A sejtek fehérjedegradációs útvonalai részt vehetnek mind az axon, mind a glia részéről a degeneráció és az eltakarítás szabályozásában. Az autofágia szerepét vizsgálva ezekben a folyamatokban felismertük, hogy számos autofágia gén le- vagy kiütése neuronokban korfüggő axondegenerációt okoz a modellként használt *Drosophila* szárnyidegben. Jelenleg ennek mechanizmusát vizsgáljuk és zavart axonális transzportot és/vagy fehérjeaggregátumok felszaporodását a disztálisaxonvégekben sejtjük a kiváltó okok között. Más kísérleteinkben vizsgáltuk az autofágiának az axontörmelék eltakarításában a gliákban betöltött szerepét sérülés után, szintén az említett modellen. Eredményeink azt sugallják, hogy bizonyos autofágia gének nélkülözhetetlenek a gliákban, hogy azok megfelelően kebelezzék be a törmeléket. Az LC3-asszociált fagocitózis egy hasonló immunológiai transzportfolyamat, amelynek részvételét a gliális törmelékfalásban és emésztésben most kezdjük tanulmányozni. Összefoglalva, az axonok szerkezeti épsége és a gliák törmelék-eltakarító képessége függ az autofágiás degradációs útvonal bizonyos elemeitől, ami az autofágia gyógyszeres modulálása révén potenciális terápiás lehetőségeket rejt magában neurodegeneratív betegségek és traumás sérülések esetén.

LC3 - Microtubule-associated proteins 1A/1B lightchain 3B

HORMONRENDSZER DAGANATAINAK VIZSGÁLATA 3 DIMENZIÓS MODELLBEN

Szabó Borbála^{1,2}, Krokker Lilla³, Németh Kinga³, Mészáros Katalin^{3,4}, Patócs Attila^{1,3,4}, Butz Henriett^{1,3,4}

1 Nemzeti Bionika Program, Orvosebionikai Téma, Budapest

2 Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

3 Lendület Örökletes Daganatok Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, Budapest

4 Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Budapest;

Bevezetés. a daganatsejtek eltérően viselkednek in vitro és in vivo modellekben, amely megnehezíti többek között a daganatellenes szerekre mutatott rezisztencia mechanizmusok kutatását is.

A 3D sejtkultúrák jelentősége, hogy jobban modellezik a daganatok viselkedését a 2D monolayer sejtenyészetekhez képest.

Endokrin daganatokkal kapcsolatban elenyésző a 3D sejtenyészetekből származó információk, amelyek szükségessé teszik a korábbi, 2D sejtenyészeteken kimutatott eltérések megerősítését, újabb markerek és mechanizmusok feltárását

Módszerek. Hypophysis (RC4-B/C, GH3), valamint mellékvesekéreg carcinoma (H295R) sejtvonalak sferoid képződésének indukciója serum-free definedmedium (SFDM), ultra-lowattachmentplate (ULA), függőcseppkultúra valamint Mátrigél segítségével végeztük. Sejt életképesség és proliferáció vizsgálatához AlamarBlueassay-t alkalmaztunk. A hormontermelés monitorozása HPLC-MS/MS rendszerrel történt. Xenograft képző képességet SCID egerekben végeztük.

Eredmények. A hypophysis sejtek nem képeztek sferoidokat. Az RC4-B/C sejtek nagy sejtkonglomerátumokat alkottak, a GH3 sejtek kis csomókba tömörültek. Míg a GH3 sejtek aktívan formálnak xenograftot, az RC4-B/C sejtek 3D kultúrában tartás után sem képeztek daganatot SCID egerekben. A H295R sejtek SFDM módszerrel nem, de másik három módszerrel in vitro sferoid képzésre alkalmasak. A sferoidokban a sejtek további növekedést produkálnak, életképességük 10 nap után kezdett el csökkenni. A 3D kultúrák hormontermelése magasabb volt a monolayer tenyészetekhez képest.

Következtetés. A H295R sejtvonal in vitro 3D sferoid kultúrában tartható. Növekedésében és hormontermelésben hasonlít az in vivo mellékvesekéreg carcinomához, így jobban modellezheti ennek a rosszindulatú daganatnak a biológiai viselkedését.

Rövidítések:

SFDM: serum-free definedmedium

ULA: ultra-lowattachmentplate

SCID: severe combined immunodeficient (súlyos kombinált immunhiányos egér)

A GÖRÖGSZÉNA (TRIGONELLAFOENUM-GRAECUM) MAGŐRLMÉNY
INZULINÉRZÉKENYSÉGRE KIFEJTETT HATÁSÁNAK HUMÁN KLINIKAI
VIZSGÁLATA KIEGÉSZÍTVE A MELANIN-KONCENTRÁLÓ HORMON (MCH)
PLAZMASZINTJÉNEK MEGHATÁROZÁSÁVAL

Szabó Katalin¹, Kiss Rita¹, Gesztelyi Rudolf¹, Somodi Sándor², Kovács Péter², Szabó Zoltán³, Németh József¹, Priksz Dániel¹, Kurucz Andrea¹, Juhász Béla¹, Szilvássy Zoltán¹

1DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2DE ÁOK Belgyógyászati Tanszék

3Debreceni Egyetem ÁOK Sürgősségi Orvostan Tanszék

A metabolikus szindróma (MetS) kezelése a jelenkor népegészségügyének egyik legfontosabb világméretű kihívása, melynek egyik legártalmasabb részjelensége az elhízás talaján kialakult inzulinrezisztencia szindróma (IRS). Az IRS gyógyszeres terápiája jelenleg nem kellően megoldott, ugyanis szindróma lévén, erre az állapotra nem lehet gyógyszert törzskönyveztetni. Ezen előzmények alapján választottuk kutatásunk tárgyául a görögszéna (*Trigonella foenum-graecum*, továbbiakban TFG) magját, mint lehetséges szert az IRS kezelésében. A TFG a távol-keleti országok egyik legrégebbigyógy- és fűszernövénye, igazoltan kedvező hatása a szénhidrát- és zsírsanyagcsere zavaraiiban. Áldásos hatásaiért szteroid szaponin összetevői közül különösen a diosgenint, fehérje valamint szénhidrát komponensei közül pedig a 4-izohidroxiileucint ill. a galaktomannánt tartják felelősnek. Feltételezésünk szerint a TFG-mag szteroid szaponin tartalmának köszönhetően MCH-R1 (melanin-koncentráló hormon receptor 1) agonista tulajdonsággal rendelkezik, így hatékonyan képes beavatkozni a szénhidrát anyagcsere folyamataiba (fokozza a perifériás szövetek illetve a máj inzulin iránti érzékenységét, valamint az inzulinszekréciót a pancreas Langerhans-szigeteinek β -sejtjein található MCH-R1 aktiválásán keresztül). Az inzulinérzékenységre gyakorolt hatás jellemzésére HEGC (hiperinzuliniás-euglikémiásklemp), míg a plazma MCH-szint meghatározása RIA (radioimmunoassay) módszert használtunk. Vizsgálatunk prospektív, kettős vak, randomizált, placebo-kontrollált „pilot study” volt, melybe 13 egészséges önkéntest (6 férfi, 7 nő) vontunk be szigorú beválogatási kritériumok alapján melyek közül a legfontosabbak: 18-60 közötti életév, BMI = 18 - 18.5–30 kg/m², normál OGTT, a kórelőzményben nem szerepel ismert betegség. Az önkéntesekből két csoportot alakítottunk ki. A placebo csoport (2 férfi és 3 nő) napi 3x2 kukoricadarával töltött, vagyis aktív összetevő nélküli kemény zselatin kapszulát (1 kapszula = 500 mg), míg a kezelt csoport (4 férfi és 4 nő) napi 3x2 *Trigonella foenum-graecum* magőrleménnyel töltött kemény zselatin kapszulát kapott per os (1 kapszula = 500 mg). A 10 napos kezelési időszak első napján, valamint a kezelés befejezte utáni első napon HEGC-eljárást végeztünk 12 órás éhezést követően. Az inzulin - és az MCH szint meghatározásához szükséges vérminták levétele is az eljárások alatt történt. Eredményeink azt mutatták, hogy a 10 napos kezelés szignifikánsan javította az inzulinérzékenységet, továbbá szignifikánsan csökkentette a plazma MCH szintet a kezelt csoportban a kezelés előtti értékekhez képest. Ezekből arra következtethetünk, hogy a görögszéna magja ígéretes terápiás szer lehet MetS-ban az inzulinérzékenység kezelésére.

Tématámogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-00062

A SZINDEKÁN-4 BEFOLYÁSOLJA A RAC1/PAK1 JELÁTVITELT A
MIOBLASZTOKDIFFERENCIÁCIÓJA ÉS FÚZIÓJA SORÁN

Szabó Kitti¹, Mihály József², Petrilla Annamária¹, Zvara Ágnes³, Puskás László³,
Végh Attila Gergely⁴, Dux László¹, Keller-Pintér Anikó¹

1Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézet, Szeged

2MTASzegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Szeged

3MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Funkcionális Genomika Labor, Szeged

4MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizika Intézet, Szeged

A vázizom-sérülést követő regeneráció során a nyugvó szatellita-össejtek aktiválódnak, proliferálnak, mioblasztokká differenciálódnak, majd multinukleáris miotubulusokká fuzionálnak. A mioblaszt fúzióban kulcsszerepet játszik az aktin citoskeleton átépülését szabályozó Rac1 GTP-áz. A Rac1 mediált PAK1 foszforiláció a kofilinen keresztül befolyásolja az aktin depolimerizációját. A SDC4 proteoglikán szabályozza a Rac1-GTP szintjét, génkiütött egerekben a vázizom morfológiája és regenerációja sérül, azonban nem tisztázott, hogy a SDC4 hiánya hogyan vezet az izomregeneráció zavarához. Célunk volt a Rac1/PAK1 jelátvitel vizsgálata a SDC4 csendesítés hatására mioblasztdifferenciációban és fúzióban. C2C12 egér mioblaszt sejtek heparán-szulfát proteoglikán expresszióját qPCR technikával vizsgáltuk, a SDC4 szintjét shRNS-sel csökkentettük. A mioblasztok in vitro differenciációját szérummegvonással indukáltuk, majd a Rac1 aktivitást NSC23766-tal (50 uM) gátoltuk, a fehérjék expresszióját Western blottal vizsgáltuk. A sejtek fúzióját jellemző fúziós (miotubulus sejtmag/összes sejtmag) és differenciációs (multinukleáris/összes sejtszám) indexet dezminimmuncitokémiát követően számoltuk Digimizer képfeldolgozó programmal.

A mioblasztokban a vizsgált proteoglikánok közül a SDC4 expressziója a legmagasabb. A SDC4 csendesített sejtek differenciációja során megnő a MyoD miogenikus transzkripció faktor mennyisége, szignifikánsan megemelkedik a fúziós- és a differenciációs index. A foszfo-PAK1(Thr423) szintje szignifikánsan nő SDC4 csendesítés hatására (kontroll vs. shSDC4#1 vs. shSDC4#2: $0,407 \pm 0,05$ vs. $0,784 \pm 0,09$ vs. $0,767 \pm 0,09$ önkényes egység), míg NSC23766 kezelést követően a SDC4 csendesített sejtekben megfigyelhető MyoD és foszfo-PAK1(Thr423) emelkedés és a sejtek fúziója elmaradt.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a SDC4 mediált Rac1/PAK1 aktivitás szabályozás szerepet játszik a mioblasztok fúziójában, melynek háttérében többek között a foszfo-PAK1 aktin citoskeleton átrendeződésében betöltött funkciója állhat. Eredményeink hozzájárulnak a SDC4 vázizom fejlődésében és regenerációjában betöltött esszenciális szerepének megértéséhez.

Rövidítések: PAK (p21 aktivált kináz)1, SDC4 (szindekán-4)

Támogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-00040 projekt.

A SZABADIDŐS TESTMOZGÁS HATÁSA AZ ANTIOXIDÁNS/GYULLADÁSOS FOLYAMATOKRA SZÍVINFARKTUSON ÁTESETT ÖSZTROGÉNHIÁNYOS ÁLLATMODELLBEN

Szabó Renáta^{1,2}, Börzsei Denise¹, Karácsonyi Zoltán³, Gesztelyi Rudolf⁴, Magyariné Berkó Anikó¹, Hoffmann Alexandra¹, Veszelka Médea¹, Török Szilvia¹, Kupai Krisztina¹, Varga Csaba¹, Juhász Béla⁴, Pósa Anikó^{1,2}

1Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szeged

2Szegedi Tudományegyetem, Interdiszciplináris Kiválósági Központ, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

3Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar, Ortopédiai Tanszék, Debrecen

4Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debrecen

A miokardiális infarktus (MI) vezető halálteki tényező, mely incidenciáját és manifesztációját a menopauzát kísérő ösztrogénhiány nagymértékben növelheti. Kísérletünk célja a szabadidős testmozgás, mint nem-gyógyszeres terápiás lehetőség vizsgálata a noninvazív úton előidézett MI eseményeire kísérletes menopauzában.

Munkánkhoz 12 hetes nőtény Wistar kontroll (CTRL), valamint farmakológiai ovariektómiával (POVX, 750 µg/kg triptorelin, i.m., minden 4. héten) előidézett ösztrogénhiányos patkányokat használtunk. A MI kiváltásához β-adrenerg agonista izoproterenollal (0,1 g/kg, s.c.) kezeltük a CTRL és POVX nőtények egy részét. A MI-t követő 24. órában meghatároztuk a myoglobin, LDH értékeket, majd háromhetes pihenést követően az állatok egyes csoportjait futóketrecekbe helyeztük. Hathetes kísérleti periódust követően meghatároztuk a szívben mért antioxidáns hem-oxigenáz (HO) enzimek aktivitását és a HO-1 expresszióját; valamint a GSH tartalmat és a mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitását.

MI-t követően növekedett a myoglobin és LDH szint, melyek mértéke POVX nőtényekben szignifikánsan magasabb volt. A hathetes periódust követően a MI-on átesett POVX nőtényekben tapasztaltuk a legalacsonyabb HO aktivitást és HO-1 expressziót, míg a hathetes testmozgás szignifikánsan javította a HO és GSH értékeket CTRL és POVX nőtényekben egyaránt. A MI következtében megemelkedett MPO értékeket tréning protokollunk szignifikánsan csökkentette. A hathetes szabadidős testmozgás, az antioxidáns HO enzim és GSH szint up-regulációjával és a gyulladást jelző MPO értékének csökkenésével, a MI-t kísérő kórfolyamatok egy potenciális nem-farmakológias terápiás lehetősége, mely javíthatja a poszmenopauzában levő nők életkilátásait.

Munkánk az EFOP-3.6.1-16-2016-00008 projekt keretein belül készült. A kutatást az Emberi Erőforrások Minisztériuma támogatta 20391-3/2018/FEKUSTRAT.

Rövidítések: MI: miokardiális infarktus, CTRL: kontroll, POVX: farmakológiai ovariektómia, LDH: laktát dehidrogenáz, HO: hem-oxigenáz, GSH: glutation, MPO: mieloperoxidáz.

FEHÉRJE ALAPÚ NANOKOMPOZITOK IZOTÓPANALITIKAI VIZSGÁLATA

Szabó Tibor¹, Szabó Anna³, Janovics Róbert¹, Túri Marianna¹, Futó István¹, Rinyu László¹, Hernádi Klára³, Nagy László²

1 Magyar Tudományos Akadémia, Atommagkutató Intézet, Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium, Debrecen

2 Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet, Szeged

3 Szegedi Tudományegyetem, Alkalmazott és Környezeti kémiai Tanszék, Szeged

Különböző dimenziójú szén alapú nanoanyagok állíthatók elő (1-3D, csövek, kötegek, filmek, szivacsok, grafén lapok), melyek elkészítési módja és tulajdonságai az irodalomban széles körben tárgyaltak. Egyedülálló tulajdonságaiknak köszönhetően, ezek az anyagok igen ígéretesnek bizonyultak nemcsak laboratóriumi körülmények között, de akár iparban történő alkalmazásra is. A fehérje alapú bio-nanoanyagok, melyeket a „jövő anyagainak” tekintenek, forradalmi változást hozhatnak az integrált optika (pl.: optikai kapcsolók, mikroképzőanyagok, szenzorok, telekommunikációs technológiák, energiatermelés) területén.

Munkánk során számos szén alapú hordozó anyagot állítottunk elő, melyek között voltak tisztán szén alapú és egyéb atomokkal (nitrogén, kén) adalékolt anyagok is. Mindemellett teszteltük a különböző fém katalizátorok hatását a CVD szintézissel előállított szén nanocsövek tulajdonságaira. A beépült heteroatomok mennyiségét radiokémiai és izotópanalitikai módszerek segítségével határoztuk meg, ezt követően összevetettük a kapott anyagok fizikai és kémiai tulajdonságait. A heteroatomok szerkezetre gyakorolt hatását elektronmikroszkópiás eljárásokkal vizsgáltuk.

Az előállított hordozó anyagaink felhasználásával fehérje alapú bio-nanokompozitokat hoztunk létre. C14 tartalom meghatározásával megállapítottuk a fehérje (fotoszintetikus membránban elhelyezkedő reakciócentrum fehérje (RC) és torna peroxidáz enzim (HRP)) arányát a kompozitban, így annak ismeretében az abszolút enzimaktivitás is kiszámítható.

A munka az EFOP-3.6.2-16-2017-00005 “Ultragyors fizikai folyamatok atomokban, molekulákban, nanoszerkezetekben és biológiai rendszerekben” projekt támogatásával készült.

Rövidítések jegyzéke

CVD katalitikus kémiai gőzfázisú leválasztás

RC fotoszintetikus reakciócentrum fehérje

HRP torna peroxidáz enzim

MIKROFLUIDIKAI KAMRÁK FEJLESZTÉSE ZÖLDALGÁK MEGFIGYELÉSÉHEZ

Széles Eszter^{1,2}, Ábrahám Ágnes³, Kovács Sándor¹, Vass Imre¹, Podmaniczki Anna¹,
Kovács László¹, Galajda Péter³, Tóth Szilvia Zita¹

1 MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet, Szeged

2 Szegedi Tudományegyetem Biológiai Tudományi Doktori Iskola

3 MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet, Szeged

Az élet a Földön alapvetően a napfény fotoszintézissel történő energiává való átalakításán alapul. A növényekben és a zöldalgákban a fényenergia átalakítása kémiai energiává az elektrontranszportlánc reakcióival és a proton gradiens létrehozásával együtt a kloroplasztiszban, azon belül a tilakoid membránban történik. A zöldalgák kiemelkedő ökológiai jelentőséggel rendelkeznek, megfelelő modellszervezetek a különböző sejtfolyamatok tanulmányozására, valamint biotechnológiai szempontból is egyre nagyobb szerephez jutnak. Életfolyamataik minél pontosabb megismerése érdekében célul tűztük ki az egysejt-analízis megalapozását, a *Chlamydomonas reinhardtii* fajt használva modellszervezetként. Megközelítésünk mikrofluidikán alapul, amely lehetővé teszi kisszámú vagy egyedi algasejtek csapdázását, több napon keresztül történő nevelését, amely időszak alatt mikroszkóppal morfológiai vizsgálatokat végezhetünk, illetve klorofill-a fluoreszcenciával kombinálva a fotoszintetikus aktivitásról is értékes információhoz juthatunk. Három különböző típusú mikrofluidikai kamrát fejlesztettünk ki a *Chlamydomonas reinhardtii* vizsgálatához, eltérő célokra: Az első típus egy háromosztatú kamra, amely alkalmas szinkronizált sejtpopulációk több napos megfigyelésére, folyamatos tápanyagellátás mellett. A második kamra típus egyetlen sejt csapdázására alkalmas „tulipán” alakú csapdából áll, ami lehetőséget teremt arra, hogy anélkül figyeljünk meg egy-egy sejtet, hogy valamilyen szilárd hordozó felülethez kellene kötnünk, ezáltal fotoszintetikus aktivitásuk több órán keresztül folyamatosan mérhető. A harmadik típusú kamra szintén egyetlen sejt befogására alkalmas csapdából áll, amely lehetővé teszi az utódsejtek felnevelését is, amely által a klorofill-a fluoreszcenciával kombinálva értékes információhoz juthatunk a sejtciklus alatt bekövetkező fotoszintetikus változásokról.

A SZARKOMERIKUS M-KOMPLEX NANOSEBÉSZETI ANALÍZISE

Sziklai Dominik¹, Professzor Dr. Kellermayer Miklós², Dr. Mártonfalvi Zsolt²

1 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet TDK hallgatója,
Budapest

2 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A harántcsíkolt izom egysége, a szarkomer, állandó erőhatás ellenére megtartja szerkezetét, integritását. Ebben fontos szerepet játszik a középvonalaiban húzódó M-csík, mely miozinfilamentumok centrális régióiból, a titin óriásfehérje átlapoló C-terminális szakaszaiból és asszociált fehérjékből felépülő struktúra. Feltételezzük, hogy az M-csík szerkezeti egysége a miozin vastag filamentumhoz asszociált titinmolekulák fej-fej irányú oligomerizációjából kialakuló M-komplex, melynek pontos tulajdonságai nem ismertek. Kutatásunkban az M-komplex szerkezeti és nanomechanikai feltárását végeztük. Az M-komplexet oligomerizálódotttitinmolekulákon vizsgáltuk. A titint nyúl longissimusdorsiból izoláltuk, nagy ionerővel fehérje-extrakciós, kicsapási, centrifugálási és kromatográfiás lépésekkel. Az izolált M-komplexek szerkezetét csillámfelületre adszorbeálást követően atomi erőmikroszkóppal (AFM) vizsgáltuk. Az M-komplex a pontszimmetrikus titinoligomér centrális, 3-4 nm átmérőjű globuláris eleme, melyhez leggyakrabban 12, sugárirányból kapcsolódó titinmolekula asszociálódott, összhangban a modellel, miszerint egy miozin vastag filamentum mindkét végéhez 6-6 titin kapcsolódik. Az oligomerizálódotttitinmolekulák hosszát 500 nm-nek mértük, a titin monomerek hosszát 782 nm-nek. A szerkezetet és nanomechanikát molekuláris nanosebészeti módszerrel tártuk fel: az AFM tűt kb. 1 nN erővel az M-komplexbe nyomtuk, majd azt a tű laterális mozgásával szétszalasztuk. Változtattuk a tű mozgásának irányát (1-360°), sebességét (5-100 nm/sec) és amplitúdóját (10-300 nm). Az M-komplexekből 0,1-0,3 nm átmérőjű, 50-200 nm kontúrhosszú, filamentális jellegű, egymáshoz hasonló képleteket tudtunk kihúzni, amely arra utal, hogy a komplexben nagymennyiségű extenzibilis molekuláris rezervoár található. A túlnyújtott szálak jelentős megnyúlás (2-3x) után szakadtak el. Az M-komplex nanosebészeti beavatkozás előtti és utáni térfogatait összehasonlítva átlagosan 50%-os növekedést tapasztaltunk, miszerint nem csupán rugalmas alakváltozás, hanem szerkezetváltozás, fehérje-kigombolyodás lépett fel. A nanosebészettel sikerrel tártuk fel a bonyolult szerkezetű M-komplex néhány nanofizikai tulajdonságát.

PI3K JELÁTVITELI ÚTVONAL AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA
AUTOREAKTIVBSEJTEKBEN

Telek Vivien¹, Rapp Judit¹, Balogh Péter¹, Minier Tünde², Czirják László², Berki Tímea¹, Simon Diána¹

1 Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs

2 Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Reumatológiai és Immunológiai Klinika, Pécs

Célkitűzés A szisztémás sclerosis (SSc) egy érkárosodással és több szövetet érintő fibrózissal járó szisztémás autoimmun betegség. A kórkép kialakulásának kezdeti eseményei közé tartozik a B-sejtek aktivációja, mely autoantitest és citokin termeléssel társul. A PI3K jelátviteli útvonal fontos alkotóeleme a B-sejt receptoron (BCR) keresztüli klasszikus B sejtaktiválásnak. PI3K jelátviteli útvonal egyik központi eleme az Akt, de más útvonalak is befolyásolhatják aktiválódását, mint például mTOR és MAPK. Kutatásunk célja a PI3K útvonalhoz kapcsolódó Akt, NF-kB és S6 foszforilációjának vizsgálata SSc betegek Bsejtjeiben.

Módszer Perifériás vérből CD19+ B-sejteket szeparáltunk korai diffúz cutanSSc (dcSSc) és egészséges kontroll vérmintákból. 92 PI3K útvonalhoz kapcsolt gén mRNS expresszióját mértük TaqmanqPCRarray segítségével. Az izolált B-sejteket anti-CD180, anti-IgG/M antitestekkel és a kettő kombinációjával stimuláltuk. A foszforilált Akt (pS473), NF-kB p65 (pS529) és S6 (pS235/pS236) pozitív sejtek arányát áramlási citometriával határoztuk meg.

Eredmények A B sejt PI3K útvonal analízise során a veleszületett immunitásban szerepet játszó molekulák emelkedett expresszióját mértük, míg a CD180 molekula expressziója szignifikánsan csökkent a korai kezeltlenSSc betegekben. Anti-CD180 kezelés hatására a foszforilált Akt, S6 és NF-kB pozitív B sejtek aránya elmaradt SSc-ben a kontrollhoz képest.

Az S6 és NF-kB esetében emelkedett az arány a stimulálatlan sejtekhez viszonyítva, de nem érte el az anti-Ig okozta aktiválási szintet. Az anti-CD180 kezelés hatása a legmarkánsabb NF-kB esetében volt a HC mintákon.

Következtetés Az autoimmun kórképekben részben vizsgált, veleszületett immunválaszegyik elemének tartott CD180 molekula jelátvitele SSc B sejtekben sérült a kontrollhoz képest. A vizsgált PI3K asszociált molekulák foszforilációs mintázata SSc B-sejtekben különbözik az egészségesektől, melyek pontosabb megismerése hozzájárulhat új terápiás célpontok azonosításához.

Rövidítések:

dcSSc – Diffúz cutan szisztémás sclerosis

BCR – B sejt receptor

mTOR – mammalian target of rapamycin

MAPK – mitogénaktivált proteinkinázok

PI3K – Foszfatinilinozitol-3 kináz

HC – egészséges kontroll/healthy control

A PHT7, EGY FELTÉTELEZETT ASZKORBÁT-TRANSPORTER VIZSGÁLATA
CHLAMYDOMONASREINHARDTII-BAN

Tóth Dávid¹, Ferenczi Áron², André Vidal-Meireles¹, Juliane Neupert³, Ralph Bock³,
Soujanya Kuntam¹, Kovács László¹, Molnár Attila², Tóth Szilvia Zita¹

1 MTA SZBK Növénybiológiai Intézet, Szeged

2 Institute of Molecular Plant Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh

3 Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm

Az aszkorbát (C-vitamin) a növényi sejtekben mindenhol előforduló multifunkcionális szereppel rendelkező metabolit. Fontos feladata a reaktív oxigéngyökök semlegesítése, de szerepet játszik a sejtosztódásban, a sejtfa bioszintézisében, a redox jelátvitelben és egyes enzimek aktivitásának szabályozásában is. A xantofill-ciklusban mint a violaxantindeepoxidázkofaktora vesz részt, így szerepe van a nem-fotokémiai kioltásban (NPQ) is. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként viselkedik, amennyiben a vízbontó komplexet előzőleg hővel inaktívtuk.

Növényekben az aszkorbát bioszintézisének fő útvonala a Smirnov-Wheeler útvonal. A bioszintézis utolsó lépése a mitokondriumban zajlik, és számos membránrendszeren kell átjutnia, ahhoz, hogy sejten belüli feladatait ellássa. Az aszkorbát diffúzióval nem jut át a membránokon egyrészt negatív töltése, másrészt pedig mérete miatt tehát nagy valószínűséggel aszkorbát-transzporterek teszik lehetővé az átjutást. Magasabb rendű növényekben eddig csak egy aszkorbát transzportert azonosítottak, ez a kloroplasztisz külső membránjában található PHT4;4 fehérje. Zöldalgákban eddig nem azonosítottak aszkorbát transzportert. Az AtPHT4;4 fehérjének 3 homológját (PHT3, PHT4, PHT7) találtuk meg Chlamydomonas reinhardtii-ban. A fehérjék funkciójának vizsgálatához CRISPR/Cpf1 genomszerkesztéssel knockout mutánsokat hoztunk létre. A PHT7-es knockout mutánsok lassabb növekedést, megváltozott aszkorbát metabolizmust és megváltozott fotoszintetikus aktivitást mutattak magas fényintenzitáson. A PHT7-es mutánsok genetikai komplementációjával sikerült a mutánsok fenotípusát helyreállítani.

Eredményeinkkel hozzájárulhatunk az aszkorbát metabolizmusának jobb megértéséhez, ami hosszútávon segítheti C-vitaminban gazdagabb növényfajták előállítását.

NPQ: nem-fotokémiai kioltás, PSII: második fotokémiai rendszer

A PKD3 és HSP90 KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA ANDROGÉN-FÜGGETLEN
PROSZTATA TUMOR SEJTEKBEN

Varga Attila¹, Bártai Bence², Gyulavári Pál¹, Nguyen Minhtu³, Sóti Csaba³, Vántus Tibor^{1,3}

1 MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport, Budapest

2 MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoport, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

3 Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

A prosztata tumor férfiakban a második leggyakrabban előforduló daganatos megbetegedés. A PKD3-as izoforma bizonyítottan meghatározó jelentőséggel bír az agresszívan terjedő androgén-független prosztata tumorok progressziójában. A HSP90 számos fehérje konformációs stabilitását biztosítja, valamint tumor sejtekben nagyobb mennyiségben expresszálódik a normál sejtekhez képest, hozzájárulva ezzel a tumor onkogének és a tumor progressziót elősegítő fehérjék működéséhez. A jelenlegi munkában azt vizsgáltuk, hogy a PKD3 és HSP90 esetében van-e kliens-chaperon kapcsolat androgén-független prosztata tumorok esetében.

Kísérleteinket két androgén-független prosztata tumor sejt vonalon (DU145, PC3) végeztük. A sejtek életképességének vizsgálatához tripánkék kizárásos sejt számolást használtunk. Az apoptózis vizsgálatát Annexin V és propídium-jodid jelöléssel, áramlási citométer segítségével végeztük. A fehérjeszintek detektálásához western blot módszert alkalmaztunk. A fehérje-fehérje kapcsolatot ko-immunprecipitációval mutattuk ki.

Eredményeink alapján a klinikai fázisvizsgálat alatt lévő HSP90 gátló ganetespiapoptózt indukált és szignifikánsan csökkentette az androgén-független prosztata tumor sejtek életképességét dózisfüggő módon. A CRT0066101 PKD inhibitor hatására szintén jelentősen csökkent a sejtek életképessége dózisfüggő módon. A két fehérje közötti kapcsolat karakterizálása során a következő eredményeket kaptuk: 1.) a HSP90 gátló ganetespi hatására a PKD3 fehérjeszint csökkent, 2.) ko-immunprecipitációval kimutattuk, hogy a PKD3 és a HSP90 között közvetlen fizikai kapcsolat van, 3.) HSP90 gátlás hatására a PKD3 a proteaszómában bomlik le. Ez utóbbi eredmények a PKD3-HSP90 kliens-chaperon kapcsolatot támasztják alá.

A fenti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a PKD3 és HSP90 között kliens-chaperon kapcsolat áll fenn, azonban a kapcsolat részletesebb karakterizálásához további kísérletek szükségesek. Ezek az eredmények segíthetnek a prosztata tumorok patológiás jelátvitelének további megértésében, illetve új terápiás módszerek megalkotásában.

PKD3 – Protein Kinase D3, HSP90 – HeatShock Protein 90

EPIDERMÁLIS TRP CSATORNÁK SZEREPE A VISZKETÉS KIALAKULÁSÁBAN
SZEREPET JÁTSZÓ SZIGNALIZÁCIÓS FOLYAMATOKBAN

Vladár Anita¹, Herczeg-Lisztes Erika¹, Kelemen Balázs¹, Hanyicska Martin¹, Bíró Tamás^{2,3}, Tóth István Balázs¹

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet, Debrecen

²Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Immunológia Intézet, Debrecen

³HCEMM Nonprofit Kft., Szeged, Hungary

Bevezetés: A TRP ioncsatornák 6 transzmembrán doménnel rendelkező, többségükben Ca²⁺ ionokra permeábilis non-specifikus kationcsatornák. A bőr szenzoros funkciói szempontjából elsősorban a TRP család multimodális termoszenzitív tagjai, a TRPV1-4, TRPA1, és a TRPM8 bírnak jelentőséggel. A bőrben az érző neuronok mellett számos nem neurális sejtben is leírták szenzoros TRP csatornák jelenlétét és kimutatták szerepüket a keratinociták és a bőrfüggelékek élettani folyamataiban. Jelen project keretében a keratinociták és a rajtuk kifejeződő hőérzékeny TRP csatornák szerepét vizsgáljuk a viszketés és az ehhez kapcsolódó pruriceptív szignálok kialakulásában.

Módszerek: Sebészeti mintákból izolált primer NHEK sejteken tanulmányozzuk a pruritogén szignalizációban szerepet játszó molekulák és a TRP csatornák expresszióját (RNASeq, Q-PCR) és funkcióját (intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérése, ELISA).

Eredmények: Számos szenzoros TRP csatorna expresszáldott az NHEK sejteken, legnagyobb mértékben TRPV3 és TRPV4, melyek funkcionalitását Ca²⁺ mérések segítségével igazoltuk. Emellett a keratinociták több olyan receptort is expresszáltak, amelyek szerepet játszhatnak viszketés (pruritus) kialakulásában (pl. proteináz aktivált receptor 2, TLR3, H1 hisztamin receptor stb.). Ezen potenciálisan pruritogén receptorok aktivációját követően azt tapasztaltuk, hogy a TLR3 aktivációja poly(I:C)-vel jelentősen fokozta a gyulladásos folyamatokban is szerepet játszó TRPV3 expresszióját és a TRPV3 agonisták által kiváltott válaszokat, de nem befolyásolta a TRPV4 aktivitását. Más pruritogén szignálok nem befolyásolták jelentősen a TRPV3 expresszióját. A TLR3 aktivációja emellett jelentősen fokozta egyes gyulladásos citokinek és a viszketést kiváltó ET-1 expresszióját. ELISA módszer segítségével kimutattuk, hogy poly(I:C) kezelés hatására az endotelin felszabadulás is jelentősen megemelkedett.

Következtetések: Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az epidermális TRPV3 ioncsatorna szerepet játszhat egyes viszketést kiváltó szignálok transzdukciójában és a keratinociták mediátor termelésében.

Rövidítések jegyzéke:

TRP- tranziens receptor potenciál

TRPV- tranziens receptor potenciál csatorna, vanilloidszubsztípus

TRPA- tranziens receptor potenciál csatorna, ankyrinszubsztípus

TRPM- tranziens receptor potenciál csatorna, melastatinszubsztípus

NHEK- normál humán epidermáliskeratinocita

TLR3- toll like receptor 3

poly(I:C)-polyinosinic:polycytidylic sav

ET-1- endotelin 1

A ZSÍRSAVDESZATURÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ
ELEKTRONTRANSZFER VIZSGÁLATA

Zámbó Veronika¹, Simon-Szabó Laura², Kereszturi Éva¹, Mátyási Judit³, Gór-Nagy Zsófia³, Tóth Blanka³, Csala Miklós¹

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

2Patobiokémiai Kutatócsoport (MTA-SE)

3Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

A telített zsírsavak túlkínálata metabolikus és jelátviteli stresszt okoz a sejtekben, ami telítetlen zsírsavak együttlásával vagy a telítettek sejtben belüli deszaturációjával enyhíthető. A telített zsírsavak első kettős kötését kialakító sztearil-KoA-deszaturáz (SCD1) enzim tehát a lipotoxicitás elleni sejt szintű védekezés fontos szereplője. Az endoplazmás retikulum (ER) membránjában elhelyezkedő enzim a citokróm b5-reduktáz (Cyb5R) és citokróm b5 (Cyb5) membránfehérjék vagy a citoszolikus NAD(P)H citokróm-b5-oxidoreduktáz Ncb5or fehérje közvetítésével jut a működéséhez szükséges elektronokhoz.

Az Ncb5or KO egerekben fokozott lipotoxicitást írtak le, ami azt valószínűsíti, hogy az elektrontranszfer kapacitása a deszaturáció korlátja lehet. Ezt a feltételezést kívántuk tesztelni sejtmodellben a deszaturációs enzimrendszer egyes elemeinek túltermelésével és a telítetlen/telített zsírsavarány változásának nyomon követésével.

Az Ncb5or, SCD1, Cyb5 és Cyb5R fehérjék kódoló szekvenciáját pcDNA3.1⁺ expressziós vektorba inszertáltuk és ligáltuk. A konstrukciókat egyenként vagy kombinációkban transzfektáltuk HEK293T sejtekbe. A transzfektálás eredményességét mind mRNS-, mind fehérjeszinten (RT-PCR és Western blot) ellenőriztük. A sejtek zsírsavprofilját GC-FID módszerrel tanulmányoztuk.

Az SCD1-transzfektált sejtekben jelentősen megnövekedett a telítetlen/telített zsírsavarány, azonban az ER-membránban lokalizált (Cyb5 és Cyb5R) vagy az alternatív citoszolikus (Ncb5or) elektronszállítók expressziója nem befolyásolta a deszaturáz működését. Ellenőriztük az elektrontranszfer erősítésének esetleges hatását az SCD1-et túltermelő sejtekben is, hátha ilyen körülmények között már korlátozza az enzim működését a redukáló forrás elérhetősége, de a kotranszfektálás sem emelte tovább a telítetlen zsírsavak arányát.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a vizsgált sejt típusban a zsírsav-deszaturáció folyamatának sebességmeghatározó lépését az SCD1 enzim katalizálja, és még az SCD1 túltermelésével sem sikerül olyan körülményeket teremteni, hogy az elektrontranszfer legyen a szűk keresztmetszet. Mivel az Ncb5or KO fenotípusa leginkább a hasnyálmirigy β -sejtjeit és a májat érinti, érdemes lehet a kísérleteket inzulinóma és hepatóma sejvonalakon is elvégezni.

Rövidítések: ER: endoplazmás retikulum, SCD1: sztearil-KoA-deszaturáz, Cyb5/b5R: citokróm b5/ citokróm b5-reduktáz, GC-FID: gázkromatográfia lángionizációs detektorral

A LIPIDMETABOLIZMUSMIKROHETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA
TUMOROKBAN – A FINOMFELBONTÁS NÖVELESE

Zsiros Vanda¹, Péter Mária¹, Migh Ede², Tizslavicz László³, Török Zsolt¹, Horváth Ibolya¹, Horváth Péter², Vígh László¹, Balogh Gábor¹

1 MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Molekuláris Stresszbiológia Csoport, Szeged

2 MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport, Szeged

3 Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Szeged

Mára nyilvánvalóvá vált, hogy a rákos sejtek működésének finom részletei csak a szöveti mikrokörnyezetükkel való kommunikáció kontextusában tárhatóak fel. Ismert, hogy a tumorsejtek átállítják lipidmetabolizmusukat, és ennek nagy jelentősége van a sejtosztódás és migráció szabályozásában, azaz a tumor agresszivitásában, ill. áttétképző képességében. Mindez azt jelenti, hogy a lipidháztartás gyógyszeres befolyásolása új terápiás lehetőségeket kínálhat. Jelen munkában egy lézerdisszekcióval kombinált mikrolipidomikai/mikrometabolomikai módszert dolgoztunk ki a tumorsejtek heterogenitásának és az őket körülvevő sejtek metabolikus kommunikációjának felderítéséhez. Eljárásunk főbb lépései a következők: 1) egér modellekből, illetve műtéti humán mintákból párhuzamos natív fagyasztott metszeteket készítünk, 2) az egyik metszetet hematoxin-eozin festéssel tesszük a patológiai elemzés számára vizsgálhatóvá, majd 3) a párhuzamos metszetről készült autofluoreszcenciás képeket számítógépes algoritmus segítségével fedésbe hozzuk (regisztráljuk) a hematoxin-eozin festett képpel. 4) A patológiai elemzés alapján kiválasztott régiókat a natív metszetről nagyenergiájú lézerral kivágjuk. 5) Az egyedi szövetdarabkákat mikroextraháljuk, végül pedig 6) az extraktumot a tömegspektrometriához optimalizált szolvensben standardok hozzáadása mellett robotizáltnanoinjekcióval nagy felbontású nagy érzékenységű tömegspektrométerrel elemezzük.

Megállapíthatjuk, hogy módszerünk nagy felbontással (50 - 100 mikrométer) képes pontos mennyiségi képet adni a tumorok és az ép szövetek lipidomjáról, ill. számos egyéb metabolitjáról. Poszterünkön bemutatjuk első eredményeinket, melyek alátámasztják a tumorok diagnosztikus értékű egyedi metabolikus eltéréseit. Terveink között szerepel a mikrolipidomikai módszer összekapcsolása mikrotranszkriptomikával, mely révén a tumorok fejlődésének és metabolikus heterogenitásának rendszerszintű elemzése válhat lehetővé.

A poszter elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A GM-CSF RECEPTOR INTERNALIZÁCIÓJÁNAK SZEREPE A GYULLADÁS
INDUKÁLTA HÁM-MESECHYMA ÁTALAKULÁS JELÁTVITELI FOLYAMATÁBAN
MESOTHEL SEJTEKBE

Zsiros Viktória¹, Katz Sándor¹, Doczi Nikolett¹, L. Kiss Anna¹

¹Semmelweis Egyetem, Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

Korábban igazoltuk, hogy Freund adjuváns indukálta gyulladás során a patkányok hashártyájának mesothel sejtjei elveszítve laphám tulajdonságaikat, makrofág markereket (ED1) expresszálnak, fagocitotikus aktivitásuk fokozódik, gyulladásos citokineket termelnek, és receptoraikat expresszálják. In vitro primer kultúra létrehozásával igazoltuk, hogy a TGF- β , GM-CSF citokinekkal való kezelés hasonló fenotípusos átalakulást indukál (EMT II). Bizonyítottuk, hogy ezen folyamat során a mesothel sejtekben GM-CSF kezelés hatására nő az ED1 expressziója, GM-CSF-t termelnek, és receptorát expresszálják.

Előzetes kísérleteink azt mutatták, hogy a GM-CSF jelátviteléhez a receptor-ligand internalizációja elengedhetetlen. Jelen munkánkban arra kerestünk választ, hogy a receptor milyen útvonalon internalizálódik, milyen endocitotikus struktúrákban (korai, késői és reciklizáló endoszóma) mutatható ki a jelátvitel során.

Immuncitokémiai, biokémiai és statisztikai módszerekkel vizsgáltuk a jelátvitel beindításáért felelős GM-CSF receptor β expresszióját, és kolokalizációját különféle endocitotikus markerekkel (Cav-1, EEA1, Rab7, Rab11a) a gyulladás, és az azt követő gyógyulás során. Vizsgáltuk a GM-CSF jelátviteli folyamatában fontos szerepet játszó STAT5A transzkripciós faktor foszforilációját, sejten belüli eloszlását, valamint a jelátvitel negatív regulátorának, a SOCS1-nek expresszióját.

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a gyulladás során jelentős mennyiségben expresszáldó GM-CSFR β a mesothel sejtekben caveolák közreműködésével internalizálódik, majd korai endoszómákba kerül, ahol végbemegy a JAK2-mediált STAT5A tirozin-foszforilációja. Ha a GM-CSFR β dynamin-függő endocitózisát dynasore-ral gátoljuk, a STAT5A nem foszforilálódik, igazolva, hogy a receptor β internalizációja nélkül a jelátviteli folyamatok nem mennek végbe. A gyulladás korai stádiumában a receptor β reciklizáló endoszómák révén visszakerül a sejtfelületre, majd a gyulladás lecsengésével - a SOCS1 közreműködésével - a receptor késői endoszómákba szállítódik, és lizoszómális degradáció útján lebomlik, így megindulhat a regeneráció.

Rövidítésjegyzék: EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition); GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor); GM-CSFR (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor); Cav-1 (Caveolin-1); EEA1 (Early Endosome Antigen 1), Rab (RAS-like proteins from rat Brain); STAT5A (Signal Transducer and Activator of Transcription 5, A izoform); SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1)