

EFFECT OF PHOTOSYSTEM I OLIGOMERIZATION ON ENERGY TRANSFER IN THE
CYANOBACTERIAL THYLAKOID MEMBRANESAkhtar Parveen¹, Biswas Avratanu¹, Balog-Vig Fanny¹, Kovács László¹, Lambrev Petar H¹¹ Szegedi Biológiai Kutatóközpont

The light reactions of photosynthesis are carried out by protein complexes in the thylakoid membranes, such as the two photosystems. Plants and eukaryotic algae have specialized membrane-bound light-harvesting antenna complexes that increase the absorption cross-section of the photosystems. In cyanobacteria, the main light-harvesting function is carried out by the phycobilisomes – large water-soluble protein complexes attached peripherally to the thylakoid membrane, containing pigment-binding phycobiliproteins such as phycocyanin and allophycocyanin. Unlike its eukaryotic counterpart, photosystem I (PSI) is trimeric in many cyanobacterial species, and the physiological significance of this is not well understood. Here we compared the composition and light-harvesting function of phycobilisomes in cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (WT), which has primarily trimeric PSI, and two mutant strains, $\Delta psal$ and $\Delta FIJL$, which contain only monomeric PSI. Both strains with monomeric PSI accumulated significantly more allophycocyanin per chlorophyll, indicating higher abundance of phycobilisomes. On the other hand, a higher phycocyanin:allophycocyanin ratio in WT suggests larger phycobilisomes or the presence of phycobilisomes without allophycocyanin (CpCL-type), that are not assembled in cells with monomeric PSI. Steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy at room temperature and 77 K revealed that PSII receives more energy from the phycobilisomes at the expense of PSI in cells with monomeric PSI, regardless of the presence of PsaF. Taken together, these results show that the oligomeric state of PSI has an impact on the excitation energy flow in *Synechocystis*, which might be one physiological and evolutionary advantage of trimeric PSI in cyanobacteria.

DIRECT CYCLODEXTRIN EFFECTS ON VOLTAGE-GATED K⁺ CHANNELS

Al-Amin Ali Magashi, Florina Zakany, Zoltan Varga

University of Debrecen, Faculty of Medicine, Department of Biophysics and Cell Biology

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides with three well-known members, α , β and γ , differing only in size. Their prospective application in the treatment of cholesterol driven diseases derives from their ability to form water-soluble complexes with various molecules, including cholesterol, and transport them. This allows for their potential use in research and clinical practice in the treatment of diseases, such as Niemann-Pick type C disease. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin is used preferentially in clinical practice, while methyl- β -cyclodextrin (M β CD) is used routinely in research to extract cholesterol from cell membranes.

Many studies have shown indirect effects of M β CD on ion channels attributed to changes in membrane parameters due to cholesterol extraction. However, in our laboratory, previously conducted experiments have shown their direct blocking effects on Kv1.3 voltage-gated potassium channels, which were independent of CDs' inherent cholesterol extracting effect. The aim of our study was to test the selectivity of this direct effect. Thus, M β CD was tested on three other voltage-gated K⁺ channels, namely Kv1.1, Kv1.2 and Kv11.1 (hERG), which are found in neurons and cardiac cells.

CHO and HEK cells were used for channel expression: the former transiently transfected with Kv1.1 or Kv1.2 and the latter stably expressing the Kv11.1 channel gene.

Patch clamp measurements were carried out in whole-cell configuration. M β CD was dissolved in the standard extracellular solution and was applied to the cells with a gravitation-propelled perfusion system.

The results of the experiments showed that M β CD had no significant effect on the current amplitude, voltage-dependence or current kinetics of any of the examined channels, so currently its effect on Kv1.3 seems channel-specific.

Our results encourage further studies on CDs' effects on other ion channels, which may be channel specific, as well as help further characterize the ligand-like effects of CDs. Moreover, an investigation of CDs' effects at therapeutic concentrations may give additional information on beneficial or adverse effects during their therapeutic applications.

A TRANSZ-ZSÍRSAVAK SÚLYOSBÍJTJÁK A LINE-1 RETROTANSPON DNS
HIPOMETILÁCIÓT DMBA KÖRNYEZETI KARCINOGEN MODELLBEN

Andreidesz Kitti¹ Szabó László², Molnár Richárd², Tomesz András², Daragó Richárd², Deutsch Árpád², Varjas Tímea², Ritter Zsombor³, Szentpéteri L. József⁴, Máthé Domokos^{5,6}, Hegedűs Imre⁵, Sik Attila^{4,7}, Kiss István², Budán Ferenc^{2,4,7}

1 PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

2 PTE ÁOK, Orvosi Népegészségtani Intézet, Pécs

3 PTE ÁOK, Orvosi Képző Intézet, Pécs

4 PTE ÁOK, Transzdiszciplináris Kutatások Intézete, Pécs

5 Semmelweis Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

6 Hungarian Center of Excellence for Molecular Medicine (HCEMM) kft.

7 PTE ÁOK, Élettani Intézet, Pécs

A globális DNS-metiláció kulcsfontosságú a genom stabilitásában, melyet a LINE-1 retrotranszponon (L1-RTP) DNS-metiláltsági állapota híven reprezentál. Az L1-RTP DNS hipometilációt rosszindulatú daganatokban és az öregedés során is észlelték. A transz-zsírsavak (TFA) fogyasztása a DNS demetilálásával a szív- és érrendszeri betegségek, valamint a rák kockázatát is növeli.

A kísérlet célja TFA tartalmú táppal etetett CBA/Ca egerek (n=6) L1-RTP DNS-metilációs mintázatának a vizsgálata volt a májban, vesékben és lépben, miközben környezeti karcinogén 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) intraperitoneális injekcióval (i.p.) is előkezeltek őket és kezeletlen (n=6), illetve csak DMBA kezelt (n=6) csoportokhoz hasonlítottuk.

A DMBA kezelés szignifikáns L1-RTP DNS hipometilációt okozott a kezeletlen kontroll csoporthoz képest az összes vizsgált szervben. Továbbá a lépben és a májban a DMBA a TFA-val kombinálva további szignifikáns hipometilációt okozott a csak DMBA kezelt csoporthoz képest is.

Irodalmi adatok szerint a TFA lipidmembránokban a rigiditás fokozódását és peroxidációt, NF- κ B aktiválódást, scavenger enzimek gátlását és onkogének aktivációját okozza, ami a DNS-metiltransferáz (DNMT) enzimek befolyásolásán keresztül is megnyilvánul. Ez alátámasztja a TFA ártalom feltételezett szerepét az öregedésben is, a fent említett ártalmakon felül.

Rövidítések:

TFA	transz-zsírsavak
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antracén
L1-RTP	LINE-1 retrotranszponon
i.p.	intraperitoneális
DNMT	DNS-metiltransferáz

A PARP INHIBITOR TALAZOPARIB VÉDŐ HATÁSÚ KÍSÉRLETES COLITISBEN ÉS
OXIDATÍV STRESSZ ÁLTAL KÁROSÍTOTT EPITHÉL BARRIEREN

Bagóné Vántus Viola

Kovács Dominika, Vámos Eszter, Deák Péter, Vass Ibolya, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs
Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A gyulladással járó bélbetegségekben a bélhám epithél barrier funkciójának nagymértékű károsodása fokozott permeabilitáshoz, ez pedig a gyulladással járó válasz erősödéséhez és szövetkárosodáshoz vezet. A PARP fontos szerepet játszik a DNS-repair mechanizmusok indukációjában, de a túlzott aktivációja NAD^+ fogyaszt, energiaszint csökkenést és sejthalált eredményez, ami a gyulladással is kimutatható. Emellett a PARP indukálta jelátviteli mechanizmusok is hozzájárulnak a gyulladással járó válaszreakció kialakításához. Korábban kimutattuk a PARP inhibitor olaparib védő hatását kísérletes CD-modellben, melyben az intesztinális barrier összeomlását részben az epithél sejtek energetikai összeomlása okozta. Azonban az olaparibbal ellentétben a talazoparib nem gátolja a komplex I-et, ezért a mitokondriális ATP szintézis növelésével fokozhatja az epithél sejtek túlélését, azaz hatékonyabb barrier védelmet eredményezhet.

Munkánk célja a talazoparib gyulladásgátló hatásának vizsgálata TNBS-indukálta kísérletes Crohn-betegség modellben és mesterséges epithél barrieren.

A kísérletes colitis indukálása CD1 egérben TNBS-el történt, a talazoparibot (0,33 mg/ttkg, ip) naponta adagoltuk. A kísérlet végétől a vastagbél szöveti elváltozásait makroszkópikus pontozással értékeltük. Az epitheliális határreteg *in vitro* modellezésére humán Caco-2 egysejt réteget (mesterséges barrier) alkalmaztunk, melynek károsodását H_2O_2 -dal indukáltuk. A barrier integritásának vizsgálatát egy a transzepitheliális elektromos ellenállást mérő készülékkel az xCelligence RTCA-val végeztük, valamint FITC-dextrán permeabilitás tesztet alkalmaztunk.

A talazoparib kezelés szignifikánsan csökkentette a kísérletes colitis tüneteit pl. fekélyek száma és mérete, és jelentős különbséget tapasztaltunk a colon tömeg, colon hossz, bélfal vastagság mért értékeiben is. A talazoparib hatására javult a H_2O_2 által károsított barrier integritása és csökkent az oxidatív stressz indukálta sejthalál is.

A PARP inhibitor talazoparib tehát védő hatásúnak bizonyult a TNBS-indukálta kísérletes Crohn-betegség modellben, feltehetően az epithél barrier integritásának megőrzésén keresztül.

Rövidítések: CD - Crohn's disease-Crohn-betegség, FITC- fluoreszcein izotiocianát dextran, IBD - inflammatory bowel diseases, IP – intraperitoneális, PARP – poli (ADP-ribóz) polimeráz; TEER - Trans-Epithelial Electrical Resistance, TNBS - 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav
Támogatás: TKP2021-EGA-17 Tématerületi Kiválósági Program

AZ INTRACELLULÁRIS PROGESZTERON-INDUKÁLTA BLOKKOLÓ FAKTOR (PIBF)
MOLEKULA FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA PRIMER TÜDŐ DAGANATSEJTEKENBalassa Tímea^{1,2,3}Berta Gergely^{1,2}, Jakab László⁴, Szekeres-Barthó Júlia^{1,2,3}¹Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium, Pécs²Szentágothai János Kutatóközpont, Pécs³Pécsi Tudományegyetem, Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium, Pécs⁴Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Sebészeti Klinika, Pécs

Bevezetés: A PIBF molekulát elsőként terhes nők lymphocytái által termelt fehérjeként azonosították. Később igazolták, hogy más, gyorsan osztódó szövetek (placenta, decidua, embrió, here, daganatok) is termelnek PIBF-et. Expressziója során eltérő méretű fehérje izoformák képződnek. A kisebb, szekretálódó variánsok, méretük és hidrofil jellegük miatt nem képesek átjutni a sejtmembránon, így receptorukhoz kapcsolódva aktiválnak olyan jelátviteli folyamatokat, mellyel hozzájárulnak az immuntolerancia kialakulásához. A teljes láncú, intracelluláris PIBF a centroszóma alkotója, részt vesz a fiziológiás és patológiás invázió szabályozásában. Az immuntoleranciában és invázióban betöltött jelentősége miatt a PIBF funkcionális vizsgálatát tűztük ki célul primer daganatsejteken végzett kísérleteinkben.

Módszerek: Tüdő adenocarcinoma mintákból primer sejt kultúrát készítettünk, és a sejtek PIBF expresszióját RNS interferenciával csökkentettük, melynek hatékonyságát western blot technikával ellenőriztük. A géncsendesítés után megmértük a sejtek E-kadherin tartalmát, migrációs és inváziós tesztet végeztünk, és megvizsgáltuk a sejtek mátrix-metalloproteináz aktivitását zselatin szubsztrát zimográfiával.

Eredmények: Az siRNS kezelés után a primer tüdő daganatsejtek PIBF tartalma 70%-kal csökkent a kezelt sejtekben, a negatív kontrollhoz képest. A PIBF deficiens sejtek E-kadherin mennyisége átlagosan 29%-kal nőtt, míg inváziójuk 65%-kal csökkent, amit MMP aktivitás csökkenés kísért. A PIBF hiányos és kontroll sejtek migrációjában eltérést nem tapasztaltunk. Következtetés: A primer tüdő daganatsejtek nagy mennyiségben expresszálnak PIBF-et, mely a tumor inváziót pozitívan regulálja, ugyanis hiányában az invázió csökken. Az E-kadherin expresszió növekedése és az MMP aktivitás csökkenése arra utal, hogy a PIBF deficiencia a sejtadhézió fokozásán és az ECM bontó enzimaktivitás redukálásán keresztül képes az inváziót gátolni. Tehát a PIBF a daganatos sejtek disszociációjának és infiltrációjának elősegítése révén hozzájárulhat a rákos sejtek terjedéséhez.

PIBF: Progesteron-Indukálta Blokkoló Faktor

RNS: Ribonukleinsav

mRNS: messenger (hírvivő) RNS

siRNS: small interfering (kis interferáló) RNS

MMP: mátrix-metalloproteináz

ECM: extracelluláris mátrix

REGULÁTOR T-SEJT MARKER GÉNEK 3'UTR POLIMORFIZMUSAINAK FUNKCIONÁLIS
VIZSGÁLATA

Bánlaki Zsófia
Rónai Zsolt

Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Molekuláris Biológiai
Tanszék, Budapest

A regulátor T-sejtek legjellemzőbb markerei a sejtfelszíni CD25 fehérje (IL-2 receptor) és a FOXP3 transzkripció faktor. Ezek együttes, magas szintű expressziója alapvető jelentőséggel bír mind a természetes, mind a memória regulátor T-sejtek kialakulásában. Ezek a sejtek az immunmodulációban töltenek be fontos szerepet, az effektor T-sejtek proliferációjának és citokintermelésének gátlása révén, így akadályozva meg a túlzott erősségű, ezáltal már patológiás immunválaszt.

Habár irodalmi adatok alapján a CD25 illetve FOXP3 géneket érintő kismértékű expresszióbeli változás is döntő befolyással lehet a sejt differenciációra és az immunválasz lefolyására, egyelőre nem érhetőek el kísérletes adatok e két gén polimorfizmusainak funkcionális jelentőségével kapcsolatosan. Online adatbázis alapján mindkét gén 3' nemtranszlálódó régiójában (3'UTR) található egy-egy olyan polimorfizmus, amely valószínűsíthetően mikroRNS kötést befolyásol, valamint az mRNS másodlagos szerkezetét is befolyásolja, így potenciális funkcionális hatással rendelkeznek.

Kutatásaink során in vitro sejtes rendszerben, luciferáz riporter esszékkel vizsgáltuk a vad típusú ill. variáns allélt tartalmazó 3'UTR szakaszok génextpresszióra gyakorolt hatását. A CD25 gén esetében az alap expressziós szintek megegyeztek a két allél között, míg a FOXP3 gén esetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk már az alap expressziós szintekben, a ritka allél javára. MikroRNS expressziós mérések alapján a kísérletekhez használt sejtvonal számottevő mértékben expresszál egy olyan mikroRNS-t, ami in silico elemzések szerint be tud kötődni a FOXP3 3'UTR vad típusú allélt tartalmazó szakaszához, ám a variáns allélt tartalmazó szakaszhoz nem. A mikroRNS ill. mikroRNS inhibitor kotranszfekciós esszék, valamint az allélspecifikus génextpressziós mintázatok időbeli változásának vizsgálata jelenleg folyamatban vannak.

Jelen kutatás megvalósulását az OTKA K131680 pályázati támogatás tette lehetővé.

FARNEZIL-TRANZFERÁZ INHIBITOROK TUMORELLENES HATÁSAI HUMÁN TÜDŐ
ADENOKARCINÓMA MODELLEN

Baranyi Marcell¹, Gábrriel Zsófia^{1,2}, Hegedűs Balázs^{1,3}, Hegedűs Luca³, Tímár József¹

1: Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, Budapest

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

3: University Medicine Essen–Ruhlandklinik, Department of Thoracic Surgery Essen, Germany

Bevezetés

A farnezil-transzferáz inhibitorok kifejlesztését nagy érdeklődés övezte az ezredfordulón, mint potenciális RAS-gátló terápiát. A farneziláció gátlása a farnezilálódo fehérjék membránlokalizációjának blokkolásához vezet. Bár a célt a kifejlesztett vegyületek nem érték el a KRAS fehérje geranilgeranilációja miatt, széles spektrumú tumorelles hatásuk miatt több szolid és hematológiai daganattípusban indítottak klinikai vizsgálatokat a farnezil-transzferáz inhibitorokkal. Mivel a farneziláció számos fehérjét érinthet, így a vegyületek tumorelles hatásának pontos hatásmechanizmusa még feltárára vár.

Célkitűzés

Jelen tanulmány célja a farnezil-transzferáz inhibitorok hatásmechanizmusának feltárása, különös tekintettel a laminhálózat és különböző kis G fehérjék változásaira.

Módszer

A tipifarnib farnezil-transzferáz inhibitor hatásainak vizsgálatát az SW1573 tüdő adenokarcinóma sejtvonalon végeztük el. A kezelés osztódásgátló és apoptózist serkentő hatását videomikroszkópos és western blot valamint sejtciklus vizsgálatok segítségével vizsgáltuk. A laminhálózat, valamint a kis G fehérjék membránhorgonyzódásának változásait immunfluoreszcens és western blot módszerekkel tanulmányoztuk.

Eredmények

A tipifarnib nanomólos koncentrációban képes volt gátolni az SW1573 sejtvonal növekedését. A western blot és videomikroszkópos analízis eredményei alapján mind apoptózis serkentő, mind robosztus osztódás gátló hatás is megfigyelhető. A videomikroszkópos felvételeken jól mérhetően megnő az osztódásban elakadt sejtek száma, amelyet a sejtciklus vizsgálatok is megerősítettek. A jelenséget vizsgálva az immunfluoreszcens analízis a laminhálózat membránlokalizációjának és a sejtmagok morfológiájának elváltozásait mutatta ki. A különböző kis G fehérjék vizsgálata alapján a RHEB és HRAS fehérjék farnezilációjának gátlása – következményesen a membránlokalizációjuk defektusa - szintén hozzájárulhat a tipifarnib tumorelles hatásaihoz.

Következtetés

A tipifarnib hatékony tumorelles vegyület, amelynek hatása elsősorban proliferáció gátló hatásban nyilvánul meg. A proliferáció gátlása mögött valószínűsíthetően a laminhálózat és több kis G fehérje membránlokalizációjának defektusa áll.

Rövidítésjegyzék:

RAS: Rat sarcoma viral oncogene homolog, HRAS: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, RHEB: Ras homolog enriched in brain

Finanszírozási adatok: A kutatási munkát az NKFIH által támogatott 2020-1.1.6-JÖVŐ-2021-00004

(Mutáns K-Ras onkogént kifejező humán daganatok célzott terápiájának kifejlesztése) című pályázat és az ITM által támogatott ÚNKP-21-4-I-SE-24 pályázat finanszírozta.

AZ ADENOZIN HATÁSA A VÉR-AGY GÁT INTEGRITÁSÁRA

Barna Lilla^{1,2}, Harazin András¹, Gabriela Hurtado-Alvarado³, Laczi Krisztián⁴, Rákhely Gábor^{1,4}, Beatriz Gomez-Gonzalez³, Deli Mária¹

- 1) Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport, Szeged, Magyarország
- 2) Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola, Szeged, Magyarország
- 3) Department of Reproductive Biology, Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico
- 4) Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék, Szeged, Magyarország

A tartós alvásmegvonás az idegrendszeri zavarok mellett növeli a gyulladáshoz vezető molekulák szintjét a vérben, ezáltal fokozza a vér-agy gát átjárhatóságát. A kórállapot során megemelkedik az agyi adenosin szint, az alvásmegvonás okozta vér-agy gát működési zavart az A2A adenosin-receptor gátlása csökkenti. Célunk volt megvizsgálni az adenosin vér-agy gátra gyakorolt közvetlen hatását, illetve kimutatni az adenosin receptorok kifejeződését a vér-agy gát sejtjeiben.

Az adenosin receptorok kifejeződését a vér-agy gátat alkotó sejtjeiben kvantitatív PCR módszerrel vizsgáltuk. A sejtek életképességét valós idejű impedancia-méréseken alapuló sejtanálízissel követtük nyomon. A primer patkány agyi endotélsejtekből, agyi pericitákból és gliasejtekből létrehozott vér-agy gát modellt adenosinnal és az A2A receptor-antagonista SCH-58261-gyel kezeltük. A barrier funkcióit elektromos ellenállás- és permeabilitási mérésekkel vizsgáltuk sejtenyírási szinten, valamint *in vivo* patkányokban.

A patkány agyi endotélsejtek expresszálnak az A2A és A2B adenosin receptorokat. Az agyi pericitákon az A1, A2A és A2B receptorok fejeződnek ki, míg az asztroglia sejteken mind a négy receptortípus megtalálható. Az adenosin kezelés szignifikánsan megemelte az endotélsejtek impedancia értékét az első 2 órában. A lumenális adenosin kezelés csökkentette mono- és ko-kultúra modellekben az átteresztőképességet. Patkányokban szintén enyhítette a vér-agy gát permeabilitását intrakardiális adenosin adminisztráció esetében. Az ablumenális adenosin kezelés megnövelte a hármassal kultúra átteresztőképességét. A cerebrospinális folyadékba juttatott adenosin szintén fokozta a marker molekula átjutását a vér-agy gáton. Az SCH-58261 gátolni tudta az adenosin hatását.

Kísérleteinkkel igazoltuk az adenosin receptorok jelenlétét a vér-agy gát sejtjeiben. A lumenális adenosin kezelés erősítette a barrieret tenyésztési modelleken és patkányokban. Az agyi periciták befolyásolhatják a vér-agy gát megnyílását ablumenális akut adenosin kezelés során.

VILÁGOSSEJTES VESEDAGANAT ÉS NORMAL VESESZÖVET PROTEOM ÉS
TRANZKRIPTOM SZINTŰ CÉLZOTT ELEMZÉSE

Bartha Áron^{1,5},
Munkácsy Gyöngyi¹, Klément Éva^{2,3}, Darula Zsuzsanna^{2,3}, Nyirády Péter⁴ Győrffy Balázs^{1,5}

¹Bioinformatika Tanszék, II. Gyermekklinika Semmelweis Egyetem

²Single Cell Omics Advanced Core Facility, HCEMM;

³Proteomikai Kutatócsoport, SzBK

⁴Urológiai klinika, Semmelweis Egyetem

⁵Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet, TTK

A világos sejtes veserák a leggyakoribb vesedaganat, amely az előforduló összes eset nagyjából 80%-át teszi ki. A vesesejtes karcinóma kialakulásában és progressziójában részt vevő kulcsgének és fehérjék azonosítása értékes információkkal szolgálhat a betegek túlélésének meghosszabbításához.

Kutatásunk célja az volt, hogy új potenciális prognosztikus és prediktív biomarkereket azonosítsunk a világossejtes veserák kapcsán.

Munkánk során online elérhető gén-chip és RNS szekvenálási adatbázisok felhasználásával meghatároztuk azokat a géneket, amelyek eltérő kifejeződést mutatnak vesedaganatos és a normál szövetmintával rendelkező betegekben. A következő lépésben a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján kezelt betegek szövetmintáin végeztünk RNS szekvenálást. Az eltérő génkifejeződést mutató gének proteinjeit célzott tömegspektrometriával is értékeltük, hogy fehérje szintű expressziós adatokat is kapjunk.

Kutatásunk során létrehoztunk egy adatbázist melyben összesen 558 daganatos és normál szövet érhető el, melyből 414 gén chip és 144 RNS szekvenálási adat. A létrehozott adatbázis alapján meghatároztuk azt a top 30 gént, melynek fontos szerepe lehet a vesesejtes karcinóma patogenezisében. A meghatározott gének közül az IGFBP3, a PLIN2 és a PFKP mutatták a legjelentősebb eltérést. A meghatározott génpanelt 162 vesedaganatos és hozzátartozó normál szövetet tartalmazó mintán is validáltuk, RNS-Seq és tömegspektrometria segítségével. A független adatkészlet elemzése során az IGFBP3, a PLIN2 és a PFKP szignifikáns eltérést mutatott az RNS expresszió szintjén. A proteomikai elemzés szintén alátámasztotta az IGFBP3, a PLIN2 és a eltérő kifejeződését a normál és daganatos szövetekben.

Napjainkban a világossejtes veserák molekulárisan célzott terápiájára korlátozott számú terápiás lehetőség van használatban, eredményeink segítenek új terápiás lehetőségek feltárásában. Továbbá a meghatározott génpanel alkalmas lehet diagnosztikai és prognosztikai döntéshozatal támogatására is.

A NEW ROLE FOR MYELOID LEUKEMIA FACTOR (MLF) IN CONTROLLING LAMELLOCYTE FATE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Bayan Kharrat^{1,3}
Nikolett Virág^{1,2}, Viktor Honti¹

¹*Drosophila* Blood Cell Differentiation Group, Institute of Genetics, Biological Research Centre, Szeged.

²Department of Biology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Szeged.

³Doctoral School of Biology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Szeged.

Due to the conserved regulatory networks of hematopoiesis, the fruit fly has been widely utilized as a model organism to understand the mechanisms of blood cell differentiation and function. Three types of mature blood cells are present in the larva: plasmatocytes, crystal cells, and lamellocytes, which are specialized cells that differentiate exclusively in response to immune challenge and in case of tumors. In a screen to identify genes involved in lamellocyte formation, we have isolated *Myeloid leukemia factor (Mlf)*, a conserved factor in the pathogenesis of acute myeloid leukemia in humans. Although previous literature linked the *Mlf* gene with regulating crystal cell fate and number, no data indicated its regulatory role in lamellocyte differentiation.

We found that lamellocytes were present both in the lymph gland - a lymphoid organ - and in the circulation of *Mlf* null mutant larvae, suggesting a role for Mlf in controlling the fate of not only crystal cells, but also lamellocytes. With the knockdown of *Mlf* expression in different hematopoietic domains, we found that the function of Mlf is specific to the lymph gland, where it is required for the coordination of blood cell fate.

With genetic interaction experiments, we set up to elucidate the signaling pathways via which Mlf regulates hematopoiesis in *Drosophila*. We hope that our results will lead to a better understanding of the function of the Mlf family in human hematopoiesis and carcinogenesis as well.

Funding: this work was supported by the OTKA K-131484 (VH) and RRF-2.3.1-21-2022-00005 grants.

A LÉP HIÁNYÁBAN MÓDOSUL AZ IMMUNVÁLASZ AUTOIMMUN ARTHRITIS EGÉR
MODELLJÉBEN

Esam Khanfar¹, Olasz Katalin¹, Gajdócsi Erzsébet¹, Jia Xinkai^{1,2}, Berki Timea¹, Balogh Péter^{1,2},
Boldizsár Ferenc¹

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

2 Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Nyirokszöveti fejlődés
Kutatócsoport

A lép fontos szerepet játszik a B sejtek érésében, -aktivációjában, valamint az immunregulációban. A rekombináns humán aggregán G1-doménje (rhG1) által kiváltott autoimmun arthritis (GIA) egerekben jól modellezi az emberi rheumatoid arthritist (RA). GIA-ban a szisztémás immunválaszt a lépsejtek aktivációjával jellemezhető, ami a lép szerepére utalt. Korábbi munkánkban a súlyos lép defektussal rendelkező NKX2-3 KO egértörzsben a GIA kevésbé súlyos formában volt kiváltható, mint normál egerekben. Jelen munkánkban azt vizsgáltuk, hogy a lép sebészi eltávolítása (splenectomia) után kiváltható-e a GIA.

A lépeltávolítást 3 hónapos egerekben végeztük el, majd a gyógyulást követően arthritist indukáltunk rhG1 immunizálással. Követtük az arthritis klinikai képét (pontozásos rendszerrel ill. végtag vastagság méréssel), majd a kísérlet végén vizsgáltuk az egerek immunválaszát (sejt proliferációs teszt, citokin termelés, szérum antitest mérés ELISA módszerrel) és a sejtek aktivációját (Ca²⁺-szignál).

Meglepő módon, a lépeltávolított egerekben ugyanolyan súlyossággal és incidenciával alakult ki a GIA, mint a kontroll csoportban. Ennek ellenére szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk az immunválaszban. A splenectomizált egerek szérumában csökkent gyulladáscsökkentő citokin és anti-rhG1 IgM szintet mértünk, de magasabb volt az IL-4, anti-rhG1 IgG1- és az anti-CCP antitestek szintje. A vérben emelkedett aktivált T helper-, B1- és marginális-zóna B sejt arányt mértünk a splenectomizált csoportban. A lépeltávolított egerekben fokozott csíráközpont képződést tapasztaltunk az inguinalis- és a mesenterialis nyirokcsomókban, továbbá az izolált nyirokcsomó sejtek jelentős aktivációt

EGÉR PREANTRÁLIS FOLLIKULUSOK VITRIFIKÁCIÓJÁNAK ÉS *IN VITRO*
TENYÉSZTÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI

Bordás Lilla^{1*}, Török Dóra¹, Cseh Sándor¹ Somoskői Bence¹

¹ Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika,

A preantrális petefészek folliculusok krioprezervációja alternatív lehetőség a nagy genetikai értékű vagy veszélyeztetett állatok reprodukciós életkorának kiterjesztésére, e mellett humán medicinában jelentőséggel bírhat a kemoterápiás kezelések előtti fertilitás megőrzésében. Mivel az emlősök petefészke nagy számban tartalmaz preantrális folliculusokat, a felolvasztott folliculusok *in vitro* tenyésztése rendkívül jelentős mennyiségű petesejthez biztosíthat hozzáférést, amelyek *in vitro* maturálhatók és megtermékenyíthetők, majd a kifejlődött embriók beültethetők vagy fagyasztva tárolhatók. Kutatásunkban egér preantrális folliculusok vitrifikációjának és *in vitro* tenyésztésének lehetőségeit vizsgáltuk.

A preantrális tüszőket 8-12 hetes BDF1 egerekből izoláltuk. A folliculusok vitrifikációját zárt (kriocső) és nyitott (open puled straw (OPS) rendszerben végeztük. Felolvasztást követően a folliculusok életképességét élő / elhalt, valamint immunfluorescens festéssel ellenőriztük, egy részét *in vitro* tenyésztettük (Advanced-MEM + 5% FBS + 100 mIU/ml eCG), 20 µl-es cseppekben, olajjal fedve, inkubátorban (36.5 °C, 6.5% CO₂).

Mind az OPS, mind kriocső csökkentette a tüszők átlagos élősejt arányát: 96,66 (± 5,86) % a friss, 81,5 (± 15,32) % az OPS és 66,82 (± 11,88) % a kriocső esetében. Az immunfluorescencia nem különbözött a friss és az OPS csoportok tüszői között (105,85 ± 17,32 és 94,15 ± 36,39). A tenyésztés 10. napján nem volt szignifikáns különbség az elhalt sejtek arányában a friss (1.54 ± 0.29) és az OPS (1.88 ± 1.51) csoport között.

Sikeresen kialakítottunk egy jól működő protokollt egér preantrális folliculusok *in vitro* tenyésztésére. Eredményeink alapján az OPS vitrifikáció jelentősen növeli a vitrifikált/felolvasztott preantrális folliculusok életképességét.

A 134887 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a FK_20 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A TKP2020-NKA-01 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg.

AZ EXTRASZŰZ OLÍVA OLAJ CSÖKKENTI A KARCINOGEN DMBA L1-RTP DNS
HIPOMETILÁLÓ HATÁSÁT

Budán Ferenc^{1,2,3}, Szabó László³, Molnár Richárd³, Tomesz András³, Daragó Richárd³, Deutsch Árpád³, Varjas Tímea³, Ritter Zsombor⁴, Szentpéteri L. József¹, Máthé Domokos^{5,6}, Hegedüs Imre⁵, Sík Attila^{1,2}, Kiss István³, Andreidesz Kitti⁷

1 PTE ÁOK, Transzdiszciplináris Kutatások Intézete, Pécs

2 PTE ÁOK, Élettani Intézet, Pécs

3 PTE ÁOK, Orvosi Népegészségtani Intézet, Pécs

4 PTE ÁOK, Orvosi Képző Intézet, Pécs

5 SE ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

6 Hungarian Center of Excellence for Molecular Medicine (HCEMM) kft.

7 PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

Az EVOO fogyasztása az életkorral összefüggő betegségek (például keringési betegségek, rosszindulatú daganatos betegségek) kialakulásának az esélyét csökkenti, valamint feltételezhetően a várható élettartamot növeli. Ez a globális DNS metilációs állapotban is megnyilvánul – gyulladás- és daganat biológiai szempontból a metilált állapot a kedvező, ami viszont az életkorral romlik. Ennek az L1-RTP DNS szakasz metilációs mintázata reprezentatív biomarkere. Például az L1-RTP DNS szakasz hipometilálódik a gyulladáskeltő és/vagy karcinogén anyagok hatására, ami genetikai instabilitáshoz vezet.

Erre alapozva karcinogén DMBA-val kezeltünk CBA/Ca egereket és azok májában, lépében és veséiben a L1-RTP DNS metilációs mintázatot vizsgáltuk és egy másik csoporthoz hasonlítottuk, mely tagjait a DMBA injekció előtt két hétig EVOO-val etettük.

A DMBA kezelt pozitív kontroll csoportban (n=6) a DMBA a kezeletlen kontroll csoporthoz (n=6) képest szignifikánsan csökkentette az L1-RTP DNS metiláltsági állapotát mindhárom szervben. Ezen csökkenést az EVOO fogyasztása szignifikáns mértékben képes volt kivédeni a májban és a lépben, valamint részben a vesékben is.

Irodalmi adatok alapján az eredmények hátterében nem csak az EVOO összetevőinek antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásai állhatnak, hanem a DMBA lipid membrán rigiditást fokozó - és ROS felszabaduláshoz vezető, karcinogén jelátvitelt indukáló hatását direkt és indirekt is csökkenthette az EVOO. Előbbit a membrán fluiditást növelő hatása okozhatta.

Utóbbit számos szekunder szignál transzdukciós folyamat támasztja alá, például a membrán rigiditás által aktivált C-MYC onkogént az EVOO indirekt is gátolhatta a SIRT1 aktiválásával, ami az mTOR/HIF-1/C-MYC utat gátolja; valamint a SIRT1 aktiválása a DNMT1 blokkolásán keresztül is tumorszuppresszor gének hipermetilálódását védi ki.

Tehát kísérletünkben az EVOO említett jótékony hatásait megerősítettük.

extra szűz olívaolaj (EVOO)

7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA)

Long Interspersed Element-1 retrotranszpozon DNS (L1-RTP DNS)

reaktív oxigén gyökök (ROS)

DNMT1 (DNS metil-transzferáz enzim 1)

A VON WILLEBRAND FAKTOR SZERKEZETÉNEK ÉS NYÚJTHATÓSÁGÁNAK ATOMI
ERŐMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATACsányi Mária Csilla¹Salamon Pál², Feller Tímea^{1,3}, Bozó Tamás¹, Hársfalvi Jolán¹, Kellermayer Miklós¹¹Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest²Biomérnöki Tanszék, Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda³Discovery and Translational Science Department, Leeds Institute of Cardiovascular And Metabolic Medicine, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

A von Willebrand faktor (VWF) multimer szerkezetű plazma glikoprotein, mely a trombociták kihorgonyzását segíti a szubendotéliumhoz és egymáshoz. A VWF erőszenzor, a véráramlás megváltozása során fellépő erőknél megfelelően változik megnyúlása. A megfelelően hosszú multimerek hiánya vagy hosszan tartó túlsúlya vérzéses vagy trombotikus állapotok kockázati tényezője. Legkisebb szerkezeti egysége, vagyis protomere a dimer. A protomer két nagyobb, terminális és egy kisebb központi nódusból áll, amelyet rugalmas szálak kötnek össze, teljes hossza 80-100 nm. Figyelembe véve, hogy a protomer fej-fej szerkezetű dimer, a kis és nagy nódusok megfelelnek a monomer C- és N-terminális végeinek.

Célunk volt a protomer átrendeződésének vizsgálata a mechanikai erőnek kitett VWF multimerekben.

Plazma eredetű VWF oldatot csillámra cseppentettünk, amin 1 percig inkubáltuk vagy azonnal megnyújtottuk molekuláris fésüléssel. Non-kontakt módban, levegőben végeztük a pásztázást atomi erőmikroszkóppal (AFM).

A multimerek nyújtás nélkül relaxált gombolyag szerkezetűek voltak, amik a felszínen hajlékony gyöngysorként jelentek meg. A nódusok legtöbbször átfedtek, az összekötő szálak csak ritkán látszóttak. A molekuláris fésüléssel megnyújtott multimerek a nyújtás irányába orientálódtak, kiegyenesedtek és megnyúltak. A nyújtott multimerek kontúrhossza 416-3090 nm között volt, ami korrelált a protomerek 19-329 nm közötti hosszával. A protomerekben a nyújtással egyre több kis nódusz jelent meg, ami köztes szerkezeti állapotok jelenlétére utal. A nódusok magassága a megnyúlással csökkent, ami azt jelzi, hogy a megnyúlást a multimer fokozatos kigombolyodása és a domének kitekeredése okozza.

VWF- von Willebrand faktor; AFM- atomi erőmikroszkópia, atomic force microscopy

MITŐL LEHET IRREVERZIBILIS A CIRRHOSIS?

Dezső Katalin, Nagy Péter, Scheich Bálint, Nagy Ágnes, Paku Sándor

Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A cirrhosis patológiájában a májparenchyma heges átépülése mellett az ér-és epeútrendszert érintő változások is döntő fontosságúak. Az elmúlt években számos közlemény számolt be a májfibrosis, sőt a cirrhosis reverzibilitásáról, megcáfolva azt a régi "dogmát", miszerint a cirrhosis irreverzibilis. Ahhoz, hogy alaposabban megértsük, mi teheti ezt a folyamatot egyes esetekben mégis irreverzibilissé, fibrotikus/cirrhotikus humán májakat részletes morfológiai vizsgálatnak vetettünk alá.

Eredményeink azt mutatták, hogy a máj kötőszövetes átépülésének folyamata strukturális eltérések alapján, két jól elkülöníthető stádiumra osztható:

A kezdeti stádiumra az eredeti májparenchyma centro-centrális és porto-portális szeptumok általi felosztása jellemző. Ebben a stádiumban még nem figyelhetők meg jelentős érrendszeri vagy epeutakat érintő morfológiai eltérések.

Az előrehaladott stádiumra számos, szövettani metszeteken és 3D-rekonstrukcióval is azonosítható szerkezeti eltérés jellemző:

- (i) parenchymamentes területek alakulnak ki, ahol májsejtek hiányoznak, de a portális véna és májartéria-ágakból valamint az epeutakból felépülő portális triászok még azonosíthatóak;
- (ii) a hepatobiliáris junkciók elvesztése miatt a szabályos epeutak helyett, kanyargós lefutású, hálózatot formáló ductulusok figyelhetőek meg;
- (iii) az epeutakban elhelyezkedő őssejtek májsejtté differenciálódva regeneratív nodulusokat alakítanak ki, melyek azonban nem képesek az eredeti lebenykés szerkezetet helyreállítására.

Az előrehaladott stádiumra jellemző, őssejtek közvetítette regenerációs folyamat állandósítja a parenchymakárosodást, hozzájárul a keringési zavarokhoz, és a cirrhosis irreverzibilitásához vezet.

NKFIH FK 138673

A TRPM4 IONCSATORNA ÉS ÚJ GÁTLÓSZERÉNEK VIZSGÁLATA KUTYA BAL KAMARAI
SZÍVIZOMSEJTEKEN

Dienes Csaba¹

Hézső Tamás¹, Kiss Dénes Zsolt¹, Baranyai Dóra¹, Kovács Zsigmond Máté¹, Szabó László¹, Magyar János^{1,2}, Bányász Tamás¹, Nánási Péter P.^{1,3}, Horváth Balázs^{1,4}, Gönczi Mónika¹, Szentandrassy Norbert^{1,5}

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

2 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettan Intézet, Sportélettani Tanszék, Debrecen

3 Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogorvosi Élettani és Gyógyszertani nem önálló Tanszék, Debrecen

4 Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Debrecen

5 Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Alapozó Orvosi Ismeretek Intézet, Debrecen

Bevezetés: A kalcium aktivált TRPM4 ioncsatornák elektrofiziológiai szerepe kamrai szívizomban még nem tisztázott. A CBA-t mint potenciálisan szelektív gátlószert választottuk a TRPM4 szerepének tanulmányozására.

Célkitűzés: A TRPM4 kutyaszívben történő expresszióját és a CBA szelektivitását és hatását kamrai sejteken kívántuk megvizsgálni.

Módszerek: Kísérleteinket kutya bal kamrájából enzimatikusan izolált sejteken végeztünk. Az ionáramokat hagyományos és akciós potenciál feszültség-clamp technikával rögzítettük teljes sejtcsatlakozásban, 37 ° C-on ahol 10 mM BAPTA alkalmazásával védjük ki a TRPM4 aktivációját. Az AP-t hagyományos hegyes mikroelektrodával rögzítettük és 10 μM CBA-t alkalmaztuk. A TRPM4 fehérje expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk.

Eredmények: A TRPM4 expresszálódott a kutyaszív minden üregének falában, valamint az izolált bal kamrai sejtekben is. A CBA csökkentette a repolarizáció 90%-ánál mért AP időtartamot és annak rövid távú variabilitását. A CBA növelte az AP amplitúdóját és csökkentette a 0. és az 1. fázis maximális meredekségét. Az AP clamp mérésben a CBA-szenzitív áram egy rövid, korai kifelé irányuló és egy hosszú, befelé irányuló komponensből állt. A tranziens kifelé irányuló káliumáram és a késői nátriumáram csökkent CBA jelenlétében, míg az L-típusú kalciumáram nem változott. A CBA ezen hatásai kimosáskor nagyrészt reverzibilisek voltak.

Összegzés: A CBA általi 1. fázis meredekség csökkenést és az AP amplitúdó enyhe növekedést az Ito gátlása okozhatta. Az AP rövidülése a platófázis alatt az AP-clamp felvételeken látható befelé irányuló áramok gátlásával magyarázható. Ez a CBA által csökkentett befelé irányuló áram az INa,L. A CBA nem teljesen szelektív TRPM4 gátlószert, ezért használata elővigyázatosságot igényel kamrai sejtekben a TRPM4 csatornák funkcionális vizsgálatára.

Rövidítések

TRPM4: tranziens receptor potenciális melasztatin 4

CBA: 4-klór-2-(2-klór-fenoxi)-acetamido)-benzoesav

AP: akciós potenciál

BAPTA: 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

Ito: tranziens kifelé irányuló káliumáram INa, L: késői nátriumáram

**A RENDSZERES TESTMOZGÁS IZOM- ÉS AGYSZÖVETRE KIFEJTETT NEM-FÜGGŐ
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A HIPERLIPIDÉMIA EGÉRMODELLJÉBEN**

Dukay Brigitta¹, Bódai Zsófia¹, Csefová Alexandra¹, Hajdu Petra¹, Ruppert Zsófia^{1,2}, Penke Botond³, Fülöp Livia³, Szabó Kitti⁴, Keller-Pintér Anikó⁴, Dux László⁴, Gombos Imre¹, Török Zsolt¹, Sántha Miklós¹, Tóth E. Melinda¹

1 ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

2 Szegedi Tudományegyetem, Biológiai Tudományai Doktori Iskola

3 Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet

4 Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézet

Az elhízás és a mozgásszegény életmód a neurodegeneratív betegségek fontos rizikófaktorka, míg a rendszeres testmozgás csökkentheti a demencia kialakulásának esélyét. Az edzés jótékony hatásaihoz nagymértékben hozzájárulhat az izom-agy tengelyt befolyásoló szerepe, ami egyéni adottságoktól is függhet. Ezért kísérleteink célja annak vizsgálata, hogy a rendszeres, közepes intenzitású edzés milyen változásokat indukál zsírdús tápon (HFD) tartott ApoB100-túltermelő, illetve normál tápon tartott vad-típusú (WT) hím és nőstény egerek agy- és izomszövetében. A testedzés térbeli memóriára kifejtett hatását kognitív tesztekkel vizsgáltuk, míg az agy- és vázizomszöveteket génexpressziós és immunhisztokémiai módszerekkel elemeztük.

A Barnes-féle labirintus teszt kimutatta, hogy az edzés szignifikánsan javította a WT és ApoB100 nőstények tanulási képességeit, míg a hímeknél nem mutatkozott különbség. A mikroglia marker IBA1 lefedettsége a nőstényekben edzés hatására csökkenő tendenciát mutatott, míg az ApoB100 hímek agyában a HFD-indukált emelkedést az edzés tovább növelte, ami gyulladásra utalhat. A qPCR eredmények szerint a neuronális funkciókat is befolyásoló leptin, illetve bizonyos transzmembrán receptorok, mint a leptin receptor és a laktát receptor, agyi expressziója HFD vagy testmozgás hatására szignifikáns eltéréseket mutatott a két nemből. A musculus quadriceps femoris súlya hímek esetében megnőtt edzés és HFD hatására, utóbbi intramuszkuláris zsírfelhalmozódásra utalhat. Ezen kívül az Il-6 miokin génexpressziója és más, az izommunkát, integritást (HspB1, HspA1) és anyagcserét (leptin, leptin receptor) szabályozó faktorok jelentős nemi különbségeket mutattak.

Összefoglalva, a nőstényeknél az agy gyulladáshoz és metabolikus folyamatainak eltérő szabályozása, valamint a vázizomzat kedvezőbb reakciója hozzájárulhat a tanulási képességeik javulásához. Eredményeink elősegítik, hogy a személyre szabott testmozgás terápiás lehetőségként szolgáljon az idegrendszeri betegségekben.

Munkánkat az NKFIH (OTKA-FK138390) finanszírozta.

HFD: high-fat diet (zsírdús táp); WT: vad-típus; ApoB100: apolipoprotein B100; IBA1: ionizált kalcium-kötő adaptor molekula-1; Il-6: interleukin-6; HspB1/A1: hő sokkfehérje B1/A1

AZ ACETILKOLINRA ADOTT POZITÍV INOTRÓP VÁLASZ KANNABIDIOLLAL KEZELT ZDF
PATKÁNY JOBB ÉS BAL KAMRAI MYOCARDIUMÁN

Erdei Tamás Dániel

Bodnár Tímea, Takács Tímea, Óvári Ignác, Viczján Gábor, Varga Balázs, Szilágyi Anna,
Takács Barbara, Szekeres Réka, Lampé Nóra, Juhász Béla, Szilvássy Zoltán, Gesztelyi Rudolf
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és farmakoterápiai Intézet

Kutatócsoportunk a kamrai myocardium vizsgálatára alkalmas ex vivo módszer fejlesztésébe kezdett, mely segítségével lehetővé válik olyan gyógyszerjelöltek vizsgálata, melyek kardioprotektíven hatnak különböző noxákkal szemben. Vizsgálataink során izolált, ingerelt jobb és bal kamrai trabekulákon a szív két legjelentősebb neurális regulátorának, a noradrenalinak és az acetilkolinnak az inotróp hatását kvantifikáltuk.

Vizsgálatunkhoz Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányokat használtunk. A heterozigóta, ép metabolizmusú egyedek a negatív kontroll csoportot (Lean) adták, míg a homozigóta, az emberi metabolikus szindróma jellemzőit mutató patkányokat két csoportba osztottuk: a pozitív kontroll csoportba (Obese) és a kannabidiollal kezelt csoportba (Obese+CBD). Az állatokból, jobb és bal kamrai trabekulákat izoláltunk, majd az ingerelt mintákon noradrenalin és acetilkolinnal koncentráció-hatás (E/c) görbéket vettünk fel az inotróp választ regisztrálva. Az acetilkolin E/c görbe felvétele előtt a mintákat a noradrenalin félhatásos koncentrációjával stimuláltuk.

Bár vizsgálatunk „pilot study”-nak tekinthető, a kapott eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy a noradrenalin mindhárom csoportban pozitív inotróp hatást váltott ki (ami a kamrai minták életképességét mutatta). Az Obese állatok gyengült kamrai válaszát a CBD kezelés mindkét oldali mintán valamelyest erősíteni látszott. Az acetilkolin esetében a CBD előkezelés mindkét oldali szöveten jól látható (noha a nagy szórás miatt nem szignifikáns) pozitív inotróp hatást indukált, szemben a Lean és az Obese minták válasznélküliségével vagy minimális negatív inotróp válaszával. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a CBD acetilkolineszteráz-gátló hatásának is köze lehet a jelenséghez.

Témátámogatás: GINOP-2.3.4-15-2016-00002; TKP2020-NKA-04

**B-SEJTEK FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA A PI3K JELÁTVITELI ÚTVONALHOZ
KAPCSOLÓDÓ MOLEKULÁK ELEMZÉSÉVEL SZISZTÉMÁS SCLEROSISBAN**

Erdő-Bonyár Szabina ¹

Rapp Judit ¹, Balogh Péter ¹, Minier Tünde ², Nagy Gabriella ², Czirják László ², Berki Tímea ¹,
Simon Diána ¹

1 Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs
2 Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Reumatológiai és Immunológiai Klinika, Pécs

A B-sejt aktivációt egy korai eseményként írták le a szisztémás sclerosis (SSc) patogenezisében. A B-sejtek B-sejt receptoron (BCR) keresztüli klasszikus aktivációja érinti a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonalat, ami számos ko-receptor hatását integrálja. Korábban a PI3K útvonallal kapcsolatos molekulák vizsgálata során a Toll-like receptor (TLR) homológ CD180, IL-4 receptor (IL-4R) és osteopontin (SPP1) molekulák megváltozott mRNS expresszióját figyeltük meg a korai diffúz SSc (dcSSc)-s betegek perifériás vér B-sejtjeiben.

Célkitűzésünk volt a dcSSc-s betegek perifériás vér B-sejtjeinek funkcionális analízise a PI3K jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó molekulák vizsgálatával.

DcSSc-s betegek és egészséges kontrollok (HC) perifériás B-sejtjeit mágneses gyöngy alapú negatív szelekcióval tisztítottuk, majd CD180-on, BCR-en és BCR-en+IL-4R-on keresztüli stimulációt követően vizsgáltuk az NF- κ B szignalizációt áramlási citometriával, valamint meghatároztuk a B-sejtek által termelt IL-10 és SPP1 mennyiségét ELISA-val.

A CD180-on keresztüli B-sejt stimuláció NF- κ B aktivációt eredményezett mind dcSSc-s betegekben, mind HC-ban, de a BCR+CD180 ko-stimuláció csak a dcSSc-s betegekben növelte az NF- κ B foszforilációját. Ezenkívül magasabb bazális SPP1 és alacsonyabb bazális IL-10 szekréciót találtunk a B-sejtek felülúszójában dcSSc-ban mint HC-ban és a HC B-sejtjeivel ellentétben a dcSSc-s betegek B-sejtjeinek az SPP1 és IL-10 szekrécióját nem fokozták a vizsgált stimulusok.

Eredményeink alapján az alternatív B-sejt aktiválás szerepet játszhat az SSc patogenezisében. Mivel az NF- κ B egy központi közvetítője a gyulladásos folyamatoknak a dcSSc B-sejtek CD180-on és BCR-en keresztüli aktiválása hozzájárulhat a gyulladásához, amely fontos szerepet játszik az SSc patogenezisében. Csak a HC B-sejtjei termeltek nagyobb mennyiségű IL-10-et az anti-CD180 antitest kezelés hatására, ami arra utal, hogy a CD180 szerepet játszhat az IL-10-et termelő szabályozó B-sejtek diszfunkciójában dcSSc-ban.

Rövidítések: PI3K - foszfatidil-inozitol-3-kináz, SSc - szisztémás sclerosis, BCR – B-sejt receptor, TLR - Toll-like receptor, IL-4R – interleukin-4 receptor, SPP1 - Szekretált foszfoprotein 1, mRNS – messenger Ribonukleinsav, dcSSc - diffúz után szisztémás sclerosis, HC – egészséges kontroll, NF- κ B - nukleáris faktor, az aktivált B-sejtek kappa-könnyűlánc-fokozója, IL-10 – interleukin-10, ELISA - enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat

AZ EXOSZÓMÁK BEFOLYÁSOLJÁK A SDC4-FÜGGŐ SEJTMOZGÁST

Fazekas Szuzina¹Becsky Dániel¹, Horváth Péter², Deák Ágota³, Janovák László³, Dux László¹, Keller-Pintér Anikó¹

1 SZTE SZAOK Biokémiai Intézet

2 ELKH SZBK Biokémiai Intézet

3 SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

A sejtek fiziológiás és patológiás körülmények között is felszabadítanak extracelluláris vezikulákat, melyekkel direkt sejt-sejt kontakt nélkül is lehetséges kommunikáció. Az exoszómák 20-100 nm átmérőjű, foszfolipid kettősréteggel határolt extracelluláris vezikulák, melyek lipidek, proteinek és nukleinsavak horizontális szállítására képesek. Biogenezisükben a szindekán-4 (SDC4) proteoglikán szerepet játszik.

A SDC4 expresszióját shRNS-sel csökkentettük C2C12 egér mioblasztokban. Élősejtes mikroszkópia során 18 órán keresztül követtük a sejtek mozgását, a sorozatfelvételeken a sejtek (n=60-222 sejt/sejtvonal) mozgását CellTracker programmal analizáltuk. Exoszómákat differenciált ultracentrifugálással izoláltunk, a frakció tisztaságát és ép exoszómák jelenlétét dinamikus fényszórás (DLS), elektonmikroszkópia és Western blot módszerekkel igazoltuk. A falloidin-jelölt aktin citoskeletont szuperrezolúciós dSTORM mikroszkópiával vizsgáltuk, a képfeldolgozást FIJI programmal végeztük, az elágazások számát és hosszát analizáltuk.

A SDC4 csendesítése csökkentette a mioblasztok által megtett teljes út hosszát, a kezdőponttól mért maximális és vektoriális távolságot, valamint a sejtek átlag- és maximális sebességét. Migrációs kísérleteinkben a kontroll sejtek tenyésztő médiumából izolált exoszóma frakció dóziszfüggően megnövelte a korábbi paramétereket. SDC4-csendesítés hatására a sejtek aktinhálózatának nanoszerkezete megváltozik, deformálódik, mely fenotípus visszaáll a kontroll sejtekéhez hasonló mintázathoz az exoszóma frakció hatására. Míg a kontroll sejtekben a sejt széli és sejt közepi régiók aktin nanoszerkezete azonos, a SDC4-csendesített sejtekben a széli régiók sűrűbb szerkezetet mutatnak, mely különbség az exoszómák hatására megváltozik.

A SDC4 csendesítése csökkenti a mioblasztok migrációját, melyben az exoszómák szerepet játszanak. A SDC4 ubikviter expresszálsága miatt ezen mechanizmusok más sejtípusok migrációját is befolyásolhatják, míg az exoszómák potenciális klinikai alkalmazással bírhatnak.

Rövidítések:

SDC4 – syndecan-4

DLS – Dynamic Light Scattering

dSTORM – direct stochastic optical reconstruction microscopy

Támogatások: NKFI FK 134684, NKFI K 132446, TKP2021-EGA-28, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19/5), UNKP-21-5-SZTE-571, UNKP-21-1-SZTE-47, Nemzeti Tudós Akadémia (FEIF/646-4/2021-ITM_SZERZ)

FUNKCIONÁLIS FESZÜLTÉG-KAPUZOTT NÁTRIUM CSATORNÁK JELEN VANNAK A
HUMÁN B SEJT MEMBRÁNJÁBAN

Fehér Ádám¹

Papp Ferenc¹, Pócsi Marianna², Szántó G. Tibor¹, Csóti Ágota¹, Fejes Zsolt², Nagy Béla², Varga Zoltán¹

1 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

2 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina, Debrecen

A B sejtek bizonyítottan számos ioncsatornát expresszálnak, de a feszültség-kapuzott nátrium csatornák (Na_v) jelenléte a sejtmembránjukban a mai napig nem megerősített. Ebben a tanulmányban elektrofiziológiai és molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottunk több Na_v -ot a humán B sejt membránban. A tetrodotoxin (TTX) érzékenysége a csatornáknak, az eddig publikált adatok alapján, a TTX-szenzitív és -inszenzitív csatornák közé esett, ami az együttes kifejeződését erősíti ezeknek a csatornáknak. Ez a koexpresszió RT-qPCR-rel is bebizonyosodott, mivel az adatok magas TTX-szenzitív, és alacsony TTX-inszenzitív Na_v csatorna mRNS szintet mutattak. A Na_v -ok biofizikai paramétereinél látott variabilitás (félmaximális aktivációs- és inaktivációs potenciál, inaktivációból való visszatérés időállandója) ugyancsak a többféle Na_v együttes jelenlétét feltételezi. Membránpotenciál mérésel vizsgáltuk még a Na_v -oknak a nyugalmi membránpotenciál kialakító/fenntartó szerepét. Az extracelluláris térből elvéve a Na^+ -t, reverzibilis hyperpolarizációt láttunk, ami arra utal, hogy a Na_v csatornáknak meghatározó szerepe van a nyugalmi membránpotenciál kialakításában. Ahogy ez a projekt főleg az elektrofiziológiai paraméterekre volt korlátozva, úgy nem tudjuk kizárni a lehetséges non-kanonikus funkcióját ezeknek a csatornáknak. Ez a tanulmány elsőként mondja ki a funkcionális feszültség-kapuzott nátrium csatornák jelenlétét a humán B sejt membránban. A jövőben érdemes lesz foglalkozni a Na_v -ok potenciálisan betöltött szerepéről a B sejt differenciációban, aktivációban és invázióban.

Na_v : feszültség-kapuzott nátrium csatorna

TTX: tetrodotoxin

RT-qPCR: reverz transzkripcióvalós idejű kvantitatív polimeráz-láncreakció

mRNS: hírvívő ribonukleinsav

Fekete János Tibor^{1,2}, Györfy Balázs^{1,2}

1 Semmelweis Egyetem, Bioinformatika Tanszék, Budapest

2 ELKH Természettudományi Kutatóközpont, Onkológiai Biomarker csoport, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az in vitro sejtvonalak megkerülhetetlenek a daganatos betegségek kezelésében használható terápiás szerek vizsgálatában. Több olyan projekt ismert, amelyekben több száz vegyületet vizsgáltak különböző sejtvonalakon, azonban az adatok különböző adatbázisban való szerepeltetése megnehezíti azok használatát. Célunk az volt, hogy ezen adatokra alapozva egy integrált online platformot hozzunk létre, amely lehetővé teszi a terápiás válasszal kapcsolatos gének azonosítását és validálását.

Az online alkalmazásban négy független adatbázist dolgoztunk fel (DEPMAP, GDSC1, GDSC2, CTRP). A génexpressziós adatok feldolgozása során kvantilis normalizálást használtunk. A terápiás válasz kiértékelésére a forrás adatbázisok IC50 és AUC értékeit kategorizáltuk szenzitív és rezisztens sejtvonalra egyrészt a medián, másrészt az alsó / felső tercilis értékeket használva vágópontként. A génexpresszió és a terápiás válasz közötti kapcsolat elemzésére Mann-Whitney tesztet, random forest algoritmust és ROC elemzést használtunk.

Az elemző felületen összesen 1579 terápiás szer és 1284 sejtvonal adatai érhetőek el. Az alkalmazás egyedi és több gén egyidejű vizsgálatára is alkalmas. További lehetőség, hogy az egyes KEGG útvonalak génjeit együttesen elemezzük és random forest algoritmus segítségével meghatározzuk a terápiás válasszal leginkább összefüggést mutató géneket. Demonstrációs jelleggel vizsgáltuk a KEGG ERBB jelpályában részt vevő gének expressziójának a hatását lapatinib terápia esetén. Az elemzés 240 sejtvonal adatait használta fel, az útvonalba tartozó 87 gén közül 34 mutatott szignifikáns kapcsolatot a terápiás válasszal. A szignifikáns géneket random forest algoritmussal vizsgáltuk, amely a véletlenszerűen kiválasztott tesztalmazon 71%-os pontossággal azonosította a rezisztens és 73%-os pontossággal a szenzitív mintákat. A modell pontossága ROC analízissel ellenőrizve, a görbe alatti terület 0.800 volt.

Az online alkalmazás a www.rocplot.org/cells/ címen érhető el.

Rövidítések:

AUC: görbe alatti terület; CTRP: Cancer Therapeutics Response; Depmap: The Cancer Dependency Map Project; ERBB: Epidermális növekedési faktor receptorcsalád; GDSC: Genomics of Drug Sensitivity in Cancer; IC50: 50%-os gátló hatást okozó koncentráció; KEGG: Kyoto Gén és Genom Enciklopédia; ROC: hatásfokmérő karakterisztika

A TIMAP FEHÉRJE JELÁTVITELI ÚTVONALAINAK VIZSGÁLATA
SH-SY5Y SEJTEKBEN

Fonódi Márton, Boratkó Anita

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudomány Kar, Orvosi Vegytani Intézet; Debrecen

A TIMAP (TGF- β gátolt, membrán asszociált fehérje) fehérje a PP1 (protein foszfatáz 1) holoenzim regulátor alegységeként ismert. Munkacsoportunk számos TIMAP-PP1c szubsztrát fehérjét azonosított endotél sejtekben, mint pl. merlin, ERM (ezrin, radixin, moezin), ECE-1 (endotelin konvertáló enzim 1), illetve eEF1A (eukarióta transzlációs elongációs faktor 1 α), ezáltal feltárva a fehérje komplex szerepét a különböző jelátviteli útvonalakban.

A TIMAP fehérje magas expressziót mutat neuron sejtekben, így érdekessé vált a fehérje részletesebb vizsgálata ebben a sejtípusban is. Kimutattuk, hogy a TIMAP és a PP1c δ alegység is jelen van mRNS és fehérje szinten is a modellrendszerként használt SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekben. A sejtek differenciáltatásakor azonban a TIMAP fehérje és mRNS szintje is jelentősen csökkent, valamint az érett neuron sejtekben a TIMAP a membrán régióból a sejtmagba transzlokálódott. A TIMAP fehérje overexpressziója azonban gátolta a sejtek differenciációját.

A TIMAP idegsejtekben való funkciójának leírásához lentivirális technológiával TIMAP-depletált SH-SY5Y sejt vonalat állítottunk elő. Az öt különböző, TIMAP specifikus shRNS szekvenciát tartalmazó pLKO.1 vektorral történő transzdukció után, az SH-SY5Y sejteket puromycinnel szelektáltuk. A géncsendesítés sikerességét qPCR méréssel, valamint Western blot analízis segítségével ellenőriztük. Transzkripció szinten közel háromszoros, még transzlációs szinten közel tízszeres TIMAP csökkenést figyeltünk meg a nem kódoló lentivirális plazmid kontrollokhoz képest.

Single-end mRNS szekvenálással 604 differenciáltan expresszált gént azonosítottunk a TIMAP csendesítés hatására, melyből 321 megemelkedett 293 csökkent expressziót mutat. ($\log_{2}FC > 1$, $p < 0.01$). Gene Ontology Enrichment analízist felhasználva számos overreprezentált útvonalat azonosítottunk, mint pl. BMP (bone morphogenetic protein) jelátvitel, szinapszis összeszerelődés, adenilát cikláz-moduláló G-protein-kapcsolt jelátvitel, RAC1 GTPáz ciklus, axon irányítás. Jövőbeli terveinket képzik ezen útvonalakban a TIMAP szerepének a vizsgálata.

A munkát támogatta: NKFI FK135384 (BA) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BA).

Rövidítések jegyzéke:

BMP - bone morphogenetic protein ECE-1 - endotelin konvertáló enzim 1

eEF1A - eukarióta transzlációs elongációs faktor 1 alpha

ERM - ezrin, radixin és moesin PP1 - protein foszfatáz 1

PP1c δ - protein foszfatáz 1 katalitikus alegység, δ -izoforma

RAC1 - Rac család kis GTPáz 1

TIMAP - TGF- β gátolt, membrán asszociált fehérje

Gábor Erika¹

Géczi Aliz^{1,2}, Bayan Kharat^{1,2}, Migh Ede³, Beleon Attila³, Horváth Péter³, Széplaki Bence⁴,
Enyedi Márton⁴, Pintér Lajos⁴, Haracska Lajos⁵, Vedelek Balázs⁶, Honti Viktor¹

¹ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, *Drosophila* Vérsejt Differenciálódás Csoport, Szeged

² Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biológia Intézet

³ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport, Szeged

⁴ Delta Bio 2000 Ltd., Szeged

⁵ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Mutagenézis és Karcinogenezis Csoport, Szeged

⁶ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Aktin Sejtváz Szabályozási Csoport, Szeged

A *Drosophila melanogaster* vérsejtképzésének szabályozása evolúciósan konzervált, kitűnően alkalmas az őssejtek működésének, vérsejteredetű tumorok kialakulásának, a vérsejt transzdifferentiálódás folyamatának vizsgálatára. A transzdifferentiálódás során egy funkcionális sejtípus alakul át más funkciójú sejté; a lárvális vérsejtek esetében fagocitáló, kis kerek plazmatociták nagyméretű, kiterült tokképző sejtekké - lamellocitákká differentiálódnak. Kutatásaink során az eddig homogénnek hitt tokképző vérsejtek differentiálódásának és heterogenitásának részleteit tárjuk fel.

Az elmúlt évben egy-sejt transzkriptomika segítségével több laboratórium is megpróbálta a lárvák funkcionális vérsejtípusait újra definiálni; a plazmatocitákat alcsoportokra osztották. Ezen kutatások részletes információt szolgáltatottak az egyes sejtek által kifejezett génekről és rávilágítottak az egyes funkcionális sejtípusok sokféleségére. Ugyanakkor az alkalmazott módszer hátránya, hogy a transzdifferentiálódás során bekövetkező morfológiai változások követését nem teszi lehetővé.

A probléma orvoslására kidolgoztunk egy innovatív, mesterséges intelligencián alapuló komplex módszert, melynek felhasználásával vizsgáljuk a plazmatocita-lamellocita átalakulás részleteit. A kísérletek során *ex vivo* sejt kultúrákban vérsejtekre specifikus transzgenikus riporterekkel monitoroztuk a sejtípusokat, követtük a transzdifferentiálódás lépéseit, majd a felvételeket mélytanuláson alapuló technológiával elemeztük. A különböző fejlődési útvonalakhoz tartozó vérsejteken transzkriptóm analízist végeztünk. Lamellocita alpopulációkat kijelölő géneket azonosítottunk, majd megvizsgáltuk azok kifejeződését és funkcióját a transzdifferentiálódás során.

A vérsejtek differentiálódásának alaposan megértése *Drosophilában* - az evolúciós konzerváltságnak köszönhetően - segíthet jobban megismerni az emlős vérsejtek transzdifferentiálódásának mechanizmusát.

Kutatásainkat az OTKA K-131484 (VH), valamint a RRF-2.3.1-21-2022-00005 pályázatok támogatásával valósítjuk meg.

AZ NKX2.3 TRANZKRIPCIÓS FAKTOR EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN
BÉLBEN

Gábris Fanni¹

Kellermayer Zoltán¹, Kajtár Béla², Balogh Péter¹

1. Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs

2. Pécsi Tudományegyetem, Pathológiai Intézet, Pécs

Bevezetés: Humán gyulladós bélbetegségek (IBD) patogenezisében az Nkx2.3 transzkripciós faktort kódoló gén polimorfizmusai ismert hajlamosító tényezők. Szintén humán mintákban azonosítottak a colon kripták Lgr5⁺ intesztinális őssejtjei körül elhelyezkedő Nkx2.3⁺ miofibroblasztokat, melyek szerepet játszhatnak ezen őssejtek homeosztázisában.

Munkacsoportunk korábban Nkx2.3-deficiens egerekben fokozott colon epitél sejt proliferációt írt le, valamint megfigyeltük, hogy ezekben az egerekben nem váltható ki DSS-indukálta vastagbélgyulladás. Jelen munkánkban különböző életkorú egészséges, illetve felnőtt tumoros colon minták Nkx2.3 transzkripciós faktor expressziós mintázatát vizsgáltuk.

Anyag és Módszer: A PTE KK Pathológiai Intézet szövetbankjából kiválasztott, tumoros és gyulladós elváltozásokat nem tartalmazó mintákat három korcsoportba soroltuk (0-3, 15-20, 50-80 év). A vastagbél-daganatos betegek életkora 64-79 év volt. Paraffin fixált metszeteken anti-humán Nkx2.3 antitest segítségével immunhisztokémiai módszerrel és morfológiai analízissel vizsgáltuk az Nkx2.3 nukleáris kifejeződését.

Eredmények: Az Nkx2.3 a bél lamina propria rétegében, egyes endotél sejtekben és a lamina muscularis mucosae simaizom sejtjeiben fejeződik ki. Az egészséges mintákban a 0-3 éves korcsoportban volt a legmagasabb az Nkx2.3 pozitív sejtmagok száma. A pozitív sejtek arányában és intenzitásában szignifikáns különbség mutatkozott a 0-3 és 15-20 éves korosztály, valamint a 0-3 és 50-80 éves korosztály között (magasabb a 0-3 korosztályban). A colorectalis daganatos mintákban az Nkx2.3 expresszió nagymértékben csökkent az egészséges korcsoportokhoz képest. Appendixben a helyi magas endoteliális venulák (HEV) mutattak intenzív festődést.

Következtetés: Az Nkx2.3 expressziója az életkortól függően eltér, idősekben és colorectalis daganatokban nagymértékben csökken. Az Nkx2.3 transzkripciós faktor szerepet játszhat a bél integritásának fenntartásában, de ennek kapcsolata a tumoros átalakulással további kutatásokat igényel.

VAKCINÁLÁS UTÁNI SARS-COV-2 SPECIFIKUS HUMORÁLIS ÉS CELLULÁRIS IMMUNITÁS
ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES EGYÉNEKBEN VALAMINT AUTOIMMUN
BETEGEKBEN

Gémes Nikolett^{1,4}, Szabó Enikő¹, Neuperger Patrícia^{1,4}, Balog József Á.^{1,4}, Nagy Lajos I.⁶, Honfi Dániel⁵, Szekanecz Zoltán⁷, Puskás László G.^{1,6}, Toldi Gergely⁸, Balog Attila^{5,*}, Szebeni Gábor J.^{1,2,3,*}

¹Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged

²Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, SZTE, TTIK, Szeged

³CS-Smartlab Devices Kft., Szeged; ⁴Biológia Doktori Iskola, SZTE, TTIK, Szeged

⁵Reumatológiai és Immunológiai Klinika, SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szeged

⁶Avidin Kft., Szeged; ⁷Reumatológiai Tanszék és Klinika, DE-ÁOK, Debrecen

⁸Liggins Intézet, Aucklandi Egyetem, Új-Zéland

A vakcináció által létrejövő anti-SARS-CoV-2 immunitás elengedhetetlen az új pandémia elleni védekezésben. A különböző vakcinák által kiváltott humorális illetve celluláris immunválaszról jelenleg kevés adattal rendelkezünk az autoimmun reumás és mozgásszervi betegségek (RMD) csoportjában.

Kutatásunk során a két dózisos – BBIBP-CorV inaktivált, Gam-COVID-Vac és AZD1222 adenovírus alapú, illetve a BNT162b2 és mRNA-1273 mRNS alapú – vakcinák immunogenitását valamint biztonságosságát vizsgáltuk autoimmun RMD betegek (n=89) és egészséges, önkéntes résztvevők (n=74) között. Az oltás hatásosságával és biztonságosságával párhuzamosan vizsgáltuk a neutralizáló anti-RBD (receptor kötő aleggység) specifikus humorális és a SARS-CoV-2 specifikus T-sejtes immunválaszt a második vakcina beadását követően egy illetve négy hónappal.

A betegség-specifikus összehasonlítás azt mutatta, hogy az antitestes válasz a vakcinációt követően 4 hónappal a spondyloarthropatiás csoportban magasabb volt, mint az autoimmun RMD csoportokban. A csökkent immunogenitás kockázati tényezői közé tartozott a betegség hosszabb lefolyása, a magas autoantitestes immunszerológiai profil, valamint a betegek anti-CD20 terápiája. A pozitív anti-RBD antitest válasz aránya az egészséges kontroll csoport esetén a betegekhez viszonyítva, oltás után 4 hónappal inaktivált BBIBP-CorV vírusvakcina esetében 69% vs. 55% volt, 97% vs. 53% a Gam-COVID-Vac és az AZD1222 adenovírus-vektor alapú vakcinák, valamint 100% vs. 81% a BNT162b2 és mRNS-1273 mRNS vakcinák egyesített adatainál. Továbbá, a diagnosztikailag pozitív T-sejtes immunitást az esetek legnagyobb arányában a BBIBP-CorV inaktivált vakcina okozta.

Eredményeink megmutatták, hogy mind az öt vizsgált vakcina immunogén a betegek nagy részében, valamint az egészséges kontroll csoportban, eltérő antitestes és T-sejtes immunválaszt indukálva.

Rövidítések: RMD - reumás és mozgásszervi betegségek, TNF- α - tumor nekrozis faktor-alfa

Forrás: 2020-1.1.6-JÖVŐ -2021-00003 (NKFIH)

AZ *IN VIVO* KANNABIDIOL-KEZELÉS HATÁSA AZ ADENOZINERG RENDSZERRE ZDF
PATKÁNY PITVARON

Viczján Gábor¹, Szilágyi Anna¹, Takács Barbara¹, Óvári Ignác¹, Erdei Tamás¹, Teleki Vanda¹,
Zsuga Judit², Szilvássy Zoltán¹, Juhász Béla¹, Varga Balázs¹, Gesztelyi Rudolf¹

¹ Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

² Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Kar, Egészségügyi Menedzsment és Minőségirányítási
Tanszék

A kannabidiol (CBD) pszichotróp hatással nem rendelkező fitokannabinoid, melyet a 2-es típusú cukorbetegség és egyes idegrendszeri betegségek (pl. epilepszia) lehetséges gyógyszereként kiterjedten vizsgálnak. Célunk annak feltárása volt, befolyásolja-e a CBD a protektív A₁ adenosin receptor funkcióját a szíven.

Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányok „lean” (egészséges) illetve „obese” (2-es típusú cukorbeteg) típusaiból három csoportot alakítottunk ki: konvencionálisan etetett lean, diabetogén tápon tartott obese és a diabetogén táp mellett 4 hétig orálisan CBD-kezelt (60 mg/ttkg/nap) obese patkányok. Az állatok Krebs oldattal feltöltött szervkádakban felfüggesztett és ingerelt (3 Hz, 1 ms, 1-2 V) bal pitvari fülcséin koncentráció-hatás görbét vettünk fel először adenzinnal, majd (mosást követően) A₁ szelektív és alig bomló ciklopentil-adenozinnal (CPA), az inotróp választ mérve.

A CBD-kezelt obese patkányok adenzinra adott válasza kis és közepes koncentrációknál szignifikánsan meghaladta a másik két csoport választát (melyek egymástól nem különböztek), míg a maximális válaszok ugyanakkorák voltak mindhárom csoportban. A CPA-ra adott válasz a kezeletlen obese patkányoknál volt szignifikánsan a legerősebb, míg a CBD-kezelt obese állatoknál a leggyengébb (bár nem különbözött szignifikánsan a lean patkányok választától). A jelenség hátterében a CBD ismert adenosin-transzport gátló hatása állhat, ami megvédi az adenzint az intracelluláris eliminációtól. A maximális hatás változatlanságának oka az lehet, hogy az adenosin koncentráció-hatás görbéje CBD-vel nem kezelt állatokon is szaturált (vagyis az adenzinra adható maximális választ tükrözi). A CBD-kezelt állatokon a CPA-ra adott válasz csökkenését a tartósan fokozott adenzinerg stimuláció miatti enyhe A₁ adenosin receptor deszenzitizáció okozhatta. A CBD-kezelés tehát fokozott adenzinerg védelmet tarthat fenn a szíven (az enyhe A₁ adenosin receptor deszenzitizáció ellenére is).

ZDF: Zucker Diabetic Fatty; CBD: kannabidiol; CPA: ciklopentil-adenozin

Témátámogatás: GINOP-2.3.4-15-2020-00008; TKP2020-NKA-04

A HŐSOKK HATÁSA A HASADÓ ÉLESZTŐ INTRACELLULÁRIS MEMBRÁNRENDSZERÉRE

Gudmann Péter¹, Péter Mária¹, Balogh Gábor¹, Gombos Imre¹, Török Zsolt¹, Vígh László¹, Glatz Attila¹

¹Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Molekuláris Stresszbiológia Csoport, ELKH (6726 Szeged, Temesvári krt. 62.)

A hőstressz elleni intracelluláris védelem vizsgálatához ideális modellszervezet a hasadó élesztő (*Schizosaccharomyces pombe*), amely az emlősökhöz nagyban hasonlító stresszválasszal és jelátviteli útvonalakkal rendelkezik. A HS során jól vizsgálható benne a termoprotektív molekulák – mint hősokkfehérjék (Hsp), trehalóz és lipidek^{1,2} – szerepe. A három nagy, védelemért felelős molekulacsoport egymással kölcsönhatva játszik szerepet a HS elleni védelemben. A sejtmembránok fizikai-kémiai tulajdonságaik révén „hőmérőként” érzékelik a hőmérsékletváltozást. A membránaktivált jelátviteli folyamatok hatására a lipidösszetétel jelentősen megváltozik, így alkalmazkodva az új körülményekhez.

Korábban megmutattuk, hogy az *S. pombe*-ban a triacilglicerolt (TG) raktározó zsírcseppek („lipid droplet”-ek) is aktív szerepet játszanak a hősokk elleni védelemben³. Bizonyítottuk, hogy a mérhető TG szintézisére képtelen, kétszeres nullmutáns (*dga1Δ/plh1Δ*; DKO) törzs hőérzékeny és enyhe HS-t követően is csak hosszú lagfázis után kezd növekedni¹.

Jelen vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy HS hatására mind a vad típusú, mind a DKO sejtekben jelentős változások mennek végbe a sejtek membránnal rendelkező organellumaiban. Az enyhe (40 °C, 1 óra) és szubletális (48 °C, 20 perc) HS körülmények hatására bekövetkező változások nyomon követésére fluoreszcens riporter molekulákat (MitoTracker, MDY-64, ER-thermo-Yellow, stb.) használtunk. A legnagyobb mértékű morfológiai változások - meglepő módon - enyhe HS hatására alakulnak ki a DKO sejtek organellumaiban. A változások érintik többek között az ER-t, mitokondriumokat és vakuólumokat is. A megfigyelt eltérések különböznek mind a vad típusnál látottaktól, mind a szubletális HS-nél tapasztaltaktól. Ennek oka lehet a DKO sejtekben a TG szintézis hiányában sérült „membrane remodelling” képesség és/vagy a fokozott szignál lipid képződés³.

HS: hőstressz, Hsp: hősokkfehérje, LD: lipid droplet, *S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*, TG: triacilglicerol, *dga1*: diacilglicerol O-aciltranszferáz, *plh1*: foszfolipid-diacilglicerol aciltranszferáz, ER: endoplazmatikus retikulum

Ezt a munkát az OTKA 135759 pályázat támogatta.

Hajdu Tímea¹, Mocsár Gábor¹, Nagy Péter¹

¹ Debreceni Egyetem- Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A fluoreszcens festékmolekulákkal ellátott antitesteket rutinszerűen alkalmazzák számos molekuláris biológiai vizsgálómódszer során. A legtöbb laboratóriumban a fluorofórokat az IgG molekula lizin aminosav oldalláncaihoz kapcsolják aspecifikus módon. A fluoreszcens festék jelenléte igazoltan befolyásolja az antitest epitópkötő képességét. Kísérleteink célja annak kiderítése, hogy az IgG-n jelenlévő festékmolekulák száma az antitest egészére és annak bizonyos doménjeihez köthető funkcióira milyen hatást gyakorol.

Az egy antitestre jutó átlagos festékmolekulaszám, vagy másnéven jelölési arány megadására az F/P (fluorofór/protein) jelölést alkalmazzuk. Kísérleteink során a HER2 ellen termeltetett trastuzumab, valamint az MHC-I fehérjét felismerő W6/32 antitest vizsgálatával foglalkoztunk. Áramlási citometriával az antitestek öt funkcióját tanulmányoztuk a jelölési arány függvényében. Egyrészt vizsgáltuk (1) sejt felszíni antigénekhez kötődésüket, vagyis az epitópkötő domén funkcióját, valamint (2) az Fc specifikus, csapdázó antitestekhez való kötődésen keresztül az IgG antigenicitását; továbbá, (3) az antitestek Protein-G fehérjéhez kötődése segítségével a CH1 domén, valamint (4) Protein-A-hoz és (5) Fc receptorhoz történő kötődésén keresztül pedig a CH2 és CH3 domén közötti régió működését. Időfüggő anizotrópiamérésekkel kívántuk körvonalazni a jelölési arány hatását az antitest dinamikai jellemzőire, a könnyű- és nehézlánc egymáshoz viszonyított mozgásának esetleges megváltozására.

Megállapítottuk, hogy a jelölési arány nemcsak az antitest epitópkötő képességét, hanem a másik három vizsgált antitest régió funkcióját is befolyásolja. A magas jelölési arányú antitestek esetében mindegyik funkció szinte ugyanolyan mértékben csökkent, vagyis a fluoreszcens jelölés az antitest egészére kiterjedő funkcionális gyengüléshez vezet. Időfüggő anizotrópiamérésekkel kimutattuk, hogy az antitest könnyű- és nehézláncának csapkodó mozgása a jelölési arány növelésével gyorsabbá válik, ami részben magyarázhatja az antigénkötésben tapasztalt gyengülést, melynek létrejöttéhez az antitest merevebb konformációja szükséges.

Rövidítések:

IgG: immunglobulin-G HER2: Humán epidermális növekedési faktor receptor 2

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex

ELEKTROSTATIKUS SZÁLKÉPZÉssel ELŐÁLLÍTOTT POLIMER SZÁLAK ATOMERŐ
MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATA

Hegedűs Imre^{1a,b}, Pázmány Rita^{1a}, Voniatis Constantinos^{1a}, Kellermayer Miklós^{1b}, Máthé Domokos^{1c}, Jedlovsky-Hajdú Angéla^{1a}

1 Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest a: Nanokémiai kutatócsoport, b: Nanobiotechnológia és egyedi-molekula biofizika kutatócsoport, c: In vivo képalkotó munkacsoport

Az elektrosztatikus szálképzéssel létrehozott membránokat alkotó nanoszálak egyedi fizikai paramétereinek (átmérő, felületi érdesség és rugalmasság) molekuláris szintű megértése fontos az orvosbiológiai felhasználás során. A nanoszálak viszkózus polimer oldatok fecskendőn történő átáramoltásával hozhatók létre, mely során nagyfeszültséget kapcsolunk a tű hegye és a földelt céltárgy közé. A polimer oldat a céltárgy felé haladva ostorozó mozgást végez, mely során az oldószer elpárolog és száraz polimer szál formájában csapódik be. A mintavétel a kialakuló szálak útjába helyezett üveg fedőlemezekkel történt. Négy polimer rendszert vizsgáltunk, polivinil alkohol (PVA), polikaprolakton (PCL), poliszukcinimid (PSI), valamint polikaprolakton/poliszukcinimid hibrid nanoszál (PSI/PCL). A nanoszálak egyedi fizikai tulajdonságait Cypher ES atomerőmikroszkóp (AFM) segítségével határoztuk meg, az átmérőket levegőn vizsgáltuk. A szálak felületének érdességét IgorPro 6.37 program segítségével határoztuk meg. A nanoszálak már kialakulásuk során összeállhatnak kötegekké, vagy szál összeolvadás történhet, ezért méretük szórását mutat. Átmérőik 0,5-1,5 μm között mozognak polimertől függően, a hibrid nanoszál esetében a 2,3 μm -es átmérők is megjelentek. A szálak magassága 0,4-0,8 μm között változik, a hibrid nanoszál 0,6-1,0 μm -es lehet. A PVA és PCL rostok felülete kevésbé érdes (rms kb. 300 nm, N4 ISO-fokozat), mint a PCL és PSI/PCL rostoké (rms 350-500 nm, ISO N5) a 12-es nemzetközi ISO skálán. Az AFM tű vertikális mozgatásával erőgörbét felvéve a nanoszálak hossztengegyére merőleges (tangenciális) Young-modulusait (Y_t) is meghatároztuk. A PVA (0,5-1,5 GPa) és a PSI (0,5-3,5 GPa) keményebb, míg a PCL (0,1-0,5 GPa) lágyabb anyagnak mutatkozik. A PSI/PCL hibrid nanoszálak Young-modulusa 0,1-3,5 között változik, ami éppen a két összetevő (PSI és PCL) nanoszál Y_t értékeinek az összege.

Rövidítésjegyzék: AFM: atomerőmikroszkóp; PVA: polivinil alkohol, PCL: polikaprolakton, PSI: poliszukcinimid, Y_t : tangenciális Young-modulus; rms (root mean square): a felületet alkotó pontok síktól való eltérésének négyzetes átlaga, ISO (International Organization of Standardization): Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.

Hinnah Barbara¹

Fedor-Lénárt Kinga¹, Reglődi Dóra², Módos László³, Juhász Tamás¹

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

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

³Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Szemklinika

A szaruhártya-átültetés (*keratoplastica*) az összes humán transzplantáció közül a leggyakoribb és legsikeresebb műtéti eljárás. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) a központi idegrendszerben azonosított neurohormon, mely számos extraneuronális szövetben receptoraihoz (PAC1, VPAC1, VPAC2) kapcsolódva anti-inflammatorikus és anti-ischaemiás hatást fejt ki. Receptorainak expressziója nem ismert az egyes corneát érintő kórképekben.

Kutatásunk során célul tűztük ki az eltávolított minták PACAP receptor expresszió profiljának vizsgálatát, a kapott eredmények összehasonlítását a műtéti indikációt képező elváltozások, valamint a betegek kór- és műtéti előzményeinek tükrében.

Kutatásunk során a DE KK Szemklinikán perforáló keratoplastica (PKP) során eltávolított corneákat vizsgáltuk (n=70), fiziológias kontrollként elhunytakból izolált corneákat használtunk (n=10). A PAC1, VPAC1, VPAC2 expresszióit RT-PCR-ral és Western blottal követtük nyomon.

A leggyakoribb műtéti indikációt képező szembetegségeként a dystrophiák (n=12), degeneratíók (n=12), bullosus keratopathia (n=6), keratoconus (n=6), illetve ulcusok (n=6) jelentették, társbetegék közül diabetes mellitus (n=7) és hipertónia (n=7) szerepelt a leggyakrabban. A pre-pro-PACAP RNS a kontroll minták 60%-ában, a beteg minták 63 %-ában volt kimutatható. A PAC1, VPAC1, illetve VPAC2 mRNS is kimutatható volt a kontroll és beteg mintákban egyaránt. Az alábbi betegségekben egyik PACAP receptor fehérjeexpressziója sem változott szignifikáns mértékben: keratopathia bullosa, keratoconus, dystrophia, degeneratio, ulcus, virális keratitis, bakteriális keratitis. Továbbá nem befolyásolta, hogy a műtét első vagy többszöri reoperáció, valamint a társbetegségként szereplő hipertónia vagy diabetes megléte sem.

Mivel a receptorok expressziója nem változott az eltérő megbetegedések során, indokolt lehet egy PACAP alapú szemcsepp posztoperatív adagolását célzó kutatás.

Támogató: NKFIHK139396, ÚNKP-21-2-I-DE-246

AZ ATF4-MKP-1-MAPK-MITOKONDRIÁLIS KÁROSODÁS-SEJTHALÁL RETROGRÁD
ÚTVONAL PARP-1 ÁLTALI REGULÁCIÓJA OXIDATÍV STRESS SORÁN

Hocsák Enikő, Kálmán Nikoletta, Antus Csenge, Erős Krisztián, Hegedűs Zoltán, Bognár Zita, Szabó Aliz, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, PTE ÁOK, Pécs

Számos tanulmányban kimutatták, hogy a PARP inhibitorok csökkentik a JNK és a p38 MAPK aktivációját, ami fontos esemény a gyulladásozó folyamatokban és a sejthalált indukáló utakban, de a folyamat molekuláris mechanizmusa máig nem teljesen tisztázott.

Az oxidatív stressz indukálta MAPK aktivációt megvizsgálva kimutattuk a PARP inhibitor (PJ-34) általi MKP-1/Dusp1 expresszió kiemelkedő szerepét a JNK és p38 inaktiváció esetén, valamint a mitokondriális károsodás, és a sejthalál redukciójában. Számos transzkripciós faktor részvételét elemeztük az MKP-1 expressziója során (Hsf1, 2, 4, Creb1 és ATF4/Creb2) és eredményeink azt mutatják, hogy az ATF4/Creb2 lecsendesítése megakadályozza a PARP-inhibitor indukálta MKP-1 expressziót, a mitokondriumok védelmét és végső soron a citoprotekciót. A PARP-1 katalizálja az ATF4/Creb2 poli-ADP-ribozilációját és gátolja annak kötődését a CRE helyhez a DNS-en, így inaktiválva azt. A PARP-1 kötődése a CRE helyhez elősegíti önmaga poli-ADP-ribozilációját, és ez a folyamat gátolható PARP-inhibitorral.

Ezek az adatok rámutatnak arra, hogy a PARP-1-gátlás megakadályozva az ATF4/Creb2 inaktivációját a poli-ADP-riboziláción keresztül, beindítja az MKP-1 expressziót, amely így képes inaktiválni a JNK és a p38 MAPK-ok közvetítette mitokondriális károsodást és a sejthalált.

Ez a PARP-inhibitor indukálta retrográd útvonal fontos lehet az oxidatív stress hatására kialakuló krónikus betegségekben, másrészt a JNK aktivációjának kritikus szerepe van a rákos őssejtek tumor-indukáló képességében. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk feltérképezett útvonal egy további bizonyíték a PARP-inhibitorok kiemelkedő szerepére a modern rákterápiában.

A kutatás az Európai Unió és a Magyar Állam támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg az EFOP-3.6.1-16-2016-00004, ÁOK KA-2021-04, ÁOK KA-2021-11. számú projektek keretén belül.

PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase, MKP-1/Dusp1: MAP kinase phosphatase-1/ dual-specificity phosphatases 1, ATF4/Creb2: activating transcription factor-4/ cAMP response element binding protein 2, CRE: cAMP response element

AZ ABCG2 MULTIDROG TRANSZPORTER VARIÁNSAINAK "TERATÍPUS" SZERINTI
OSZTÁLYOZÁSA

Homolya László

Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

Az ABCG2 egy multispecifikus membrántranszporter, amely a különböző fiziológiai határfelületek sejtjeinek membránjában kifejeződve részt vesz a szervezet toxikus anyagokkal szembeni védelmében. Működése által alapvető befolyással bír a különböző gyógyszermolekulák felszívódásában, kiválasztásában, és a szervezetben történő megoszlásában. Az ABCG2-ben történő genetikai változások vezethetnek csökkent plazmamembrán expresszióhoz és/vagy nem megfelelő transzportfunkcióhoz, amely sokszor a gyógyszerekre adott terápiás válaszok megváltozását, illetve toxikus reakciók kialakulását eredményezheti. A húgysav az ABCG2 egyik endogén szubsztrátja, így a transzporter nem megfelelő működése hyperurikémiához vagy köszvényhez vezethet. A humán ABCG2 multidrog transzporterben nagyszámú polimorfizmust és mutációt azonosítottak, azonban ezek szisztematikus csoportosítása nem történt meg. Ezeket figyelembe véve az ABCG2 variánsok számára egy új osztályozási rendszert javasoltunk, melyben a transzporterben bekövetkező defektus természetét, valamint a fenotípus korrekciójához szükséges stratégiát, az ún. „teratípust” vesszük alapul. Így az ABCG2 ismert genetikai változatai hét különböző osztályba sorolhatók. A mutáns változatok megfelelő klasszifikációjához viszont az ABCG2-ben lévő defektusok megállapítására alkalmas metodikákra is szükség van. A „teratípus” alapú osztályozási rendszert ezért összekötöttük megfelelő módszertannal is. A klasszikus biokémiai és transzport biológiai megközelítéseken túl egy új, dinamikus sejtbiológiai módszert is kidolgoztunk, amely alkalmas az ABCG2 variánsok trafficking hibáinak az azonosítására. Ennek segítségével kimutattuk, hogy az ABCG2 két, a természetben is előforduló és köszvényt okozó polimorf változata (Q141K és M71V) sejten belüli útja során mely lépéseknél szenved el károsodást. A betegek ABCG2 genotípusának megállapítása, valamint annak teratípus szerinti besorolása elősegítheti a személyre szabott terápiák tervezését, mellyel egyrészt a beavatkozások hatékonysága növelhető, valamint megelőzhetőek lehetnek a potenciális toxikus reakciók.

A LIPID RAFT DISZRUPCIÓ BEFOLYÁSOLJA A SEJTÉLETKÉPESSÉGET, A
MEMBRÁNFLUIDITÁST ÉS A TRPM8 IONCSATORNA AKTIVÁCIÓT

Horváth Ádám^{1,2} További szerzők: Steib Anita^{1,2}, Kántás Boglárka^{1,2}, Berenkei Gábor^{1,2},
Erostyák János^{2,3}, Nehr-Majoros Andrea^{1,2}, Helyes Zsuzsanna^{1,2}, Szőke Éva^{1,2}

1 Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai
Intézet, Pécs, 2 Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont és
Idegtudományi Centrum, Pécs, 3 Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar Fizikai
Intézet, Pécs

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák meghatározó szerepet töltenek be számos
élettani/patológiai folyamatban. Sokat tudunk az aktiválhatóságukról, de a sejtmembránnal való
kapcsolatokról keveset. A fájdalom- és hőérzékelésben fontos ioncsatorna, a TRP Melastatin 8
(TRPM8) több más TRP ioncsatorna mellett lipid raftokban helyezkedik el. Ezek koleszterinben,
szfingolipidekben gazdag membránelemek. Integritásuk megbontható meltil- β -ciklodextrinnel
(MCD), amely depletálja a koleszterint, szfingomielinázzal (SMáz) amely hidrolizálja a
szfingomielineket, illetve Myriocinnel (Myr), amely gátolja a szfingolipidek felépülését.
Kutatócsoportunk korábban *in vitro* és *in vivo* is leírta, hogy a lipid raft diszrupció TRP receptor
gátló hatást eredményez.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki az MCD/SMáz/Myr sejtéletképeességre, membránfluiditásra
kifejtett hatásainak, valamint TRPM8 agonista icilinnel kiváltott fájdalomreakcióban
antinociceptív hatásának vizsgálatát. A viabilitásvizsgálathoz CHO sejteken CellTiter-Glo, illetve
MTS módszert alkalmaztunk 24 órás kezeléssel, az anyagok emelkedő koncentrációjával. A
membránfluiditás elemzéséhez Laurdan festéket használtunk kezelt és kezeletlen CHO
sejteken, a fluiditást jellemző paramétereket az időbontott fluoreszcencia-emissziós
spektrumokból számítottuk. *In vivo* icilint injektáltunk hím NMRI egerek jobb hátsó talpába -
amelyeknek egy csoportja MCD/SMáz/Myr előkezelésben részesült - majd 20 percig mértük a
fájdalomreakció idejét. A sejtéletképeességet sem a SMáz, sem a Myr nem befolyásolta egyik
esszében sem, azonban az MCD mindkét módszerrel koncentráció-függő módon elpusztította a
sejteket. A fluoreszcens spektroszkópiai eredmények alapján sem a SMáz, sem a Myr nem
befolyásolta a membránfluiditást, azonban az MCD megváltoztatta azt. Állatkísérletünkben a
SMáz és az MCD szignifikánsan csökkentette az icilin kiváltotta fájdalomreakció idejét, míg a
Myr nem befolyásolta azt. Konklúzióként elmondható, hogy a lipid raftok koleszterin- és
szfingolipid-tartalmának depletálása egyaránt ígéretes farmakológiai támadáspontot jelenthet a
TRP ioncsatornák befolyásolásában.

Rövidítések:

MCD: Metil- β -ciklodextrin, Myr: Myriocin, SMáz: Szfingomielináz, TRP: Tranziens Receptor
Potenciál, TRPM8: Tranziens Receptor Potenciál Melastatin 8,

Támogatók:

NKFI-138936, KTIA_NAP_20017-1.2.1-NKP-2017-00002, GINOP-2.3.2-15-2016-00050, EFOP-
3.6.2-16-2017-00008, ÚNKP-21-3 Új Nemzeti Kiválóság Program, Emberi Erőforrások
Minisztériuma, Richter Gedeon Talentum Alapítvány

GLUING GAP TO KRAS G12D MUTANTS: A NEW APPROACH IN CANCER DRUG
DEVELOPMENT

Randelović Ivan^{1,2}, Svajda Laura², Léner Violetta¹, Hidvégi Anita², Nyíri Kinga^{3,4}, Koppány Gergely^{3,4}, Vértessy Beáta^{3,4}, Rec Tamás⁵, Grolmusz Vince^{5,6}, Kigyós Attila¹, Tóvári József^{1,2}.

1 KINETO Lab Ltd., Budapest, Hungary

2 Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

3 Laboratory of Genome Metabolism and Repair, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

4 Department of Applied Biotechnology and Food Sciences, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary

5 PIT Bioinformatics Group, Eötvös University, Budapest, Hungary

6 Uratim Ltd., Budapest, Hungary

RAS genes comprise the most frequently mutated oncogene family in human cancer with incidence up to 30%, and these tumors are associated with the worst prognosis. Among them KRAS isoform is the most mutated with 84%, where KRAS (G12D) is the most dominant mutant subtype with incidence of 33%, which is present in approximately 70% of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Therefore the development of anti-KRAS therapies is a major priority for cancer research. However, efforts to inhibit the functioning of mutant G12D KRAS have not translated into clinical benefits yet, where the biggest advantage is reached by recently discovered noncovalent, potent, and selective KRAS G12D inhibitor, MRTX1133. Direct targeting of the mutant G12D KRAS protein has proved unsuccessful due to specific three dimensional conformations with no well-defined druggable sites, which also prevent the binding of the GAP protein to its surface, triggering signaling cascade for uncontrolled cell growth. In order to inhibit this signaling, we established a new method for finding small molecules, binding to both the GAP and the mutated KRAS molecules. These small molecules glue together the GAP and the mutated KRAS G12D molecules, thus serving as new cancer drugs. By this new method we identified and selected two small molecule drugs which specifically and selectively inhibit the growth of the pancreatic cancer cell line with KRAS G12D mutation compared to KRAS wild type cancer and normal cell lines. Moreover, one compound showed selective tumor inhibition of pancreatic tumor bearing mice with no toxicity for the experimental animals.

A TT-232 SZOMATOSZTATIN ANALÓG HEPTAPEPTID, MINT ÚJ PERSPEKTÍVA A FÁJDALOMCSILLAPÍTÁSBAN

Kántás Boglárka¹ További szerzők: Borbély Éva¹; Horváth Ádám¹; Pintér Erika^{1, 2, 3}; Helyes Zsuzsanna^{1,2, 3}

1. Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet & Szentágotthai János Kutatóközpont és Idegtudományi Centrum, Pécs
2. PharmInVivo Kft., Pécs
3. Algonist Biotechnologies GmbH, Bécs, Ausztria

Munkacsoportunk korábbi eredményei és irodalmi adatok bizonyították a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásait melyek a SST4 receptor közvetítésével valósulnak meg az endokrin rendszer befolyásolása nélkül, azonban a natív szomatosztatin rövid felezési ideje és szerteágazó hatásai miatt terápiásan nem alkalmazható.

A TT-232 egy SST1/SST4 szelektív agonista heptapeptid, melynek hatásait CFA által kiváltott artritisz és következményes hiperalgéria, valamint az ülőideg részleges leköttetése okozta neuropátiás fájdalom (PSNL) egérmódeljeiben vizsgáltuk. A kísérletekhez hím C57Bl/6 alapú vad típusú (SST4WT) és SST4KO egereket használtunk. A TT-232 kezelést a CFA modellben naponta ismételtük (100 µg/kg, i.p.), a PSNL modellben egyszeri kezelés történt (100, 200 µg/kg, i.p.). Az állatok mechanikai fájdalomküszöbét a kísérletek során dinamikus plantáris eszteziométerrel határoztuk meg, a CFA modellben a lábduzzadás mértékét is mértük pletizmométerrel.

A CFA modellben 25-30%-kal, a PSNL modellben 35-45%-kal csökkent az állatok mechanikai fájdalomküszöbe a beavatkozást követően. A TT-232 a SST4WT egereknél 20-25%-os anti-hiperalgetikus hatást mutatott a CFA modellben ismételt adagolva, a PSNL modellben 15 és 20%-os anti-hiperalgetikus hatással bírt 100, valamint 200 µg/kg dózisban egyszeri adást követően, ezzel szemben a SST4KO egerek fájdalomküszöbére nem volt hatással. A CFA modellben a TT-232 a SST4WT egerek esetén sem befolyásolta lábduzzadás mértékét. Bizonyítottuk a TT-232 anti-hiperalgetikus hatását egér fájdalommodellekben, amelyet az sst4 aktivációja közvetít. Eredményeink alapján a TT-232 ígéretes analgetikumfejlesztési perspektívákat nyithat a krónikus gyulladásos és neuropátiás fájdalom kezelésére.

Rövidítések:

SST4 receptor: szomatosztatin 4 receptor

CFA: komplett Freund-adjuváns

PSNL: partial sciatic nerve ligation

Támogatók: Nemzeti Agykutató Program (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), OTKA K 134214, OTKA K138046, Bolyai János Kutatói Ösztöndíj, ÚNKP-21-3

LINE1 RETROTRANZPOZÍCIÓ,
EGY JELENTŐS SZEREPLŐ A HUMÁN TUMOROK KIALAKULÁSÁBAN?

Khaldoon Sadiq Ahmed Abdullah^{1,2}

Karkas Réka^{1,2}, Pankotai-Bodó Gabriella³, Sükösd Farkas³, Mátés Lajos²

1 Szegedi Tudományegyetem, Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola, 2 Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetika Intézet, Tumor Genom Kutatócsoport, 3 Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Pathológiai Intézet

A LINE1 (Long interspersed nuclear element 1) retrotranszpozon szekvenciák a humán mobilis genetikai elemek egyik legjelentősebb és legabundánsabb csoportja, a genom 17%-át alkotják. A 450.000 kópia túlnyomó többsége inaktív, nem mobilizálható, de körülbelül 100 intakt LINE1 elem jelenleg is képes retrotranszpozícióra. A LINE1 elemek alacsony fiziológiás aktivitása a csírvonal sejtekben evolúciós hajtóerőt biztosít, fenntartja a genetikai variabilitást. Testi sejtekben azonban számos celluláris mechanizmus tartja teljes kontroll alatt a *de novo* LINE1 inszerciók létrejöttét. Számptalan szervezetet érő külső, környezeti hatás vagy patológiás állapot képes e defenzív mechanizmusok megbontására, az így megemelkedő LINE1 aktivitás pedig szomatikus „mutátorként” tumorok kialakulásához járulhat hozzá. Számos „driver” mutáció került leírásra az utóbbi évek során, amelyet új LINE1 integrációs események hoztak létre. A LINE1 elemek aktivációjának és szomatikus kontrollmechanizmusaik megértése tumorbiológiai szempontból jelentős feladat.

Kutatócsoportunk egy, a LINE1 retrotranszpozon által kifejezett fehérje jelenlétét vizsgálja malignus szöveti elváltozásokban. A LINE1 ORF1p egy 40 kDa nagyságú RNS kötő fehérje, melynek jelenléte a LINE1 retrotranszpozíció előfeltétele. Az ORF1p expressziós mintázatának meghatározásával a LINE1 aktivitás karcinogenezisben betöltött szerepét tudjuk vizsgálni. A MolMedEx humán tumorbank 355 mintájából készített *szöveti* multiblokkok (TMA) immunhisztokémiai vizsgálata során határoztuk meg az ORF1p expressziós szintjeit. Az elemzett minták (primer és metasztatikus tumorok) 64%-ában detektálható volt az ORF1 fehérje. Ez a magas előfordulási arány erősíti az ORF1p tumor markerként való felhasználásának lehetőségét is. További kísérleteink során vizsgáljuk az ORF1p immunopozitivitás, és egyes rák „driver” gének mutációinak együttes jelenlétét, valamint esetleges kapcsolatukat az alkalmazott tumorterápiás módszerekkel. Eredményeink alapján a LINE1 elemek remobilizációjának jelentős szerepe lehet a karcinogenezis és a tumor progresszió folyamatában.

Rövidítések:

LINE1: *Long interspersed nuclear element 1*

ORF1p: *Open reading frame 1 protein*

TMA: *Tissue microarray*, szöveti multiblokk

AZ α -KETOGLUTARÁT-DEHIDROGENÁZ KOMPLEX DLST^{+/-} ÉS DLD^{+/-} ALEGYSÉGEK
KIÜTÉSÉNEK HATÁSA AZ OXIGÉNFOGYASZTÁSRA ÉS REAKTÍV OXIGÉNGYÖK-
KÉPZŐDÉSRE EGÉR AGYI MITOKONDRIUMOKON

Kokas Márton
Horváth Gergő, Tretter László

Neurobiokémiai Munkacsoport, Biokémiai Tanszék, Semmelweis Egyetem, Budapest

A mitokondriális Krebs ciklus az energiaátalakításban fontos szerepet játszik, amelynek sebességmeghatározó lépését az α KGDHc katalizálja. A reakció során α KG-ból szukcinil-koenzim A és CO₂ képződik, miközben a NAD⁺ NADH-vá redukálódik. Az enzim három alegységből áll: 2-oxoglutarát-dehidrogenáz; dihidrolipoil-transzszukciniláz; dihidrolipoil-dehidrogenáz. Az α KGDHc alulműködését számos neurodegeneratív kórképben azonosították, így az alegységek hiánya miatt kialakuló bioenergetikai változások tanulmányozása nagy jelentőséggel bír a betegségek patomechanizmusának megismerésében. Számos kutatócsoport megfigyelte, hogy a mitokondriális mátrix dehidrogenázok, így az α KGDHc is, képesek ROS képzésre emelkedett NADH/NAD⁺ arány mellett. Jelen kutatásunkban az α KGDHc DLST és DLD alegység heterozigóta formában történt kiütésének hatását vizsgáltuk a mitokondriális oxigénfogyasztásra és a ROS termelésre különféle légzési szubsztrátok jelenlétében.

Kísérleteinkhez agyi mitokondriumokat izoláltunk a következő egérmodellekből: vad típusú, DLST^{+/-} heterozigóta géнкиütött, DLD^{+/-} heterozigóta géнкиütött, és DLST^{+/-}, DLD^{+/-} kettős heterozigóta géнкиütött. A mitokondriális oxigénfogyasztást Clark-típusú polarográfiás oxigénelektóddal, míg a H₂O₂ termelést Amplex UltraRed segítségével fluoreszcensen mértük.

Az α -KG-tal energizált mitokondriumok O₂ fogyasztása ADP jelenlétében mindhárom KO típusban szignifikánsan csökkent a vad típushoz viszonyítva, míg szukcináttal lélegeztetett mitokondriumok légzését az α KGDHc alegységeinek hiánya nem befolyásolta. A H₂O₂ termelés α -KG-tal energizált mitokondriumban ADP jelenlétében és Komplex I gátlószer hozzáadása után alacsonyabb volt a transzgén csoportokban a kontrolhoz képest. Szukcináttal való energizálás esetén ADP nélkül magas H₂O₂ termelést lehetett mérni a reverz elektron transzportnak köszönhetően. A DLD^{+/-} és DLST^{+/-}, DLD^{+/-} kettős géнкиütött mitokondriumokban jelentősen alacsonyabb volt a RET által generált ROS-képződés a kontrolhoz viszonyítva.

Eredményeink bizonyítják az α KGDHc alegységeinek ROS-képzésben betöltött fontos szerepét a forward és reverz elektrontranszport során patológiás körülmények között.

α KG: α -ketoglutarát; α KGDHc: α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex; DLD: dihidrolipoil-dehidrogenáz; DLST: dihidrolipoil-transzszukciniláz; H₂O₂: hidrogén peroxid; OGDH: 2-oxoglutarát-dehidrogenáz; RET: reverz elektrontranszport; ROS: reaktív oxigéngyökök

A MITOKONDRIÁLIS KOENZIM Q REDOX ÁLLAPOT ÉS A MITOKONDRIÁLIS
OXIGÉNFOGYASZTÁS PÁRHUZAMOS MÉRÉSE IZOLÁLT MITOKONDRIUMOKBANKomlódi Tímea^{1,2}Luiza Cardoso¹, Tretter László², Erich Gnaiger¹

1 Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria

2 Neurobiokémiai Munkacsoport, Biokémiai Tanszék, Semmelweis Egyetem, Budapest

A tápanyagok lebontásából származó redukáló ekvivalensek (NADH, FADH₂) a mitokondriális elektrontranszport rendszerben oxidálódnak az oxigén redukciójával és ATP szintézisével kapcsolatban. A CoQ a mitokondriális elektron transzport rendszer (mETR) központi eleme, amely biztosítja az elektronok szállítását a CI és CII-ről, valamint egyéb dehidrogenázokról (pl. α -glicerofoszfát dehidrogenáz) a CIII felé. A CoQ redox állapota jól tükrözi a mETR redukáltságát és oxidáltságát fiziológiás és patológias körülmények között. Munkánk során olyan műszert fejlesztettünk ki, amely képes a mitokondriális oxigénfogyasztás és a CoQ redox állapotának párhuzamos mérésére izolált mitokondriumokban és permeabilizált sejteken.

A CoQ redox állapotának mérése háromelektrodos rendszerrel történik (üveges szénelektrod, referenciaelektrod, platina segédelektrod), amelyhez szükség van kívülről adott rövid oldalláncú oxidált CoQ₂ molekulára. A CoQ₂ egyensúlyban van a mitokondriális CoQ-val, így redukálódik a CI-n, CII-n valamint oxidálódik a CIII-n. Egyensúlyi állapotban a CoQ₂ redox állapota tükrözi a mitokondriális CoQ redox állapotát. A mitokondriumban redukált CoQ₂ a szénelektrodon oxidálódik, miközben a segédelektrod és a szénelektrod között mérjük az áramerősséget. A CoQ₂ (és a CoQ) redukciója az áramerősség növekedésével, oxidációja az áramerősség csökkenésével jár együtt.

Kísérleteinket egér agyból és szívből izolált többféle légzési szubsztráttal energetizált mitokondriumokon végeztük. ADP nélkül a CoQ₂ redukált, az O₂ fogyasztás alacsony, majd ADP hatására a CoQ₂ oxidálódik, a légzés fokozódik. Szétkapcsoló hatására a légzés tovább nő és a CoQ₂ tovább oxidálódik. A CoQ₂ redukáltságának mértéke nemcsak a mitokondrium kapcsoltsági állapotától, hanem az alkalmazott légzési szubsztrátoktól is függ.

Eredményeink meggyőzően mutatják, hogy a CoQ₂ redox állapota jól tükrözi a mitokondriális CoQ redukáltsági állapotát.

CI: komplex I; CII: komplex II; CIII: komplex III; CoQ: koenzim Q; CoQ₂: két izoprenoid egységet tartalmazó koenzim Q; mETR: mitokondriális elektrontranszport rendszer

A CR2 (CD21) KOMPLEMENTRECEPTOR GÁTOLJA AZ EMBERI B-SEJTEK BCR-INDUKÁLT AKTIVÁCIÓJÁT, BLASZTOGENEZISÉT, PROLIFERÁCIÓJÁT ÉS ELLENANYAG-TERMELÉSÉT

Kovács Kristóf György^{1,2}

Mácsik-Valent Bernadett², Lukácsi Szilvia², Matkó János¹, Bajtay Zsuzsa^{1,2}, Erdei Anna^{1,2}

¹Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológiai Tanszék, Budapest

²Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport, Budapest

Bevezetés

A CR2-t (2-es típusú komplementreceptor, CD21) általánosan a B-sejt-receptor (BCR) aktiváló koreceptorának tekintik emberben, döntően az egér-B-sejtek vizsgálatának eredményeire alapozva és figyelmen kívül hagyva a szakirodalom ellentmondásosságát, valamint a két faj közötti alapvető eltéréseket. Kutatásunk e lényeges, ugyanakkor erősen vitatott kérdés tisztázására és az emberi CR2 funkciójának tanulmányozására irányult.

Módszerek

Emberi vérből és mandulából izolált B-sejtekhez a CR2 természetes ligandumaként használt C3d és a BCR-stimulusként alkalmazott anti-IgG/A/M streptavidinnel képzett komplexét adtuk. Az így megvalósuló BCR és CR2 keresztkötésének hatását a következő B-sejt funkciók esetében vizsgáltuk: azonnali Ca²⁺-válasz, a CD69 (korai aktivációs marker) kifejeződése, az IL-6 (proinflammatorikus citokin) szekréciója, a blasztogenezis, a proliferáció, valamint az ellenanyag-termelés (IgM és IgG).

Eredmények

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció növelésére önmagában képtelen, szuboptimális BCR-stimulus C3d-vel együtt alkalmazva fokozott Ca²⁺-választ eredményezett. A CD69 kifejeződését, az IL-6 szekrécióját, a blasztogenezist, a proliferációt, továbbá az IgM- és IgG-termelést szignifikánsan és dóziszfüggően gátolta a C3d, különösen az alacsony BCR-stimulusok esetében. Mindez azt mutatja, hogy a C3d az emberi B-sejtek sejtciklusát feltartóztatja – szemben az egér-B-sejtek esetében leírtakkal, miszerint az növekedési faktorként funkcionál.

Következtetés

Eredményeink bizonyítják, hogy a CR2 gátló koreceptorként szolgál a BCR számára az emberi B-sejteken. Korábbi vizsgálataink és irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy ennek háttérében az áll, hogy az emberi B-sejteken a CR2 molekula a szignifikánsan gátló hatású CR1 (CD35) receptorral szoros komplexben fordul elő, és ez utóbbi hatása érvényesül. Következésképpen – ellentétben a tankönyvi dogmával – a C3d nem nevezhető az immunválaszt serkentő általános molekuláris adjuvánsnak, azt csak az egér esetében bizonyították.

Köszönetnyilvánítás

ELTE (TKP2020-IKA-05), OTKA (K112011), MTA, Széchenyi (VEKOP-2.3.3-15-2017-00021).

Rövidítésjegyzék

BCR: B-sejt-receptor, CD: differenciálódási klaszter, CR: komplementreceptor, Ig: immunglobulin, IL: interleukin.

AZ IMMUNELLENŐRZŐPONT-GÁTLÓSZEREK TERÁPIÁS HATÁSÁNAK ELŐSEGÍTÉSE
TIROZIN-KINÁZGÁLTÓK SEGÍTSÉGÉVEL

Kovács Szonja Anna^{1,2}
Dr. Györfly Balázs^{1,2}

1 Semmelweis Egyetem, Bioinformatika Tanszék, Budapest

2 ELKH Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet, Budapest

A melanoma kezelésében nagy fellendülést jelentettek az immunellenőrzőpont-gátlószerek (anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1), annak ellenére, hogy hatásaik elmaradtak a várttól. Reménykeltő azonban, hogy a kezelések kombinálhatóak más terápiákkal is (pl. kinázgátlókkal) a klinikai válasz növelésének érdekében. Célul tűztük ki, hogy olyan potenciálisan célozható gyógyszer-célpontokat (kinázokat) azonosítsunk be, amelyek az immunterápiára adott terápiás választ potenciózhatják. Vizsgálatainkhoz immunellenőrzőpont-gátlószerekkel kezelt betegek publikusan elérhető géneexpressziós és klinikai adatait gyűjtöttük össze különböző tumorokból. Az eltérő géneexpresszió vizsgálatának statisztikai kiértékeléséhez Mann-Whitney-tesztet, - a túléléselemzéshez Cox regressziót használtunk. Ezeknek segítségével kapott listát további szűrési feltételeknek vetettünk alá: géneexpressziós változás mértéke ($FC > 1.5$) és a nem reagáló betegek száma ($n > 100$). Az adatbázis 1,290 metasztatikus melanoma mintát (720 darab vérminta és 570 szövetminta) dolgoz fel. A betegek a-PD-1 ($n=501$) vagy a-CTLA-4 ($n=842$) kezelésben részesültek, amelyből 53-an együttesen kapták a kétféle kezelést. A legjobb ROC AUC értéket elérő kinázok további szűrése után 21 kinázt találtunk, amelyeket manuális vizsgálatnak vetettünk alá. A kinázok közül a PI4K2A-t ($p=8.9E-09$; $FC=1.84$; $n=268$) és az SRC-t ($p=4.69E-08$; $FC=1.60$; $n=268$) találtuk a legígéretesebbeknek. Túlélési elemzés eredményeként a PI4K2A és SRC negatív prognosztikus szerepét igazoltuk világossejtes veserákban ($p=0.0047$; $p=6.8e-9$) és hepatocelluláris karcinómában ($p=0.0045$; $p=4.9e-5$). A PI4K2A és SRC tirozin-kinázok magasabb expresszióját mutattuk ki az immunellenőrzőpont-gátlószerekre nem reagáló betegekben. Eredményeinket tervezzük validálni C57BL/6JRj egér modellen. Összefoglalva, előzetes eredményeink arra engednek következtetni, hogy a PI4K2A és SRC kiemelt jelentőséggel bírhat a melanóma progresszióját tekintve és hozzájárulhat az immunterápiás kezelésekkal szembeni rezisztencia kialakulásához.

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4

PD-1: Programmed Cell Death Protein 1

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1

FC: Fold Change

PI4K2A: Phosphatidylinositol 4-Kinase Type 2 Alpha

SRC: Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Src

ROC AUC: Receiver Operating Characteristic Area Under the Curve

CELLULÁRIS MEMBRÁNOK BIOFIZIKAI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA GAUCHER-FENOTÍPUSÚ NEURONÁLIS SEJTMODELLBEN

Kovács Tamás¹

Vigh Barbara¹, Szabó Máté¹, Cs. Szabó Bence¹, Székelyhidi Virág¹, Kurtán Kitti¹, Panyi György¹, Nagy Péter¹, Zákány Florina¹

¹Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A lizoszomális béta-glükocerebrozidáz (GBA) örökletes deficienciája által okozott Gaucher-kór patognómikus eltérése a glükozilceramid (GlcCer) felhalmozódása az intracelluláris organellumok membránjában és a plazmamembránban, amely révén azok biofizikai jellemzői jelentősen megváltozhatnak, hozzájárulva a betegség patomechanizmusához. A Gaucher-kórban leginkább érintett sejtek a makrofágok mellett a neuronok, amelyek eltérései megfelelő modellrendszer hiányában még jórészt ismeretlenek.

Célul tűztük ki egy új neuronális Gaucher-modellrendszer membránbiofizikai karakterizálását. Ehhez a GBA^{-/-} egerekből származó immortalizált kortikális neuronokból álló modellben környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórok (TMA-DPH, Laurdan, PY3174, di-8-ANEPPS és F66) spektrofluorimetriás, konfokális mikroszkópos és áramlási citométeres vizsgálatával jellemeztük a membránbiofizikai eltéréseket kontroll GBA^{+/+} sejtekhez viszonyítva. Emellett konfokális mikroszkópia, F66 és intracelluláris organellumokra specifikus markerek használatával karakterizáltuk különböző kompartmentumok membránjait.

Eredményeink alapján a GBA^{-/-} neuronokban a GlcCer akkumulációja a membránbiofizikai paraméterek eltéréseivel társul. A GBA^{-/-} neuronokban a GBA^{+/+} neuronokhoz képest ugyanis szignifikánsan lecsökken a membránok fluiditása, illetve hidrációja (a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája, illetve a Laurdan generalizált polarizációja (GP) magasabb), valamint megnövekszik a lipid rendezettség mértéke (a PY3174 GP értéke emelkedett). Emellett megnőtt a membránhoz asszociált molekuláris dipólok rendeződéséből származó és a membrán belsejében jelentős pozitív potenciálként megjelenő dipólpotenciál nagysága (az intramembrán elektromos erőter nagyságával arányos di-8-ANEPPS excitációs arány megnőtt, míg az azzal negatívan korreláló F66 emissziós arány lecsökkent). Különböző intracelluláris organellumokat vizsgálva azt találtuk, hogy a dipólpotenciál különösen a lizoszómákban emelkedett, amely eltérés nagyobbak bizonyult, mint a plazmamembránban.

Kísérleteink során karakterizáltuk az újonnan leírt GBA^{-/-} neuronális Gaucher-fenotípusú modellrendszer membránbiofizikai eltéréseit, valamint validáltunk egy olyan mérési módszert, amely alkalmas lehet élő sejtek celluláris membránjainak biofizikai karakterizálására *in situ*.

ÚNKP-21-4-II-DE-137, ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-3-I-DE-233, ÚNKP-21-3-I-DE-316

Rövidítések: di-8-ANEPPS: 4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só, F66: N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxi-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só, GBA: lizoszomális béta-glükocerebrozidáz, GlcCer: glükozilceramid, Laurdan: 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin, PY3174: 4-[2-(6-Dibutilamino-5-fluoro-naftalen-2-il)-vinil]-1-(3-trietilammonio-propil)-piridinium dibromid, TMA-DPH: 4'-(trimetilammonio)-difenilhexatrién

A TILORON METABOLIKUS HATÁSAI MAGAS ZSÍRTARTALMÚ DIÉTA ESETÉN *IN VIVO*
EGÉRMODELLBEN

Köhler Zoltán Márton¹

Trencsényi György², Horváth Barnabás¹, Halász Judit³, Szenci-Kaszás Balázs¹, Szabó Kitti¹,
Kovács Mercédesz¹, Dux László¹, Schaff Zsuzsa³, Rovó László⁴, Keller-Pintér Anikó¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Biokémiai Intézet; Szeged

² Debreceni Egyetem, Nukleáris Medicina Intézet; Debrecen

³ Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet; Budapest

⁴ Szegedi Tudományegyetem, Fül- Orr- Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinika; Szeged

A tiloron széles spektrumú antivirális (influenza, Ebola, SARS-CoV-2) hatása mellett képes fokozni az epitélisejtekben a TGF- β szupercsaládba tartozó BMP-k expresszióját. A BMP-mediált SMAD1/5/8-SMAD4 jelátvitel többek között a GLUT4 transzkripcióját befolyásolja, valamint a GLUT4 a sejtmembránba történő áthelyeződését is szabályozhatja inzulin jelenléte nélkül a PI3K/Akt2/AS160 jelpálya által. Munkánk célja a tiloron metabolikus hatásának vizsgálata magas zsírtartalmú étrend (HFD) esetén *in vivo* egérmodellben.

A 6 hetes kísérlethez 12-14 hetes, hím C57BL/6 egereket alkalmaztunk [kontroll, HFD, valamint HFD + tiloron (3. héttől 3 naponta 25 mg/ttkg) csoportok]. Hetente mértük a testtömeget és vércukorszintet, valamint az utolsó héten a glükóz toleranciát. PET/CT-vel a radioaktív glükóz analóg (¹⁸FDG) felvételt és szöveti eloszlást vizsgáltuk. A kísérleti idő végeztével mértük a szerv- és izomtömegeket, a máj lipid akkumulációját, továbbá a fehérjék expresszióját és foszforilációját Western blot technikával.

Jelentős súlygyarapodást, emelkedett vércukorszintet és csökkent glükóz toleranciát tapasztaltunk a HFD hatására, melyet a tiloron csökkentett. A HFD fokozta a hasi zsír mennyiségét, továbbá csökkentette a vizsgált vázizmok, szív és máj tibiahosszra normalizált tömegét. A PET/CT eredmények alapján a tiloron javítja a vázizom, zsírszövet, szívizom és máj ¹⁸FDG felvételét. Az AS160 foszforilációja és a GLUT4 expresszió fokozódása a tiloron kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett. A máj hisztológiai vizsgálata alapján a HFD hatására diffúz, dominánsan mikrovezikuláris steatosis (S3/3) alakult ki a mintákban, a tiloron hatására ezen vezikulák száma és mérete csökkent.

Eredményeink alapján a magas zsírtartalmú diétával szembeni számos pozitív hatása felveti a tiloron alkalmazásának, illetve az általa indukált jelpálya befolyásolásának lehetőségét 2-es típusú cukorbetegség terápiájában, mely további vizsgálatokat igényel.

Támogatások: NKFI FK 134684, NKFI K 132446, TKP2021-EGA-28, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19/5), UNKP-21-5-SZTE-571.

TGF- β : transzformáló növekedési faktor béta; BMP: csont morfogenetikus fehérje; GLUT4: glükóztranszporter 4; PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz; AS160: Akt-szubsztrát 160 kDa; HFD: magas zsírtartalmú diéta; PET/CT: pozitron emissziós tomográfia/ computer tomográfia; ¹⁸FDG: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy- β -D-glükóz

A TILORON JAVÍTTJA A GLÜKÓZFELVÉTELT *IN VIVO* ÉS *IN VITRO* VÁZIZOMSEJTEKBE A BMP JELÁTVITEL ÉS GLÜKÓZ TRANSPORTER SZINTEK NÖVELÉSÉVELKöhler Zoltán Márton¹Trencsényi György², Juhász László³, Zvara Ágnes⁴, Szabó Judit², Dux László¹, Puskás László⁴, Rovó László⁵, Keller-Pintér Anikó¹¹ Szegedi Tudományegyetem, Biokémiai Intézet; Szeged² Debreceni Egyetem, Nukleáris Medicina Intézet; Debrecen³ Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet; Szeged⁴ Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat, Szegedi Biológiai Kutatóközpontja, Funkcionális Genomika Laboratórium; Szeged⁵ Szegedi Tudományegyetem, Fül- Orr- Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinika; Szeged

A vázizomzat méretéből adódóan jelentős szereplő a szervezet glükóz anyagcseréjében. Insulin rezisztenciakor azonban a károsodott sejten belüli jelátvitel hatására elmarad a vázizomzat vércukorszint szabályozó funkciója. Egy antivirális szer, a tiloron képes a BMP-k transzkripcióját és jelátvitelét fokozni. A BMP-k a PPAR γ -n keresztül segíthetik a GLUT4 szintézist, valamint a PDK1/PI3K/Akt útvonalon a citoplazmából a sejtmembránba történő transzlokációját.

In vitro kísérleteinkhez C2C12 egér mioblasztokat (20 és 35 nM tiloron kezelés, 40 óra) és C2C12 sejtekből differenciáltotott miotubulusokat (2 és 5 órás akut kezelés, 20 nM tiloron) használtunk. A transzkripció változások vizsgálatára qPCR-t és mRNS szekvenálást, a fehérje mennyiségi és aktivációs vizsgálatokhoz western blot-technikát, míg a GLUT1 és GLUT4 intracelluláris kimutatására immuncitokémiát végeztünk. Továbbá Packard Cobra II gamma counterrel a sejtek ¹⁸FDG felvételét, Oroboros O2k respirométerrel a mitokondriális respirációt tanulmányoztuk. A glükózfelvétele gyakorolt hatás *in vivo* vizsgálatához C57BL/6 egereket intraperitoneálisan oltottunk tiloronnal (2x25 mg/kg), majd nanoScan PET/MRI-vel követtük nyomon ¹⁸FDG szövet szintű eloszlását.

Tiloron hatására mioblasztokban nőtt a BMP-k és Smad4 transzkripciója, valamint a BMP-k szabályozta Smad1/5/8 foszforiláltsága. Nőtt a PPAR γ , vele a GLUT4, valamint a transzlokációjához szükséges Akt2/AS160 útvonal elemeinek foszforiláltsága is. Az AS160 foszforiláltsága a differenciált sejtekben is fokozódott. A kezelés hatására a radioaktív jelölt glükóz felvétele emelkedett a mioblasztokban. Bár a mitokondriumok mennyiségében és biogenezisét szabályozó PGC-1 α -ban nem tapasztaltunk különbséget, az alap és ATP kapcsolt mitokondriális légzésben csökkenést detektáltunk. *In vivo* nőtt a ¹⁸FDG felvétel a vázizomban, májban és zsírszövetben.

Eredményeink új perspektívát nyitnak a 2-es típusú cukorbetegség kezelésében a BMP útvonal szabályozása révén.

Támogatások: NKFI FK 134684, NKFI K 132446, TKP2021-EGA-28, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19/5), UNKP-21-5-SZTE-571

BMP: csont morfogenetikus fehérje; PPAR γ : peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ ; GLUT4: glükóztanszporter 4; PDK1: foszfinozidid függő protein kináz1; PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz; ¹⁸FDG: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi- β -D-glükóz; AS160: Akt-szubsztrát 160 kDa; PGC-1 α : peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ koaktivátor 1

AZ AP39 HIDROGÉN-SZULFID DONOR MOLEKULA HATÁSA ÖREGEDÉSSEL
ÖSSZEFÜGGŐ GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA POLGA^{D257A} EGÉR BEN

Kőszegi Balázs¹

Kálmán Nikoletta¹, Bárándi Gergő¹, Hampuch Ádám^{1,2}, Veres Balázs¹

1 Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

2 Pécsi Tudományegyetem TTK, Biológia Intézet, Állatszervezettani és Fejlődésbiológiai
Tanszék, Pécs

A hidrogén-szulfid (H₂S) mint gáztranszmitter az utóbbi évtizedekben a kutatások célpontjává vált. A H₂S-termelő reakciók zavara többek között kapcsolatba hozható az öregedéssel, gyulladásos folyamatokkal, kardiovaszkuláris betegségekkel. Emellett bizonyították a H₂S citoprotektív, reaktív oxigén gyök elimináló hatását és az intracelluláris szignáltranszdukcióban betöltött szerepét.

Kísérleteink során a H₂S hatását egy deficiens DNS-polimeráz gammát (POLG) expresszáló (PolgA^{D257A}) egértörzsön vizsgáltuk. A hibás mitokondriális DNS-polimerázt expresszáló állatok mitokondriumaiban az akkumulálódó mutációk felgyorsult öregedéshez és rövidebb élettartamhoz vezetnek. Feltételezzük, hogy a mitokondriumba irányított AP39 molekulából felszabaduló H₂S mérsékelheti ezen elváltozásokat és befolyásolhatja az öregedéssel összefüggő gének expresszióját.

Kísérleteink során PolgA^{D257A} és vad típusú egereket kezeltünk AP39-el, illetve hatóanyag és vivőanyag kontrollal 7 hónapon keresztül, majd máj-, vese-, izom-, szív- és lépszövetből 17, az öregedés folyamatával összefüggésbe hozott gén génexpressziós vizsgálatát végeztük el qPCR-al. Emellett monitoroztuk az állatok testsúlyának változását is.

Eredményeink alapján az AP39 molekulával kezelt egerek és a kontroll csoportok között a testsúlyban nem mutatkozott különbség. A vizsgált génexpressziós változások szöveti eltérést mutattak, az AP39 hatása leginkább a máj és szív mintákban mutatkozott, a hatóanyaggal kezelt állatok esetén több génnél is jelentős változást tapasztaltunk.

PACAP ÉS TGF β JELÁTVITELI UTAK mRNS EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN
ENDOMETRIOSIS MINTÁKBANKulcsár Máté¹Szegeczki Vince¹, Fazekas László¹, Orlik Brigitta², Török Péter³, Jakab Attila³, Reglődi Dóra⁴,
Juhász Tamás¹¹DE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Debrecen, ²DE KK Patológia Intézet, Debrecen,³DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Debrecen, ⁴PTE Anatómiai Intézet, Pécs

A méhüregben kívül elhelyezkedő, és a női nemi ciklus hormonális változásaira reagáló méhnyálka esetén beszélünk endometriosisról. Legújabb kutatások feltételezik, hogy az endometriális őssejtek migrációs és inváziós képessége megnövekszik bizonyos transzkripciósfaktorok fokozott expressziója miatt. Az ectopiás szövet ilyen típusú megtelepedését a TGF β jelátviteli út befolyásolhatja. A PACAP, amelynek szerepét leírták különböző exkréciós mirigyekben, crosstalk mechanizmus segítségével kontrollálhatja a TGF β szignalizációt.

Jelen kutatás célja, PACAP-kezelt endometrioid szövetek TGF β jelátvitelének vizsgálata.

A Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán eltávolított műtéti endometrioid mintákat (n=6) öt kezelési csoportba osztottuk: kontroll, etanolos kontroll, hormon (ösztradiol és progeszteron), PACAP és hormon-PACAP kezelt csoportokba. A hormonkezeléssel a női nemi ciklus változásait igyekeztünk imitálni. A kezelést követően, 15 molekula mRNS expresszióját vizsgáltuk konvencionális RT-PCR segítségével.

A VPAC1 receptor minden mintában expresszáldott, míg a PAC1R és VPAC2R jelenléte variabilis volt. A hormon-PACAP kezelt csoportnál szignifikáns csökkenést detektáltunk a TGF β R-II, Smad3, Nanog, Aromatase és p21 esetében. Ugyanezen csoport esetén, tendenciózus csökkenést figyeltünk meg a TGF β -1, TGF β -I, Smad2, Sox2 és VEGF mRNS expressziójánál. Az Oct4 transzkripciósfaktort a minták csupán felénél mutattuk ki.

Összefoglalva, az endometrioid szövetben expresszáldnak PACAP-kötő receptorok. Továbbá, a PACAP hormonok jelenlétében befolyásolja a TGF β jelátvitelt, illetve azon molekulák mRNS expresszióját, amelyek szerepet játszanak az endometriosis kialakulásánál. A jövőben szükséges ugyanezen molekulák vizsgálata ép, eutópiás endometriumban, amely alátámaszthatja a jelen kutatás eredményeit.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-3-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült. További támogató: NKFIHK139396

PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid)

VEGF: vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor)

A NIKOTINSAV-SZÁRMAZÉK BGP-15 NYÚL MODELLEN JAVÍTJA A DIASZTOLÉS
FUNKCIÓT
CGMP-PKG ÚTVONALON KERESZTÜL

Lampé Nóra¹, Priksz Dániel¹, Szekeres Réka Mária¹, Garami Gréta¹, Kovács Árpád², Bombicz Mariann¹, Ráduly Arnold Péter³, Gesztelyi Rudolf¹, Tóth Attila³, Papp Zoltán³, Hamdani Nazha⁴, Szilvássy Zoltán¹, Juhász Béla¹

¹Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet

²Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika, Debrecen, Kardiológiai Klinika

³Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kardiológiai- és Szívsebészeti Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék

⁴Ruhr Egyetem, Molekuláris és Kísérleti Kardiológiai Intézet, St. Josef Kórház

Korábbi vizsgálatokban a BGP-15 gyógyszerjelölt kedvező hatásokat mutatott szívelégtelen rágcsálómodelleken, illetve izom-disztrófiák esetén. Hipotézisünk szerint javíthatja a diasztolés funkciót ateroszklerotikus eredetű kardiomiopátia modelljén. Hiperkoleszterinémiás (HC) nyúlmodellt alkalmazva, a gyógyszerjelölt akut hatásait i.v. adás után echokardiográfiásan követtük, krónikus hatásainak vizsgálatához pedig per os 16 héten át kezeltük az állatokat. A kezelés végén echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk, mértük az endothel-függő vazorelaxáció mértékét, szérum paramétereket határoztunk meg, majd a bal kamara izolálását követően molekuláris biológiai technikákkal vizsgáltuk a Protein Kináz G (PKG) útvonal fehérjéit. Eredményeink szerint mind az egyszeri, mind a krónikus BGP-15 kezelés szignifikánsan javította a diasztolés funkciót (E/e', E/A, IVRT, DecT, Tei-index), annak ellenére, hogy a vaszkulátúra állapotán nem volt képes változtatni. A krónikus kezelésben részesült minták esetén a foszfolambán Ser16 foszforilációja emelkedett, a SERCA pumpa expressziója nem változott. A BGP-15 gátolta a PDE1 enzimet, a PDE5 expressziója csökkent, a cGMP szintje és a PKG enzim aktivitása megnövekedett a kezelt csoportban. A titin PKG-függő foszforilációja növekedett, mely hozzájárulhat a diasztolés funkció javulásához.

Következtetésként a BGP-15 emeli a cGMP-PKG-PLB-titin jelátviteli út aktivitását és javítja a diasztolés paramétereket nyúl modellen. Mivel a gyógyszerjelölt korábbi humán vizsgálatokban biztonságosnak bizonyult, indikációbővítése indokolt lehet diasztolés diszfunkció irányába.

BGP-15: O-[3-piperidino-2-hidroxi-1-propil]-nikotinsav amidoxim; cGMP: Ciklikus guanozin-monofoszfát; DecT: Decelerációs idő; E/A: korai és késői (pitvari) mitrális beáramlási csúcshullám aránya; E/e': korai mitrális beáramlási csúcshullám és a mitrális anuláris korai mozgási sebesség aránya; HC: Hiperkoleszterinémiás; IVRT: Izovolumetriás relaxációs idő; PDE: Foszfodiészteráz; PKG: Protein Kináz G; PLB: Foszflambán; Ser: Szerin; SERCA: Szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz;

Támogatás: GINOP-2.3.4-15-2020-00008, TKP2020-IKA-04, TKP2020-NKA-04

EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK *IN SITU* VIZSGÁLATA 2D SEJTVONALAKBAN ÉS 3D BIO-
NYOMTATOTT SEJT TENYÉSZETEK BEN

Lenzinger Dorina¹, Németh Krisztina¹, Koncz Anna¹, Dankó Titanilla², Petővári Gábor², Raffay Regina², Lőrincz Péter³, Sebestyén Anna², Buzás Edit^{1,4,5}, Visnovitz Tamás¹

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

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

³ Eötvös Loránd Egyetem, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

⁴ HCEMM-SU Extracellular Vesicles Research Group, Budapest

⁵ ELKH-SE Immun-Proteogenomikai Extracelluláris Vezikula Kutatócsoport, Budapest

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) kulcsfontosságú szereplők a sejtek közötti kommunikációban, antigén prezentáló és raktározó funkciókat láthatnak el. A sejtek membránjáról való lefűződés után többnyire gömb alakot vesznek fel, önmaguk megszokozására képtelen részecskék.

Kísérleteink célja 2D sejtenyészetek által kibocsátott és az élő szöveti formációkhoz közelebb álló, 3D bio-nyomtatott sejtekről lefűződő EV-k összetételének és morfológiájának vizsgálata konfokális mikroszkóppal és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM).

A 3D bio-nyomtatott sejtenyészetekben alginát biztosította a sejtek növekedéséhez szükséges vázat. A sejteket és környezetüket fixálás után immunfluoreszcensen jelöltük. Hogy megfelelően láthassuk a sejtek és a lefűződő EV-k külső felszínét, a plazmamembránokat a laboratóriumunk által kifejlesztett lactadherin alapú módszerrel jelöltük. A műgyantába ágyazott mintákból készült ultravékony metszeteket TEM segítségével vizsgáltuk.

A lactadherin alapú jelölési rendszernek köszönhetően az EV-eket képződésük helyén, széles mérettartományban figyelhettük meg. Azonosítottunk a 2D és 3D sejtenyészetek mindegyikében extracelluláris, nagyméretű, multivezikuláris test (MVB)-szerű struktúrákat. 3D tenyészetek esetén az alginát-scaffold és a sejtek által termelt extracelluláris mátrix jelentősen hozzájárultak a sejteket körülvevő és lefűződő EV-k megfigyelhetőségéhez. Az alginát-scaffold a mintaelőkészítés során sérül, kontrasztosításkor erősen elektrondenzé válik, így TEM segítségével az alginátban elhelyezkedő EV-k nehezen vizsgálhatók. TEM felvételeken azonosítottuk az *en bloc* lefűződő, MVB-szerű partikulumokat és azok szerkezetét.

Az MVB-szerű struktúrákat mindegyik kísérleti elrendezésben megfigyeltük. Ez a nemrégiben felfedezett EV szekréción mechanizmus (Valcz G, Buzás E et al. J Extracell Vesicles, 2019) jelen eredményeink alapján egy újfajta, általánosan jelenlévő EV felszabadulási útvonal lehet. A 3D bio-nyomtatott sejtenyészetek új vizsgálati környezeteket és módszereket biztosítanak, kiterjesztve a sejtek mikrokörnyezetének megfigyelhetőségét, és új EV szekréción útvonalak megismerésének lehetőségét.

EV: extracelluláris vezikula

MVB: multivezikuláris test

TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp

β_2 -INTEGRINEK SZEREPE EMBERI MIELOID SEJTEK MIGRÁCIÓJÁBANLukácsi Szilvia¹Balazsin Viktor², Erdei Anna^{1;2}, Bajtay Zsuzsa^{1;2}

1 MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport, ELKH, Budapest

2 Immunológiai Tanszék, ELTE, Budapest

A β_2 -integrin család négy heterodimer receptort foglal magába: LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) és CD11d/CD18. Közülük a CR3 és a CR4 komplementreceptoroknak sokszor azonos szerepet tulajdonítanak, ugyanis az extracelluláris doménjeik nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak és ligandum specificitásuk is részben átfedő. Kutatócsoportunk korábbi eredményei azonban munkamegosztást bizonyítottak a két komplementreceptor között, hiszen fiziológias körülmények között a CR3 játszotta az iC3b-vel opsonizált *Staphylococcus aureus* fagocitózisában a fő szerepet, míg a fibrinogénhez való adherenciában a CR4 domináns funkcióját mutattuk ki (Sándor és mtsai, 2016; Lukácsi és mtsai, 2017). Jelenlegi kutatásunk célja a receptorok migrációban betöltött szerepének felderítése és a sejtmotilitáshoz elengedhetetlen receptor átrendeződés vizsgálata.

Monocita eredetű makrofágok és dendritikus sejtek migrációs kapacitását transwell esszé segítségével mértük fiziológias és LPS indukált gyulladással körülmények között. Az LPS hatását a receptorok internalizációjára és reciklizációjára áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával követtük nyomon. A fehérjék lebomlásának arányára az internalizált receptorok és a lizoszómák közötti kolokalizáció mértékéből következtettünk.

Eredményeink bizonyítják, hogy mind a CR3, mind a CR4 részt vesz a sejtek migrációjában, melyhez a receptorok gyors aktivációja és folyamatos reciklizációja társul. Ezzel ellentétben az LFA-1 molekula sejtfelszíni mennyisége változatlan maradt, melyet az LPS jelenléte sem befolyásolt. Az intracelluláris receptorok és a lizoszómák között tapasztalt alacsony kolokalizációs ráta alátámasztja, hogy a receptorok nem az endoszómális lebontás útvonalára kerülnek, hanem a sejtek felszínére visszakerülve újbóli ligandumok megkötésére válnak alkalmassá. A transzmigrációban való részvétel és a gyors reciklizáció alátámasztja a receptorok jelentőségét a leukociták mozgásában. Ezért fontosnak tartjuk tovább vizsgálni az internalizáció vezikuláris útvonalait és az intracelluláris receptorok újbóli kikerülésének mechanizmusát.

CR3/4	3/4-es típusú komplementreceptor (complement receptor)
iC3b	inaktivált C3b komplementfragmentum
LFA-1	limfocita funkció asszociált antigén 1 (lymphocyte function-associated antigen)
LPS	lipopoliszacharid

PEPTID TOXIN EREDETŰ RIANODIN RECEPTOR GÁTLÓSZER VIZSGÁLATA

Magyar Zsuzsanna Édua¹Dr. Pethő Zoltán², Dr. Varga Zoltán³, Dr. Tóth Gábor⁴, Dr. Almássy János^{1,6}

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

2 Wilhelms-Universität Münster, Medizinische Fakultät, Institut für Physiologie II, Münster

3 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

4 Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi kar, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged

6 Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi kar, Élettani Intézet, Budapest

A rianodin receptor (RyR) a szarko-endoplazmás retikulum (SR) membránjában található ligandfüggő ioncsatorna, mely fiziológias körülmények között idegi ingerület hatására megnyílik és Ca^{2+} -ot szabadít fel az SR-ből, ami kiváltja az izom összehúzódását. Munkacsoportunk korábban már vizsgálta egy skorpiótoxin, a maurocalcin (MCA) vázizom típusú RyR (RyR1) működésére gyakorolt hatását és megállapítottuk, hogy a MCA a RyR pórusába jutva a csatornát félig nyitott állapotban rögzíti. Mivel ez a hatás jelentősen növeli a RyR-en keresztül folyó áramot, nem számít jó gyógyszerjelöltnek. Ezért az MCA további vizsgálata helyett MCA-hoz hasonló, ismert pórusblokkoló toxinokat kerestünk, mely során a K^+ -csatorna blokkoló charybdotoxin (CHTX) és a MCA közötti szerkezeti hasonlóságra figyeltünk fel. A CHTX-nal végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a CHTX már 40 nM koncentrációban bezárja a RyR1-t. Mivel a K^+ -csatornák blokkolásáért a 27. pozícióban elhelyezkedő lizin felelős, a 27. pozícióban a lizint aszparaginnal (K27N) helyettesítő változatát teszteltük. Eredményeink szerint a K27N változat megőrzi a RyR1-gátló képességét. A CHTX és a RyR1 háromdimenziós szerkezetének használatával molekulamodellezést végeztünk, hogy megtaláljuk a pórusblokkért felelős aminosavat, amely három lehetséges találatot is adott. Ez alapján a 11-es pozícióban lévő lizin, a 18-as pozícióban lévő lizin és a 34-es pozícióban lévő arginin cseréje külön-külön megtörtént, majd a három mutáns (K11N, K18N, R34Q) hatását vizsgáltuk. A K11N és a K18N a K27N-hez hasonló hatással rendelkezik, viszont az R34Q csaknem hatástalannak bizonyult, így a toxin RyR1 blokkoló képességéért a 34-es pozícióban lévő arginin a felelős. Az eredmények nyomán a CHTX farmakotechnológiai optimalizálásán is dolgozunk, mely során a toxin membrán permeabilitásának növelése a cél.

RyR – rianodin receptor

RyR1 – vázizom típusú rianodin receptor izoforma

SR – szarko-endoplazmás retikulum

MCA – maurocalcin

CHTX – charybdotoxin

A TUMOROS ÉS NORMÁL SZÖVETEK KÖZÖTT MEGŐRZÖTT GÉNEXPRESSZIÓS
KORRELÁCIÓK AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FONTOSSÁGÁRA UTALNAK
HASNYÁLMIRIGY KARCINÓMÁBAN

Menyhart Otília^{1,2}, Bartha Áron^{1,2}, Györfly Balázs^{1,2}

¹Semmelweis Egyetem, Bioinformatika Tanszék és II. sz. Gyermekklinika,

²ELKH, Enzimológiai Intézet, Onkológiai Biomarker Kutatócsoport,

A génexpressziós mintázatban fellelhető korrelációk gyakran közös irányítás alatt álló és/vagy hasonló szerepet betöltő géneknek köszönhetőek. Feltételezésünk szerint a tumoros és normál szövetben egyaránt megőrzött génexpressziós korrelációk létfontosságúak lehetnek a sejtek életben maradásához, ezért ezek feltárása újabb célpontot szolgáltathat személyre szabott terápiák fejlesztésére. A hasnyálmirigy karcinóma rossz prognózissal társuló, limitált terápiás lehetőségekkel rendelkező daganatos megbetegedés, ahol nagy szükség van új, hatékonyabb biomarkerek azonosítására. Célunk ezért a konzervált génexpressziós korrelációk feltárása volt tumoros és normál hasnyálmirigy szövetminták összehasonlítása révén.

A génexpressziós adatok az NCBI GEO és a TCGA adatbázisokból származnak. A microarray adatszettből kinyert 248 tumoros és 108 normál minta összességében 12,210 gén expressziós mintázatának vizsgálatát tette lehetővé. RNS-szekvenálási adat 177 tumoros és 4 normál szövetből állt rendelkezésre, melyhez további 248 normál minta génexpressziós mintázata járult (GTE_x), összességében 21,479 gén expressziós adatát tartalmazva. Mann-Whitney U teszt segítségével határoztuk meg a génexpressziós eltéréseket ($p < 0.01$), majd Pearson korrelációval határoztuk meg a tumorokban és normál szövetben egyaránt előforduló korrelációs mintázatot.

Összességében 371 közös, mind tumorban, mind normál szövetben előforduló génexpressziós korrelációt sikerült azonosítanunk, melyek mind a microarray, mind az RNS-szekvenáláson alapuló adatokban egyaránt fellelhetőek voltak. A korrelációban szereplő gének jelentős része az extracelluláris mátrix szerkezetének kialakításában játszik szerepet, melyek közül hét gén (SPARC, COL6A3, MMP2, HTRA1, FN1, PALLD, and COL3A1) jelentősen felülreprezentált a közös korrelációkban. 28 gén esetében a magas expresszió rossz kimenettel társult ($FDR \leq 10\%$). Kiemelt figyelmet kapott az FN1 gén, melynek magas kifejeződése rövidebb túléléssel társult ($p = 0.00097$, $FDR \leq 5\%$); valamint a MYL12A and MYL12B gének, melyek expressziós szintje szignifikánsan emelkedett a normál, tumoros és metasztatikus szövetminták között.

A konzervált korrelációkban szereplő extracelluláris matrix komponensek és a köztük fellépő kölcsönhatások új kombinációs terápiák lehetőségét teremtik meg. Fontos hangsúlyozni, hogy két különböző platformról származó adatok esetében sikerült azonosítanunk a megőrzött korrelációkat, mely az eredmények valóságára utal.

A VILÁGOSSEJTES- ÉS PAPILLÁRIS VESEDAGANATOK METABOLIKUS JELLEMZÉSE ÉS
ÚJ TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEIK

Moldvai Dorottya¹, Krencz Ildikó¹, Vetlényi Enikő¹, Dankó Titanilla¹, Petővári Gábor¹,
Sztankovics Dániel¹, Szalóki Gábor¹, Sebestyén Endre¹, Pápay Judit¹, Végső Gyula¹,
Sebestyén Anna¹

Semmelweis Egyetem – Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet – Budapest

A vesedaganatok leggyakoribb szövettani alcsoportjai a világossejtes- (ccRCC) és papilláris (pRCC) típusok. Késői diagnózis esetén – amikor a műtéti beavatkozás már nem kuratív – a betegek palliatív kezelésben részesülnek. A klinikai kutatásokban ccRCC esetében 432, míg pRCC esetén csupán 22 aktív klinikai vizsgálat zajlik. Az előrehaladott, rossz prognózisú pRCC esetében így nagy szükség van új terápiás lehetőségek kidolgozására.

Munkánkban a két szövettani típus közötti általános metabolikus különbségeket humán ccRCC (786-O) és pRCC (ACHN) sejtvonalakban vizsgáltuk. Tanulmányoztuk mTOR- (rapamycin) és metabolikus gátlókkal (doxycycline, metformin stb.) szembeni érzékenységüket és metabolikus fenotípusuk jellegzetességeit Wes Simple, LC-MS és különböző proliferációs tesztek (Alamar Blue, Suforhodamine B assay) segítségével. A sejtvonalakban és a humán mintákban immunfestésekkel is meghatároztuk a metabolikus útvonalak aktivitását jelző enzimek (GLUT1, G6PD, GLS, CPT1A stb) és szabályozó útvonalak markereinek (mTOR, pS6, Rictor stb) expresszióját.

In vitro kísérleteinkben az RCC sejtvonalak általános emelkedett mTOR-aktivitását figyeltük meg. A ccRCC sejtvonal (786-O) emellett magas glikolitikus aktivitást, míg a pRCC (ACHN) emelkedett OXPHOS aktivitást és alternatív szubsztráthasznosítással összefüggő enzim expressziós mintázatot mutatott. Az altípusok közötti különbségeket humán mintákon végzett immunhisztokémiai festésekkel is igazoltuk. A különböző metabolikus kezelésekben az előbbieknél megfelelően érzékenység különbségeket mutattunk ki, a több metabolikus útvonalat gátló kombinációs kezelések pedig szignifikáns proliferációgátló hatásokat mutattak (rapamycin+metformin, rapamycin+doxycycline), különösen pRCC esetén.

Vizsgálataink rámutatnak a szövettani altípusok fő metabolikus különbségeire: a ccRCC energiaellátását elsősorban a glikolízis, míg pRCC esetén az alternatív metabolikus útvonalak, a glutaminolízis, acetáthasznosítás biztosítja, jelentős pentóz-foszfát út aktivitás mellett. Eredményeink felhívják a figyelmet a metabolikus fenotípusnak megfelelő, akár kombinációs kezelések további széleskörűbb vizsgálatára.

Támogatás: NKFI-FK-128404 ED_17-1-2017-0009, ÚNKP_19_I-SE-80; STIA-KFI2020

ccRCC – clear cell renal cell carcinoma pRCC – papillary renal cell carcinoma
mTOR – mammalian target of rapamycin
LC-MS - liquid chromatography - mass spectrometry (folyadékkromatográfia – tömegspektrometria)
GLUT1 – glucose-transporter 1 G6Pd – Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GLS – Glutaminase CPT1A – Carnitine Palmitoyltransferase 1A
pS6 – foszforilált S6 riboszomális protein OXPHOS – oxidatív foszforiláció

Rictor – Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin

MEMBRÁNTRANSPORTHOZ KAPCSOLHATÓ GÉNEK METILÁCIÓS VÁLTOZÁSAI A
VASTAGBÉL ADENOKARCINÓMA KIALAKULÁSA SORÁN

Müller Dalma^{1,2}, Gyórfy Balázs^{1,2}

^{1,2} TTK, Enzimológiai Intézet, Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Budapest

^{1,2} Semmelweis Egyetem, Bioinformatika Tanszék, Budapest

Célkitűzések. A DNS metiláció a tumorgenezisben során betöltött jelentőségét évtizedekkel ezelőtt felismerték: genomi szinten a rákos sejtekre globális hipometiláció, illetve bizonyos gének promóter szekvenciáira hipermetiláció jellemző. A metilációt teljes genom szinten vizsgáló platformok közül az Illumina HumanMethylation450k a legnépszerűbb, nagy mintaszámmal foglalkozó tanulmányok számára alkalmas platform.

Anyag és módszer. Az adatbázis létrehozásához a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbázisban való szisztematikus keresésből, illetve a GDC adatbázisból származó nyers jelintenzitás és klinikai adatot használtunk fel. Az adatokat R programkörnyezetben, a *minfi* programcsomag segítségével dolgoztuk fel. A géneken belüli metilációs különbséget a gének különböző régióira (promóter, 5'UTR, első exon, géntest, 3'UTR) bontva vizsgáltuk. A gének összehasonlítását Mann-Whitney-próbával végeztük el és a szignifikáns különbséget mutatókat a metiláció mértékét kifejező beta-értékek különbsége szerint rangsoroltuk és a Galaxy szerver online platformján végeztünk gén ontológia elemzést.

Eredmények. Egy 1559 mintából származó adatot tartalmazó adatbázist hoztunk létre, mely 791 egészséges, 131 adenóma és 637 adenokarcinóma szövetből származó adatot tartalmaz. A szignifikáns metilációs növekedést mutató különbséget mutató gének között szerepeltek az FDA (Food and Drug administration) által engedélyezett biomarkerek, valamint ismert biomarker jelöltek (pl. *SEPT9*, *SFRP2*, *C1orf70*). A gén ontológia elemzés eredményeképpen azt figyeltük meg, hogy a membrántranszport csoportba sorolt géneket érintő szignifikáns metilációs események elsősorban a promóter és az első exon régióban voltak megfigyelhetőek és a zsírsavak membrántranszportjával kapcsolatban voltak a leggyakoribbak.

Megbeszélés. Publikus adatok felhasználásával létrehoztunk egy adatbázist és az elemzéséhez szükséges munkafolyamatot, mely kiindulópontja lehet új DNS-metilációs biomarkerek azonosításának vastagbél daganatban. Mindemellett a membrántranszportban részt vevő fehérjék expresszióját befolyásoló metilációs folyamatok vizsgálatát is célként tűztük ki a vastagbél adenokarcinóma kialakulását befolyásoló tényezők jobb megértése céljából.

A CXCR4-CXCL12 JELÁTVITEL SZEREPE A COLORECTUM KÜLSŐ BEIDEGZÉSÉNEK
KIALAKULÁSÁBAN

Halasy Viktória, Szőcs Emőke, Soós Ádám, Jancsovcics Dalma, Kovács Tamás, Nagy Nándor
Simmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes
Embryológia Laboratórium, Budapest

A bélidegrendszer idegi ganglionok intrinsic hálózata és a perifériáról származó extrinsic eredetű idegrostok alkotják. A Remak-ganglion egy dúcléc eredetű őssejtekből származó ganglionált képlet, amely a cloacától a vékonybél proximális szakaszáig terjed és szerepet játszik a bél külső beidegzésében. A Remak-ganglion a cloaca falában található plexus pelvicus folytatásaként alakul ki, amiből a bélfejlődés korai szakaszában idegrostok nőnek az utóbél muscularis rétegébe. A veleszületett rendellenes beidegzés motilitási zavart okoz a béltraktusban, azonban az embryonális bél extrinsic beidegzésének hátterében zajló molekuláris mechanizmusok nagyrészt ismeretlenek. *In situ* hibridizációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a CXCR4 receptorhoz kötődő CXCL12 chemokin molekula a Remak-ganglion és a plexus pelvicus körüli mesenchymában is kifejeződik. Előzetes eredményeink alapján feltételeztük, hogy a CXCR4 jelátvitel a vérképző és primordiális őssejtek ontogenezise mellett, részt vesz a vastagbél extrinsic beidegzésének embryonális fejlődésében.

Csirke, egér és humán embryokon végzett CXCR4 *in situ* hibridizációs jelöléseket, szöveti rekombinációs technikákkal ötvözve kimutattuk, hogy a CXCR4 receptor a dúcléc eredetű őssejtek azon alpopulációjára specifikus, amiből az utóbél idegrendszerének extrinsic elemei fejlődnek. Rekombináns CXCL12 fehérje jelenlétében tenyésztett utóbelekből szignifikánsan megnőtt az extrinsic idegrostok axonprojekciója, míg a CXCR4 jelátvitelt blokkoló AMD3100 hozzáadása gátolta a dúclécsejtek kivándorlását és az axonok kinövését az *in vitro* tenyésztett explantátumokból. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a CXCR4/CXCL12 jelátvitelnek nélkülözhetetlen szerepe van a colorectum külső beidegzésének embryonális fejlődésében.

NKFI grant: 138664

INTRATUMOR HETEROGENITÁS ÉS A TMEM45A FEHÉRJE VIZSGÁLATA TÜDŐ
ADENOKARCINÓMÁBAN EGYSEJT TÖMEG CITOMETRIÁVAL

Neuperger Patrícia^{1,2}, Balog József Ágoston^{1,2}, Furák József³, Tiszlavicz László⁴, Szalontai Klára⁵, Mán Imola⁶, Kotogány Edit¹, Puskás László^{1,6} és Szebeni Gábor János^{1,7}

¹ Funkcionális Genomika Laboratórium, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

² Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

³ Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Klinika, Mellkassebészeti Osztály

⁴ Szegedi Tudományegyetem, Pathológiai Intézet

⁵ Csongrád Megyei Mellkasi Betegek Szakkórháza

⁶ Avicor Kft

⁷ Fiziológiai és GLP Toxikológiai Labor, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szegedi Tudományegyetem

Célkitűzés: A világ egyik vezető elhalálozási oka a tüdőrák a magas mortalitási rátája miatt. Kezelését nagymértékben megnehezíti a heterogenitás ténye, mivel tumoron belül a sejtek alpopulációi más fenotípust mutatnak. Ebből kifolyólag egyre fontosabbá válnak a multiplex és heterogenitást figyelembe vevő, egysejt-szintű vizsgálatok.

Anyagok és módszerek: Kísérleteinkhez 3 humán nem kissejtes tüdő adenokarcinóma: az A549, H1975 és H1650 sejtvonalakat használtunk, emellett humán sebészeti tüdő tumor mintákat is vizsgáltunk.

Módszereink központi eleme az egysejt tömeg citométer, mely fémozotópokkal konjugált antitesteket használ, ezzel lehetővé téve multiparaméteres, akár egy mintából 44 fehérje egysejt szintű vizsgálatát. A sejtvonalak sejtciklusát hidroxüreával szinkronizáltuk, majd áramlási citométerrel ellenőriztük.

Hisztopatológiai mintákon TMEM45A expressziót és HIF1- α kolokalizációt vizsgáltunk.

Eredmények: A sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitást közös markerexpresszió alapján, egy több dimenziós tér redukálásával különböző vizualizációs technikákkal szemléltettük. A sejtvonalak fenotípusa egymástól eltérő mintázatot mutat, illetve sejtvonalon belül is elkülöníthetőek az egyes markereket gyengén és erősen expresszáló populációk. Az egészséges humán primer tüdőszövettel szemben a humán primer invazív acináris adenokarcinóma tumorban legerősebb változást mutató markerek az MCT4, GLUT1, CA9 és TMEM45A, melyek expressziója tízszeresére nőtt. Az immunhisztokémiás tüdő tumoros metszeteken a TMEM45A (n=17) a nem tumoros emfizémás kontroll mintákhoz képest (n=3) erősen fejeződik ki. A tumor metszeteken a TMEM45A és a HIF1- α részleges kolokalizációt mutat.

Megbeszélés: Kimutattuk, hogy a sejtciklus szinkronizálása ellenére, a sejtvonalon belüli heterogenitás továbbra is fennáll, a sejtvonalak adekvát modellek, ahol a heterogenitás nem a sejtciklus különböző fázisaiból adódik. Primer humán tüdő adenokarcinóma mintán elsőként azonosítottuk a sejt felszínén a TMEM45A fehérjét, aminek az expresszióját immunhisztokémiával igazoltuk.

Rövidítések: TMEM45A - transzmembrán fehérje 45A, HIF1- α - Hipoxia indukált faktor-alpha, MCT4 - Monokarboxilát transzporter 4, GLUT1 – Glükóz transzporter 1, CA9 – Karboanhidráz 9

A HUMÁN SZTEARIL-KoA DESZATURÁZ-5 (SCD5) IZOFORMÁK ELTÉRŐ SZÖVETI
EXPRESSZIÓJÁNAK NYOMÁBAN

Orosz Gabriella¹, Szabó Luca¹, Kereszturi Éva¹

¹Semmelweis Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék, Budapest

Napjainkban nagy figyelem irányul a telített zsírsavak káros hatásainak vizsgálatára, és azokra a mechanizmusokra, amelyek képesek lehetnek a zsírcil-KoA túlkínálat csökkentésére. A lipotoxicitással szembeni védekezés kulcsenzimeit a telítetlen zsírsavak szintéziséért felelős sztearil-KoA deszaturázok (SCD). Az 5-ös izoformáról azonban igen keveset tudunk.

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy az SCD5 A és B, valamint az SCD1 milyen arányban vannak jelen a különböző humán szövetekben. További célunk volt az SCD5 splicing mechanizmusának vizsgálata.

Az SCD1-et és az SCD5 A és B variánsok expresszióját qPCR-rel detektáltuk. Az SCD5 A és B formák intron szerkesztési különbségeit SCD5 minigén konstrukció segítségével vizsgáltuk.

Meghatároztuk az SCD5 A és B relatív expresszióját és arányát, valamint az össz sztearil-KoA deszaturáz expressziót tíz különböző humán szövetben. Az A variáns 10–100-szor nagyobb mennyiségben van jelen a B-hez képest. Bizonyos szövetekben SCD1 túlsúly figyelhető meg (máj, tüdő), más szövetek inkább az SCD5-öt fejezik ki (hasnyálmirigy, petefészek), megint máshol viszont az SCD1:SCD5 arány kiegyenlített (agy). Mivel az SCD5 B forma minden szövetben csupán töredéke az A változatnak, a gén két kritikus intronját tartalmazó expressziós konstrukció segítségével bizonyítottuk, hogy mind az 3-as, mind pedig a 4-es intron kivágódhat.

A jelentősen eltérő szöveti SCD1:SCD5 arány a két forma eltérő szerepét feltételezi, mely azonban további intenzív kutatást igényel. A létrehozott SCD5 minigén konstrukcióval bizonyítottuk, hogy mindkét SCD5 variáns releváns intronja képes kivágódni *in vitro*, megteremtve a lehetőséget a humán szövetekben tapasztalt expressziós mintázat kialakulási mechanizmusának vizsgálatára.

A munkát az NKFIH FK_138115 pályázat segítette.

SCD1 és 5: sztearil-KoA deszaturáz-1 és 5

EGY ÚJ PÓK-PEPTID, MELY HATÁSSAL VAN A $K_v1.5$ FESZÜLTSEGFÜGGŐ
KÁLIUMCSATORNÁRA, EZÁLTAL POTENCIÁLIS ANTIARRITMIÁS-SZER

Fehér Ádám¹, Csóti Ágota¹, Diana Alvarado², Samuel Cardoso-Arenas², Ligia-Luz Corrales-García^{2,3}, Herlinda Clement², Iván Arenas², Pavel Andrei Montero-Dominguez², Timoteo Olamendi-Portugal², Fernando Zamudio², Jesús Borrego^{1,2}, Panyi György¹, Varga Zoltán¹, Gerardo Corzo² és Papp Ferenc¹

¹ Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

² Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

³ Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Colombia.

A pókmérgek különböző peptideket tartalmaznak, amelyek módosítják az ioncsatornák működését, főként a gerjeszthető rovarsejtekben. A pókmérgek tudományos kutatása a peptid-toxinok széles skáláját tárta fel, amelyek különböző farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, még az emlősfajok esetében is. A humán $K_v1.5$ feszültség-kapuzott káliumcsatorna a pitvari akciós potenciál egyik fontos alkotója. Mutációi a pitvarfibrilláció örökletes formáihoz kapcsolódnak. Harminc különböző állat méreganyagának hatását vizsgáltuk meg a humán $K_v1.5$ ioncsatornára, amely a pitvarfibrilláció terápiájának potenciális célpontja. Az *O. supermirabilis* pók teljes méreganyagát, patch-clamp mérésekkel teszteltük CHO-sejtekben kifejezett $K_v1.5$ ioncsatornán. A méreganyag aktív komponensének azonosítása érdekében HPLC „fordított fázisú” frakcionálást végeztünk. Sikerült is izolálni az aktív peptidet, amit *Osu1*-nek neveztünk el. Az *Osu1* hasonló hatást mutatott a $K_v1.5$ -re, mint a teljes méreg, ezért meghatároztuk az *Osu1* elsődleges szekvenciáját, majd az öt kódoló gént. A rekombináns *Osu1*-et (*rOsu1*) *E. coli* expressziós rendszerben termeltettük. Mikromoláris koncentrációban az *rOsu1* ugyanazt a modulációt mutatta a $K_v1.5$ -ön, mint a természetes *Osu1* és a teljes méreganyag. Nevezetesen, az áram amplitúdójának csökkenése mellett az ionáram aktivációs kinetikája is lelassult, ami arra utal, hogy az *Osu1* a $K_v1.5$ feszültségérzékelő részéhez kötődik, megváltoztatva a csatorna kapuzási kinetikáját. Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amely az *Oculicosa supermirabilis* pók mérgeét vizsgálja. Az *Osu1* egyike annak a három peptidnek, amelyek módosítják a humán $K_v1.5$ -ön átfolyó ionáramot. Azonban a másik két peptid esetében a $K_v1.5$ gátlása csupán, mint „mellékhatás” jelenik meg az irodalomban. Így az *Osu1* az első olyan peptid, mely hatását célzottan vizsgáljuk a $K_v1.5$ -ön és így vezető vegyületként szolgálhat a pitvarfibrilláció terápiájához szükséges gyógyszerfejlesztés számára.

TÖBBSZÖRÖS CÉLZÁSSAL ELLÁTOTT NANORÉSZECSKÉK VIZSGÁLATA VÉR-AGY GÁT
MODELLEN ÉS HUMÁN KÖZÉPAGYI ORGANOIDOKONPorkoláb Gergő^{1,2}Mészáros Mária¹, Szecskó Anikó¹, Kondor Nóra¹, Ferenc Györgyi³, Kóta Zoltán¹, Páli Tibor¹,
Vigh Judit¹, Walter Fruzsina¹, Silvia Bolognin⁴, Jens C. Schwamborn⁴, Jeng-Shiung Jan⁵, Deli
Mária¹, Veszélka Szilvia¹¹ Biofizikai Intézet, ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, H-6726 Szeged, Temesvári krt. 62.² Biológia Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem, H-6720 Szeged, Dugonics tér 13.³ Növénybiológiai Intézet, ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, H-6726 Szeged, Temesvári
krt. 62.⁴ Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, Belvaux, Luxembourg⁵ Department of Chemical Engineering, National Cheng Kung University, Tainan 70101, Tajvan

A vér-agy gát fiziológias szállítófehérjéit célzó nanorészecskék ígéretes gyógyszerhordozók lehetnek biofarmakonok agyi bejuttatása céljából. A solute carrier (SLC) család egyes szállítófehérjéi ugyanis nagymértékben fejeződnek ki és specifikus mintázatot mutatnak a vér-agy gátat felépítő agyi endotélsejtekben. Kísérleteink során ezért olyan vezikuláris nanorészecskéket készítettünk és vizsgáltunk, melyeket három, az agyi endotélsejtek szállítófehérjéit célzó molekula – aszkorbinsav, glutation és leucin – kombinációjával láttunk el. Kimutattuk, hogy a nanorészecskék többszörös célzása fokozza a részecskékbe töltött fluoreszcens albumin primer patkány agyi endotélsejtekbe történő felvételét és vér-agy gát modellen való átjutását. Konfokális mikroszkópia segítségével igazoltuk, hogy a részecskék töltete a vér-agy gát modellen átjutva képes bejutni egészséges személyekből és Parkinson-kóros betegekből differenciáltott humán középagyú organoidokba is. Hőmérséklet-változtatás, valamint endocitózis- és metabolikus gátlószerek alkalmazásával megállapítottuk, hogy a nanorészecskék sejtfelvétele aktív folyamat, mely részben endocitózis, részben membrán fúzió révén jön létre. Végül az agyi endotélsejtek negatív sejt felszíni töltésének szerepét a nanorészecskék sejt felvételében a glikokalix enzimikus emésztésével és egy kationos lipid használatával bizonyítottuk.

Eredményeink igazolják, hogy az agyi endotélsejtek szállítófehérjéinek többszörös célzása fokozhatja hatóanyagok vér-agy gáton való átjutását és alkalmasnak bizonyulhat a központi idegrendszer célzó gyógyszerbeviteli rendszerek kifejlesztése során.

A DISZREGULÁLT IMMUNVÁLASZ HÁTTERÉBEN ÁLLÓ GÉNEXPRESSZIÓ VÁLTOZÁSOK
VIZSGÁLATA

Elek Zsuzsanna¹, Losoncz Eszter^{1, 2}, Keszler Gergely¹, Rónai Zsolt¹

¹Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Molekuláris Biológiai Tanszék, 1094 Budapest, Tűzoltó u. 37-47.

²Bács-Kiskun Megyei Oktatókórház, 6300 Kecskemét, Nyíri út 38.

Klinikai tapasztalatok alapján súlyos fertőzés esetén a betegek kb. felében diszregulált immunválasz (szepszis) jön létre, ami az esetek mintegy 50%-ában az intenzív kezelés ellenére is halálhoz vezető sokszervi károsodáshoz vezet. Munkánk célja olyan célgének és molekuláris folyamatok transzkriptomikai szintű azonosítása, amelyek hozzájárulhatnak a diszregulált immunválasz létrejöttéhez, s így a jövőben beépíthetők a diagnózis vagy akár a kezelés eszköztárába.

A génexpresszió szintű vizsgálat során három betegcsoportot elemeztünk: (1) fertőzött, de nem szeptikus; (2) szeptikus; (3) a szeptikus csoport gyógyult betegei. A kutatást az ETT-TuKeB és az OTFFHÁ (20572-5/2019/EÜIG) engedélyezte. A vérmintákat a Bács-Kiskun Megyei Oktatókórházban gyűjtöttük. A génexpresszió-elemzés a QuantStudio 12K Flex OpenArray Human Signal Transduction Panel segítségével történt 573 célgén és 24 belső kontrollgén egyidejű elemzésével.

Eredményeink alapján szepszisben a fertőzött mintákhoz viszonyítva 143 gén expressziója változott szignifikánsan. A változások döntő része immunszuppresszióra utal, ami az adaptív immunválasz anergiájának feleltethető meg (anti-inflammatorikus citokinek és proapoptotikus gének fokozott átírása, a T- és B-sejt-receptorokról induló aktivációs és túlélési jelpályák, valamint a limfociták klonális expanziójának gátlása). Az eltérések kisebb hányada a primer immunválasz erős gyulladáshoz kapcsolódó aktivációjára utal (proinflammatorikus citokinek, neutrofil és makrofág aktivációs markerek). Szepszisben tehát a primer immunválasz még a fertőzött/gyulladáshoz kapcsolódó állapotnál is aktívabb, azonban az adaptív immunválasz a kimerülés kifejezett jeleit mutatja, ami jól megfeleltethető a betegség klinikai lefolyásának. A gyógyult betegekben a szepsziszre jellemző eltérések döntő része normalizálódott.

A diszregulált immunválasz molekuláris mechanizmusának részletesebb feltárását nagyobb minta transzkriptomszintű elemzése (RNS-szekvenálás) segítheti, amit a miRNS-ek egyidejű elemzése, azaz a poszttranszkripció szabályozás vizsgálata tovább pontosíthat.

A kutatást az NKFIH K131680 pályázat támogatta.

EGY KISMOLSÚLYÚ HŐSOKKFEHÉRJE METABOLIKUS SZINDRÓMA TÜNETEIRE
GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TRANZSGENIKUS EGÉRMODELLBEN

Ruppert Zsófia¹, Rákóczi Bettina¹, Dukay Brigitta¹, Hajdu Petra¹, Sárközy Márta², Szűcs Gergő², Csont Tamás², Török Zsolt¹, Sántha Miklós¹, Tóth Melinda¹

1 ELKH, Szegedi Biológia Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Szeged

2 Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézet, Szeged

Az elhízás és a metabolikus szindróma világszerte egyre nagyobb problémát jelent. Ismert, hogy a túlsúllyal együttjáró patológiás folyamatok hatására megváltozhat a hősokkfehérjék (HSPs) expressziós szintje. Mivel a HSP-k fő funkciója a sejtek fehérje homeosztázisának fenntartása, fontos terápiás célpontok lehetnek különböző betegségekben. Ezért kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a HSPB1 túltermelése milyen hatással van a metabolikus szindróma tüneteire.

Betegségmodellként egy zsírdús táppal etetett APOB-100-túltermelő egértörzset (APOB/HFD) használtunk, melyet kereszteztünk egy HSPB1-túltermelő vonallal (APOB/HSP/HFD). 10 hónapos állatok májából készült metszeteken a lipidcseppek számát és méretét hematoxilin-eozin festést követően ImageJ szoftverrel határoztuk meg. A különböző citokinek, receptorok, transzport fehérjék, valamint stresszfaktorok expressziós szintjét qPCR segítségével vizsgáltuk. Az állatok testtömege jelentősen megnőtt mind a hím, mind a nőstény APOB állatokban zsírdús diéta hatására, a HSPB1 túltermelése a nőstények esetében pedig további szignifikáns testtömeg növekedést eredményezett. Ezzel szemben a máj tömege kizárólag a hím APOB/HFD állatokban emelkedett, mellyel párhuzamosan a lipidcseppek száma és mérete is szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontrollokhoz képest. Ezzel összefüggésben jelentős nemi különbséget találtunk több, a májszövet elzsírosodásához kapcsolható gén expressziós szintjében, mint amilyen a lipoprotein lipáz vagy a leptin receptor. Ezen kívül megfigyeltük, hogy nőstény APOB/HFD állatokban a HSPB1 túltermelése csökkentette a lipoprotein lipáz és bizonyos citokinek expresszióját.

Eredményeink szerint a HSPB1 túltermelés hatására megváltozik a zsírdús diétán tartott állatok testtömegnövekedésének mértéke és egyes gének expressziós szintje a májban, melyből arra következtethetünk, hogy a HSPB1 befolyásolhatja a metabolikus szindróma tüneteit, azonban hatásait nemtől függő módon fejti ki. Munkánk az NKFIH (OTKA FK138390) támogatásával készült.

A CITOPLAZMATIKUS VAS-POOL SZEREPE A MEZOFILLUM-SEJTEK VAS-HOMEOSZTÁZISÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Sági-Kazár Máté¹
Solti Ádám¹

¹ Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Növényélettani és Molekuláris Növényélettani Tanszék, Budapest 1117 Pázmány Péter sétány 1/C

A számos esszenciális mikroelem közül a vas kiemelkedően fontos szerepet tölt be, mint redox-folyamatokkal járó, katalitikus, illetve ROS-elimináló enzimek kofaktora. Kiemelkedő szerepe van a fotoszintetikus és légzési elektrontranszport-láncok felépítésében.

A gyökér vasszabályozási rendszer és a hosszútávú vastranszport szabályozásának esszenciális szerepe van a levelek vas-homeosztázisának megőrzésében, amelyben a mezofillum-sejtek vas-érzékelése és az ebből kiinduló hosszú távú szignalizációs rendszer lehet a felelős. A sejten belüli vasmozgatás a citoplazma és organellek között közvetlen módon szabályozható, hogy kialakul-e vashiány/ többlet jelző szignál. A vas sejten belüli gyors remobilizációjáért elsősorban a vakuólum, kisebb részt a mitokondriumok és a kloroplasztiszok lehetnek felelősek.

Arabidopsis thaliana modellen vizsgáltuk levélsejtek vasháztartásának változását különböző vasellátás mellett. Izolált protoplasztok és organellek spektrofotometrián meghatározott vastartalom változása, illetve organellek vastranszporterek qPCR-rel meghatározott expressziós mintázata alapján következtettünk a sejten belüli vas mozgására. A hosszútávú vas-szignalizációt az OPT3 és YSL1/3 floém-lokalizált vastranszporterek expressziós mintázatával modelleztük. Az OPT3 a vasszabályozási rendszert serkenti, expressziója vashiány hatására megemelkedik, míg az ellentétes működésű YSL1/3 expressziója lecsökken. Jelenlegi eredményeink alapján a vashiány elsősorban a kloroplasztiszok vasháztartását zavarja meg, míg többletnek nincs jelentős hatása sem a kloroplasztiszokra, sem a mitokondriumokra. A levélsejtek és vakuólumok vastartalma ezzel szemben a vasellátásnak megfelelően változik, amit a vakuoláris vastranszporter fehérjék expressziója is követ. Az egyes sejtkompartmentek vastartalom változása alapján, a citoplazmatikus vas-pool elsősorban vashiány hatására változik, míg a többletet a vakuólum kiegyenlíti. Feltételezéseink szerint a citoplazmatikus vas-pool csökkenése indukálja a hosszútávú vastranszport rendszerben a vas újra eloszlását, az OPT3-YSL1/3 rendszeren keresztül, ami a gyökérben a vastartalom lecsökkenéséhez, és a vasszabályozási rendszer serkentéséhez vezet.

ROS	reaktív oxigén formák
qPCR	kvantitatív realtime-PCR
OPT3	Oligopeptid Transporter 3
YSL1/3	Yellow Stripe-like 1/3

SPECIFIKUS HSP70-LIPID KÖLCSÖNHATÁSOK FELDERÍTÉSE

Sándor, N., Kiss, B., Tapodi, A., Rauch, T., Juhász, K., Balogi, Z.

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

Korábban kimutatták, hogy a hőszokkfehérjék családjába tartozó Hsp70-nek fontos fiziológiai és patofiziológiai funkciói vannak. Amikor a sejtet stressz éri megváltozik a membrán fluiditása és ez egy jelzés a hőszokkfehérjék termelésére, amik így a sejtmembránokban található lipidekkel kölcsönhatásba lépnek. A Hsp70 különféle funkciókkal bír aszerint, hogy mely lipidekkel hat kölcsön. Tanulmányunk célja, hogy a Hsp70 kölcsönhatását vizsgáljuk eddig nem próbált lipidekkel és a lipidkötődés jelentőségét illetve mechanizmusát megértsük. Ennek érdekében *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a tisztított rekombináns Hsp70 kölcsönhatását lipid „monolayer”-ekkel és liposzómás lipid kettős rétegekkel. „Monolayer” technikával vizsgálva a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PI4,5P) kimagasló kölcsönhatást mutatott. A liposzómás rendszereket membránalkotó és speciális lipidek keverékeként állítottuk elő. A foszfatidil-kolin (PC) és foszfatidil-szerin (PS) az irodalmi eredmények szerint nem illetve teljes mértékben kötötte meg a Hsp70-et. Foszfatidil-etanolamin (PE) jelenléte kevésbé, koleszterol (Chol) és szfingomielin (SM) egyáltalán nem növelte a kölcsönhatás mértékét a PC-hez képest. PS hozzáadásával erős, míg a sejtfelszín sérülésekor megjelenő ceramid (Cer) jelenlétében gyenge kötődés figyeltünk meg. A liposzómás rendszerekhez adott PI4,5P ezidáig nem erősítette a kölcsönhatást, amely ellentmondás feloldása további kísérleteket kíván. Ugyanakkor meglepő módon, a közvetlen funkciójáról nem ismert endokannabinoid prekursor lipid, *N*-acil-foszfatidil-etanolamin (NAPE) a Hsp70 drasztikus membránkötődését eredményezte a nem kölcsönható PC/Chol/SM mátrixba ágyazva. A Hsp70-nel új kölcsönható lipid partnernek mutatkozik tehát a PI4,5P és a NAPE, de további vizsgálatok, szükségesek mielőtt funkcionális szerepüket tesztelnénk. Eddig nem ismert specifikus Hsp70-lipid kölcsönhatások kimutatása értékes lehetőségeket jelenthet a Hsp70 lipidfüggő sajátosságainak felfedezésében.

Rövidítések:

Hsp70	hőszokkfehérje 70	PC	foszfatidilkolin
PS	foszfatidilszerin	PI4,5P	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
Chol	koleszterol	PE	foszfatidil-etanolamin

KOHERENS KONTROLL CALMODULINBAN

Schay Gusztáv¹ Michael Klopf² Onica Klaudia³ Balog Erika¹ Liliom Károly¹

¹ Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

² Helmholtz Zentrum Dresden Rossendorf, Deutschland.

³ Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Budapest

A Calmodulin működésében alapvető fontosságú kérdés hogy a kalcium ion kötése során mi alapján választja ki a fehérje a nagy számú lehetséges partner közül a megfelelőt. Ebben minden valószínűség szerint a fehérje mozgási mintázatai játszanak meghatározó szerepet, azaz a kalcium kötés vélhetően olyan mozgási mintázatok kialakulását segíti elő, melyek azután az energia-felszínen a megfelelő konformáció kialakulásához szükséges szerkezethez közeli állapotba mintegy fókuszálják a molekula-populációt. Amennyiben ez létező mechanizmus, akkor megfelelő rezonáns pumpálással a konformációs eloszlás megváltoztatható. Ezt vizsgáltuk meg THz frekvenciájú pumpálással, optikai próba kísérletekben, és kimutattuk hogy 30 THz pumpáló frekvencia valamint 2.5W/mm^2 intenzitás mellett tranziens koherens oszcilláció alakul ki, melynek amplitúdója és frekvenciája a pumpáló jel frekvenciájától és teljesítménysűrűségétől függ.

EFFECT OF ERBB2 MISSENSE MUTATIONS ON DIMER FORMATION

Serrano-Cano, T. Gabriela¹
Nagy Péter¹,

1 Debreceni Egyetem, Biophysics and Cell Biology department

ErbB2 is a member of the epidermal growth factor receptor family and the single member without a ligand-binding domain. Instead, its activation is triggered by heterodimerization with ligand activated ErbB1(EGFR) or by homodimerization at high membrane concentration. Overexpression of ErbB2 is caused by *ErbB2* gene amplification causing the ErbB2 signaling network to be constitutive active. *ErbB2* gene amplification has been linked to a more aggressive cancer development. In the past decade, several single nucleotide alterations have been reported within the different regions of *ErbB2* gene. The R143Q and V842I missense mutations are two recurrent ErbB2 mutations and present in sperm cells in a higher frequency than expected for *de novo* germline mutations. However, the effect of each mutation on cell signaling or its potentially activating functional significance has not been elucidated. To achieve this aim CHO cells were transfected with ErbB2 WT, V842I and R143Q variants and co-transfected with EGFR for measurement of ErbB2 homodimerization and its heterodimerization with EGFR using FRET analysis. In co-transfected cells, the ErbB2 missense mutations showed no significant increase in heterodimer formations compared to ErbB2 WT even in the presence of EGF stimulation. Interestingly, ErbB2 V842I variant showed a higher homodimer formation than ErbB2 WT which could be related to a higher cell signaling activity. In conclusion, the R143Q and V842I variants do not influence the formation of EGFR-ErbB2 heterodimers even under stimulating condition. Additionally, this lack of significant increase in heterodimerization seen with V842I could be related to its higher propensity for homodimer formation.

Rövidítések:

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, CHO: Chinese Hamster Ovary, FRET: Förster resonance energy transfer, EGF: Epidermal Growth Factor

MOLEKULÁRIS ZSÚFOLTSÁG, KATIONOK, LIGANDUMOK ÉS HYDROSZTATIKA NYOMÁS
HATÁSA G-QUADRUPLEXEK SZERKEZETÉRE

Somkuti Judit¹, Molnár Orsolya Réka¹, Végh András^{1,2}, Grád Anna¹, Adányi Mónika¹, Smeller László¹

¹Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

²Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinika

A nukleinsavakban a jól ismert kettős szálú szerkezet mellett ún. nem-kanonikus struktúrák is előfordulnak. Ezek közül a legjelentősebb a G-quadruplexnek (GQ) nevezett négy-szálú szerkezet, amelyet a guaninban gazdag szekvenciák képesek kialakítani. Négy guanin szerveződik egy síkba, így alkotva egy G-quartetet, amelyet Hoogsteen típusú hidrogénhidak stabilizálnak. Tipikusan két vagy három ilyen egymás fölött elhelyezkedő quartet alkot egy G-quadruplexet. Fontos szerepe van az egyértékű kationoknak, amelyek stabilizálják ezt a szerkezetet. A G-Qek jelentőségét mutatja, hogy a telomér régióban, ill. számos onkogén promóterében is megtalálták őket.

Méréseinkben számos GQ formáló szekvenciát tanulmányoztunk, Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiával, ill. fluoreszcencia energia transzfer módszerrel.

A humán telomér (HTEL) szekvencia által formált GQ térfogati paramétereit vizsgálva megállapítottuk, hogy a molekuláris zsúfoltság (amit itt a nukleinsav saját maga okozott) a kitekeredési térfogatot jelentősen megváltoztatja, annak előjelét is átfordítva. ($\Delta V = -19$ ml/mol $\rightarrow +7$ ml/mol-ra változik a 0,08-75 mg/ml tartományban). [1]

A hepatitis B vírus genomjában található három potenciálisan GQ formáló szekvenciáról bizonyítottuk be, hogy ténylegesen GQt alkot. Megállapítottuk, hogy a TMPyP4 (amely egy kationos porfirinszármazék, melyet humán GQk stabilizálására fejlesztettek) stabilizálja mindegyik quadruplexet, ill. meghatároztuk ezen GQk termodinamikai, stabilitási és térfogati paramétereit. [2] Az említett három szekvencia közül részletesebben vizsgáltuk a HepB1-nek nevezett GGCTGGGGCTTGTCATGGGCCATCAG szekvenciát. Megállapítottuk, hogy ezt GQta Na⁺ ion erősebben stabilizálja, mint a K⁺, ami ellentétes az eddigi irodalmi trenddel. Három GQ stabilizáló ligandumot vizsgáltunk (TMPyP4, PhenCD3, BRACO19), melyek közül a TMPyP4 és a PhenCD3 több mint 20 °C-al növelte a kitekeredési hőmérsékletet, míg a BRACO19 stabilizáló hatása ennél gyengébb (mintegy 5 °C-os volt). [3]

Eredményeink felvetik a humán rákterápiára fejlesztett GQ-specifikus ligandumok esetleges alkalmazásának lehetőségét a vírusok esetében.

[1] J. Somkuti, M. Adányi, L. Smeller, *Biophysical Chemistry* 254 (2019) 106248

[2] Somkuti, J.; Molnár, O.R. Grád, A.; Smeller, L., *Biology* 10 (2021) 10, 1173.

[3] Orsolya Réka Molnár, András Végh, Judit Somkuti, László Smeller, *Scientific Reports* 11 (2021) 23243 DOI:10.1038/s41598-021-02689-y

A KÉREGÁLLOMÁNY SEJTES ÉS MOLEKULÁRIS ÖSSZETÉTELE
A BURSA FABRICII LIMFOID FOLLIKULUSAIBAN

Soós Ádám¹

Szőcs Emőke¹, Fejszák Nóra¹, Jancsovcics Dalma¹, Halasy Viktória¹, Nagy Nándor¹

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

A bursa Fabricii a madarak primer nyirokszerve, amelynek szerkezeti és működési alapegységeiben, a limfoid follikulusokban zajlik a B-sejtek proliferációja és differenciálódása. A follikulusok két, szövettanilag és fejlődésstanilag jól elkülönült kompartmentből, az ektodermális eredetű velőállományból és a mezodermális eredetű kéregállományból állnak. Annak ellenére, hogy a B-sejtek éréshez szükséges follikuláris velőállomány szövettana részletesen karakterizált, az ontogenetikailag később megjelenő kortikális régió szöveti és molekuláris összetétele nem ismert. Kutatásunk során a bursa Fabricii follikulusok kéregállományának sejtszintű és molekuláris elemzését végeztük el.

Az IgM⁺ molekulákat kifejező medulláris B-sejtekkel ellentétben a kéreg B-sejtjei CXCR4 pozitívak, és IgM-et alacsonyán expresszálnak. A follikuláris kéregállományban dendritikus sejt nem található, viszont CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ makrofágok egyenletesen előfordulnak. Az ECM részletes karakterizálása során azt találtuk, hogy míg a mátrix fehérjék többsége korai embrionális bursában is kifejeződik, addig a tenascin-C expressziója először csak a kikelés táján, a 16-18 napos embrió follikuluskezdeményei körül figyelhető meg. A kikelést követően a kéregállományra specifikus tenascin-C, jellegzetes eloszlást mutatva a kapillárisok körül koncentrálnak. A tenascin-C funkciójának *in vitro* vizsgálata igazolta, hogy a B-sejtek migrációjára gátló környezetet képvisel. *In vivo* RCAS-Shh retrovírus vektor által előidézett tenascin-C túlexpresszállatás is gátolja a fejlődő follikulusok B-sejtes kolonizációját.

Eredményeinket összefoglalva kijelenthetjük hogy 1.) a kéregállomány fejlődése a kikelés előtt 5 nappal megkezdődik. 2) a kéregállomány B-sejt populációja Bu-1⁺/CXCR4⁺/IgM^{low}⁺ expressziós mintázatot mutat és CSF1R⁺ dendritikus sejteket nem tartalmaz, viszont rendelkezik egy CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ makrofág populációval. 3) a kéregállomány vázrendszerét mezenchimális retikulum sejtek képezik, amelyek tenascin-C-ben gazdag extracelluláris mátrixot termelnek. 4) *In vivo* és *in vitro* kísérletek szerint a tenascin-C gátló környezetet jelent a vándorló B-sejtek számára.

ECM – Extracelluláris mátrix

AZ ENDOTÉLSEJTEK JELENTŐSÉGE A TUMOROKBAN: SEJTFELSZÍNI MARKEREK
AZONOSÍTÁSA ÉS CÉLOZHATÓSÁGA

Surguta Sára Eszter^{1,2}

Cserepes Mihály^{1,2}, Kigyós Attila², Várady György³, Doleschall Zoltán¹, Hidvégi Anita¹, Léner Violetta², Tóvári József^{1,2}

1 Országos Onkológiai Intézet, Budapest

2 KINETO Lab Kft., Budapest

3 Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest

A malignus megbetegedések világszerte a vezető halálozási okok közé tartoznak. A szolid tumorok összetett szerkezetűek, mégis, a terápiás erőfeszítések többnyire kizárólag a tumorsejtek közvetlen célzására korlátozódnak. Ugyanakkor a tumor felépítésében számos más sejttípus és sejtközötti állomány is részt vesz. Kiemelkedő fontosságú a tumor vérellátását biztosító erek szerepe a daganatok fejlődésében. A tumorokban található erek (tumor endothelial cells: TEC) funkciójukat és eredetüket tekintve hasonlóak a többi szövet ereihez, azonban mind morfológiájuk, mind molekuláris sajátágaik különböznek a fiziológiás endotéliumtól.

Kutatásunk középpontjában az általános és szövetspecifikus TEC-markerek azonosítása, és a tumor-endotéliumot - egyben a szolid tumorokat – célzó új terápiás lehetőségének feltárása áll.

A különböző szövetekben kifejlődő áttétek intratumorális endotélsejt génexpressziójának vizsgálatára B16 egér melanoma, C26 colon carcinoma és 3LL-HH tüdő tumorsejtvonalakat vontunk be. Primer lépdaganatot és májkolóniákat lépbe oltással, tüdőkolóniákat farok intravénásvéna oltással hoztuk létre. Az implantált tumorok eredését követően a kolóniák makroszkópos megjelenését megvárva tumorszövet izoláltunk és egysejt-szuspenziót készítettünk. Immunhisztokémiai jelöléssel a kontroll és tumoros CD31+ endotélsejteket áramlási citometriás sejtiszortolás segítségével izoláltuk. A különböző endotélminták RNS-tartalmának szekvenálását és microarray vizsgálatát végeztük.

Mind a három vizsgált tumorsejtvonal esetén sikeresen kialakítottunk tüdő és lép-máj kolonizációs modellt. A kapott szekvenálási és array vizsgálati adatokból összehasonlító elemzésre nyílik lehetőségünk, amelynek során egy adott lokalizációról izolált tumor endotélsejt génexpresszióját tudjuk összevetni az adott lokalizáció kontroll ép szövet ereivel. Ezeket a különbségeket használva újfajta támadáspontokat találhatunk daganatellenes hatóanyagok fejlesztésére, vagy azok célba juttatására.

Támogatók: A munkát a Tématerületi Kiválósági Program (TKP2021-EGA-41), valamint a Nemzeti Laboratóriumok Program - Nemzeti Tumorbiológiai Laboratórium (NLP-17) pályázatok támogatásával végezzük. Surguta S. E. az ITM-NKFIA finanszírozású Kooperatív Doktor Program (1018567) támogatottja.

Rövidítések: TEC - Tumor Endothelial Cells

DROSOPHILA VÉRSEJTEK PLASZTICITÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA PRIMER
VÉRSEJTKULTÚRÁK SEGÍTSÉGÉVEL

Sutus Enikő¹

Gábor Erika¹, Bayan Kharrat^{1,4}, Jankovics Ferenc², Sinka Rita³, Honti Viktor¹

1, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, *Drosophila* Vérsejt Differenciálódás Csoport, Szeged

2, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, *Drosophila* Ivárasejt Fejlődési Csoport, Szeged

3, Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék, Szeged

4, Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola

A *Drosophila melanogaster* széles körben alkalmazott modellszervezet az immunrendszer és a vérsejtekhez kapcsolódó tumorképződés tanulmányozására. Immunsejtjei, a hemociták, funkciójukban nagy hasonlóságot mutatnak az emlősök mieloid sejtjeihez. A naiv lárva keringésében két vérsejttípus található, a plazmatocita és a kristálysejt. Immunindukciót követően és tumoros állatokban egy harmadik vérsejttípus, a lamellocita differenciálódik. Újabb kutatások rávilágítottak, hogy a korábban terminálisan differenciálódott sejteknek gondolt plazmatociták képesek eredeti funkciójukat megváltoztatva lamellocitákká átalakulni, vagyis transzdifferenciálódni.

A hemociták tanulmányozása számos nehézséggel jár, úgy mint a vérsejtek steril körülmények között történő izolálása és hosszabttávú fenntartása, *in vivo* monitorozás esetén a lárva és a vérsejtek mozgásának követése. Mivel a rendelkezésre álló módszerekkel a vérsejtek korlátozott ideig vizsgálhatók, létrehoztunk egy *ex vivo* sejtenyésztési módszert a plazmatocita-lamellocita átalakulás lépéseinek, illetve a folyamat szabályozásának jobb megértése érdekében.

Tapasztalataink alapján a hemociták kultúrában fenntarthatók, a plazmatociták megőrzik osztódási és transzdifferenciálódási képességüket. Kultúráinkban mindkét korábban leírt lamellocita típus – az I-es és II-es típusú lamellocita – is megfigyelhető. A különböző vérsejt típusok plaszticitásának vizsgálatára kidolgoztunk egy blaszticidin rezisztencián alapuló szelekciós rendszert is. Reményeink szerint kutatási eredményeink hozzájárulnak a vérsejtek plaszticitásának, a transzdifferenciáció folyamatának és szabályozásának pontosabb megértéséhez.

Kutatásainkat az OTKA K-131484 (VH) és a RRF-2.3.1-21-2022-00005 pályázatok támogatásával valósítjuk meg.

METILÉNKÉK HATÁSA A RÁGCSÁLÓKBÓL IZOLÁLT AGYI MITOKONDRIMUMOKRA
KOMPLEX III GÁTLÁS ESETÉNSváb Gergely¹Kokas Márton¹, Sipos Ildikó², Ambrus Attila¹, Tretter László¹

1 Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Budapest

2 Semmelweis Egyetem, Neurológiai Klinika, Budapest

A metilénké (MK) alapvázát, a fenotiazin vázat elsőként 1883-ban szintetizálták. A 19. század végétől napjainkig betegségek széles spektrumán alkalmazzák, 1891-ben a maláriában, az 1890-es években pszichiátriai betegekben alkalmazták. Az 1900-as évek elején felfedezték antimikrobiális hatását, később toxikus állapotok kezelésében (methemoglobinémia, cianmérgezés, ifoszfamid enkefalopátia, septicus sokk) is fontos szerepet kapott. A MK mitokondriális hatásai közé tartozik az „alternatív elektrontranszport”, ami alatt azt értjük, hogy az elektronok mitokondriális ETC komplexei helyett, egy alternatív útvonalon haladnak végig, áthidalva ezzel a mitokondriális ETC két komplexét. Így a MK alkalmazásának nagy jelentősége van a komplexek károsodása esetén.

Munkánk során egér, patkány és tengerimalac agykéregből izoláltunk mitokondriumokat. A mitokondriális oxigénfogyasztást Clark-típusú polarográfiás elektróddal, a membránpotenciált safranin fluoreszcenciával, míg a NADH/NAD⁺ arányt a NADH autofluoreszcenciával mértük.

MK hatásra a CI szubsztráttal energetizált, CIII gátolt mitokondriumokon fokozódott az oxigénfogyasztás, hiperpolarizálódott a membrán, csökkent a NADH fluoreszcencia. ADP hatásra csökkent az oxigénfogyasztás, depolarizálódott a membrán és emelkedett a NADH/NAD⁺ arány. Ezt követően ANT gátló hozzáadásra fokozódott az oxigénfogyasztás, hiperpolarizálódott a membrán és csökkent a NADH/NAD⁺ arány. Ennek a szokatlan jelenségnek a magyarázata a MK elhelyezkedésében és töltésváltozásában keresendő. A MK pozitív töltése révén felvételre kerül a mitokondriumokba, ahol redukálódik, majd a citokróm c-t redukálva újra oxidált állapotba kerül, így ismét képes részt venni a NADH-ról történő elektrontranszportban, ezzel áthidalva a CI és a CIII gátlást.

Eredményeink bizonyítják, hogy a MK a membrán polarizáltságának függvényében képes áthidalni a CI és a CIII gátlást, ezzel elősegítve a NADH oxidációját és fokozva a citrát-kör működését, így javítva a mitokondrium bioenergetikai paramétereit.

ANT: adenin-nukleotid-transzlokáz; CI: komplex I; CIII: komplex III; ETC: elektrontranszport lánc; MK: metilénké

A SEJTMEMBRÁN HATÁSA A LOKÁLIS LIGANDUM KONCENTRÁCIÓRA

Szabó Ágnes¹ Szöllősi János^{1,2}, Nagy Péter²

¹MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debreceni Egyetem
²Debreceni Egyetem ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Bevezetés: A plazmamembrán kulcsfontosságú szerepet tölt be jelátviteli folyamatokban, mivel a hírvivők és a gyógyszermolekulák vagy kötődnek a membránhoz, vagy áthaladnak rajta. Bár a ligandum kötődése triviális egyensúlyi folyamat, a jelenséget jelentősen módosíthatja a ligandumok dinamikus asszociációja és disszociációja, ill. különböző membránjelenségek. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással van a membrán közelsége a ligandum lokális koncentrációjára.

Módszerek: A méréseket eGFP-ErbB1 receptorokat stabilan kifejező CHO sejteken (F1-4 sejtvonal) vagy ezek eCFP-ErbB2 plazmiddal transzfektált változatával végeztük, vagy ezen sejtekből készített vezikulumokkal (GPMV). Az ErbB1 fluoreszcensen jelölt ligandumával (TAMRA-EGF) inkubáltuk a sejteket / vezikulumokat, majd FCS-sel meghatároztuk a koncentrációját és a diffúziós állandóját a sejtmembrántól való távolság függvényében.
Eredmények: A csak ErbB1-et kifejező F1-4 sejtvonal esetében a sejtmembrán ~5 µm-es környezetében ~3-szor nagyobb volt az EGF koncentráció, mint a szabad oldatban. Az ErbB2-t expresszáló sejtekben a TAMRA-EGF lokális koncentrációja a sejtmembrán felett 10-20 µm-rel maximumot mutatott. Az EGF koncentrációs maximum egybe esett az EGF diffúziós állandójának minimumával. Ezzel szemben a sejtekből készített vezikulumok esetén nem tapasztaltuk ezen csúcsok jelenlétét. Az ErbB2-vel nem transzfektált F1-4 sejtek esetében a membrán lokális EGF koncentrációra kifejtett hatását a sejtek fixálása megszüntette, a Latrunculin-B kezelés viszont hatástalan volt. Az ErbB2-vel transzfektált sejtek esetében azonban mind a Latrunculin-B jelenléte, mind a fixálás csökkentette a membránhatás mértékét.

Konklúzió: Bár a kísérletek értelmezése és kvantitatív modellezése még folyamatban van, az eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a sejtmembrán jelentősen módosítja a ligandumok membránban expresszált receptorok környezetében mérhető koncentrációját.

Rövidítések:

EGF: epidermális növekedési faktor

ErbB1: epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)

FCS: fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia

F1-4: ErbB1-eGFP-vel stabilan transzfektált CHO sejtvonal

GPMV: giant plasma membrane vesicle

A SZINDEKÁN-4 ÖSSZETETT SZEREPE A VÁZIZOMZATBAN: MIOGENEZIS ÉS
ONKOGENEZIS

Szabó Kitti¹

Varga Dániel², Végh Attila Gergely³, Liu Ning⁴, Xiao Xue⁵, Xu Lin⁵, Dux László¹,
Erdélyi Miklós², Rovó László⁶, Keller-Pintér Anikó¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézet, Szeged

²Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Optika és Kvantumelektronika Tanszék, Szeged

³Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Biológiai Kutatóközpont, Biofizika Intézet, Szeged

⁴Texasi Egyetem Délnyugati Orvosi Központja, Molekuláris Biológia Tanszék, Dallas, Texas, USA

⁵Texasi Egyetem Délnyugati Orvosi Központja, Kvantitatív Biomedikai Kutatóközpont, Népeség- és Adattudományi Tanszék Dallas, Texas, USA

⁶Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Tanszék, Szeged

A vázizomzat nagyfokú regenerációs képességet mutat, amely molekuláris szinten megismétli az embrionális miogenezist. A rhabdomyosarkóma a leggyakoribb gyermekkori lágyrésztumor és az izomsejtek differenciálódásának károsodása jellemzi. A mioblaszt fúzióban kulcsszerepet játszik az aktin citoskeleton átépülését szabályozó Rac1 GTP-áz. A SDC4 (szindekán-4) proteoglikán szabályozza a Rac1-GTP szintjét, génkiűtött egerekben a vázizom morfológiája és regenerációja sérül, azonban nem tisztázott, hogy a SDC4 hiánya hogyan vezet az izomregeneráció zavarához. Célunk volt a SDC4 miogenezisben és onkogenezisben betöltött szerepének vizsgálata.

C2C12 egér mioblaszt sejtek SDC4 szintjét shRNS-sel csökkentettük. A Rac1 aktivitást NSC23766-tal gátoltuk, a fehérjék expresszióját Western blottal vizsgáltuk. A sejtek fúzióját jellemző fúziós (miotubulus sejt/összes sejt) és differenciációs (multinukleáris/összes sejtszám) indexet dezmin immuncitokémiát követően számoltuk. Atomerő mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek rugalmasság változásait, szuperrezolúciós dSTORM mikroszkópiával az aktin nanoszerkezetet. Humán rhabdomyosarkóma minták (n=199) SDC4 expresszióját nukleinsav szinten detektáltuk.

A SDC4 csendesítés szignifikánsan megemelte a fúziós- és differenciációs indexet. A foszfo-PAK1(Thr423) szintje szignifikánsan nőtt SDC4 csendesítés hatására, míg NSC23766 kezelést követően a SDC4 csendesített sejtekben megfigyelhető foszfo-PAK1(Thr423) és foszfo-kofilin(Ser3) emelkedés elmaradt. A SDC4 csendesített sejtek aktin citoskeletális architektúrában nanoszintű változásokat mutatottunk ki, atomerő mikroszkópia során pedig csökkent rugalmasságot tapasztaltunk (kontroll vs. shSDC4: $43,43 \pm 5,593$ vs. $164,0 \pm 36,50$ kPa). A PAX-FOXO1 génfúziót nem mutató, heterogén csoportot alkotó rhabdomyosarkómák 28%-ában SDC4 génamplifikáció figyelhető meg, melyet RNS szekvenálási adatok alapján megemelkedett SDC4 expresszió kísér.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a SDC4 expresszió csökkenése teret engedve a Rac1 aktivációjának szükséges az aktin átrendeződéshez, mioblasztok differenciációjához és fúziójához. A magas SDC4 expresszió hátráltatja a miogenezist és elősegíti az onkogenezist.

Rövidítések: Rac1 (Ras-hoz kapcsolt C3 botulinum toxin 1-es szubsztrátja), PAK (p21 aktivált kináz)1, SDC4 (szindekán-4)

Támogatás: NKFI FK 134684, NKFI K 132446, TKP2021-EGA-28, Bolyi János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19/5), UNKP-21-5-SZTE-571.

A VS38C JELÖLÉS LIMITÁCIÓI A PLAZMASEJTES MIELÓMA
ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS DETEKTÁLÁSA SORÁN

Szalóki Gábor¹

Czeti Ágnes¹, Varga Gergely², Szita Virág Réka², Komlósi Zsolt István³, Takács Ferenc¹, Márk Ágnes¹, Timár Botond¹, Matolcsy András¹, Barna Gábor¹

1 Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató intézet, Budapest, 2 Semmelweis Egyetem, Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Budapest, 3 Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

A plazmasejtes mielóma a plazmasejtek rosszindulatú daganata. A páciens csontvelő aspirátumának áramlási citometriás vizsgálatának jelentős szerepe van a diagnózis felállításában és a beteg kezelésre adott válaszában értékelésében. Mivel a vizsgált sejtfelszíni markerek variábilisen expresszálódhatnak a kóros sejteken, mindemellett a kezelés hatására is megváltozhat kifejeződésük mértéke, folyamatos az igény újabb, állandó expressziójú markerekre.

A VS38c egy monoklonális ellenanyag, mely az ER-ben található CLIMP63 fehérjéhez kötődik. Ez a fehérje a hemopoetikus sejtek között egyedülállóan magas expressziót mutat a plazma- és mielóma sejtekben, így használható lehet azok azonosítására.

Bár immunhisztokémiai jelölések során a VS38c intenzíven jelölte a normál és kóros plazmasejteket, kíváncsiak voltunk, hogy ez hasonlóan történik-e áramlási citometriás jelölés során is. Ehhez 196 páciens csontvelőjében vizsgáltuk meg a plazmasejtek VS38c-vel történő jelölődését. Azt tapasztaltuk, hogy ha a sejteket erős detergenssel permeabilizáltuk, akkor minden plazmasejt intenzíven jelölődött, míg ha mérsékelt permeabilizáció történt, az esetek többségében megjelent egy VS38c-vel alig jelölődő plazmasejt alpopuláció. Ez felvetette azt a lehetőséget, hogy a plazmasejtek között jelen van egy detergens-ellenállóbb ER membránnal rendelkező alpopuláció. A plazmasejtek heterogenitását az is alátámasztja, hogy ezek a plazmasejtek kevésbé tolerálják a mechanikai megterhelést, ugyanis ha a jelölés előtt mosással eltávolítjuk a mintából az szolubilis immunglobulinokat, ezek a sejtek a centrifugálás során elvesznek. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a plazma- és mielóma sejtek ER membrán permeabilizálhatóság szempontjából heterogén populációt alkotnak, melynek lehet biológiai relevanciája is. Emellett kijelenthető, hogy áramlási citometriás mérés során fokozott figyelmet kell fordítani a megfelelő membrán permeabilizálásra, hogy elkerüljük a nem megfelelő permeabilizáció miatti hamis negatív VS38c jelölődést.

Rövidítések: ER: endoplazmatikus retikulum

HUMÁN ENDOMETRIOSIS ÉS MÉHŰRI ENDOMETRIUM MINTÁK *IN VITRO*
SZÖVETTENYÉSZTÉSE MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATOKRA

Szegeczki Vince¹

Kulcsár Máté¹, Fazekas László¹, Orlik Brigitta², Török Péter³, Jakab Attila³, Reglődi Dóra⁴,
Juhász Tamás¹

¹DE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Debrecen, ²DE KK Patológia Intézet, Debrecen,
³DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Debrecen, ⁴PTE Anatómiai Intézet, Pécs

A humán endometrium az élővilág méhlepényes egyedei között egyedülálló szövet, tekintve hogy az elevenszülők oestrus ciklusa helyett menstruációs ciklussal bír. A méhnyálkahártya komplex szövet, felépítésében számos sejtípus vesz részt, amelyek befolyásolják egymás működését. Endometriosisról beszélünk abban az esetben, ha a méh üregén kívül a női nemi ciklus hormonális változásaira reagáló endometrium található. Napjainkban az ectopiás szövet kialakulásában egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a különböző molekuláris folyamatoknak, amelyek eltérnek az eutopiás szövet fiziológias folyamataitól.

Mivel az endometriális sejtvonalak és az állatmodellek nem alkalmasak ezen egyedi szövet komplex folyamatainak tanulmányozására, célunk volt egy olyan *in vitro* szövettenyésztési módszer létrehozása, amely alkalmas a humán endometriális szövetek fenntartására, illetve ezt követően azok molekuláris módszerekkel történő vizsgálatára.

Kísérleteinkhez műtéti úton eltávolított endometriosis és endometrium mintákat használtunk. A műtét napján beérkező mintát három csoportra osztottuk: egy mintarészt egyből lefixáltunk („Friss”), egyet hormonokkal („E2+P4”) kezeltünk, egyet pedig hormonadagolás nélkül a kezelési idő végéig fenntartottunk („Kontroll”). Az E2+P4 csoportok esetén a női nemi ciklus hormonális változásait igyekeztünk imitálni. Az URM 1. ismeretében, a mintákat a ciklus 24. napjáig a mindenkori hormonkoncentrációknak megfelelően kezeltük. A tenyésztési periódust követően a mintákat HE festéssel vizsgáltuk, illetve immunhisztokémiával tanulmányoztuk a szövet sejtjeinek sejtfelszíni markereit.

Az ectopiás minták esetében a szövetek kivétel nélkül fenntarthatók a kezelési idő végéig, míg az eutopiás mintáknál csak a teljesen egészséges méhnyálkahártya tartható fenn. A szövettenyésztési módszer alkalmas a két endometriális szövet molekuláris folyamatainak összehasonlítására és tanulmányozására.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-3-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

E2: 17 β -estradiol (ösztadiol)

P4: progesterone (progeszteron)

URM 1.: az utolsó rendes menstruáció első napja

AZ IDŐSKORBAN ELKEZDETT RENDSZERES FIZIKAI AKTIVITÁS HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA AGING PATKÁNY MODELLEN REKREÁCIÓS ÉS ERŐLTETETT FUTÁS
SEGÍTSÉGÉVEL

Szekeres Réka

Priksz Dániel, Bombicz Mariann, Varga Balázs, Szilágyi Anna, Takács Barbara, Erdei Tamás,
Viczyán Gábor, Óvári Ignác, Gesztelyi Rudolf, Szilvássy Zoltán, Juhász Béla

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Bevezetés és célkitűzések: Egyre idősödő társadalmunkból kifolyólag fokozott az igény arra, hogy azonosítsuk és bővítsük azon lehetőségek tárházát, amelyek képesek mérsékelni az öregedéssel járó funkcióromlásokat.

Anyagok és módszerek: 18 hónapos Sprague Dawley patkányokat 3 csoportra osztottunk: (I) kontroll csoport: ők modellezték az idősödő, fizikailag inaktív populációt; (II) rekreációs csoport, ketrecükben beépített futókereket helyeztünk el, azt tetszés szerint használhatták 6 hónapon át; (III) erőltetett futó csoport, akik fél éven keresztül heti 6 napon, meghatározott sebességgel, adott ideig futottak. A kísérlet végpontjában echokardiográfiás, illetve elektroretinográfiás méréseket végeztünk ketamin-xylozin anesztézia alatt. Ezt követően 5 mg/ttkg i.p. isoproterenol adása után meghatároztuk a csoportok túlélési görbéit, végül az aorta endothel-függő vazorelaxációját ex vivo módszerrel vizsgáltuk.

Eredmények: Echokardiográfiás méréseink során az inaktív állatokhoz képest a rekreációs és az erőltetett futó csoportokban a systoles paraméterek szignifikáns javulását detektáltuk, ám a szöveti Doppler technikával meghatározható bal kamrai csúcs systoles sebesség csökkent az erőltetett testmozgást reprezentáló csoportban, a rekreációs állatokban mérthez viszonyítva. Elektroretinográfiás módszerrel megállapítottuk, hogy az „a” és a „b” hullámok amplitúdója fokozottabb mindkét aktív csoportban, és megjegyzendő, hogy az erőltetett mozgás során a legnagyobb mértékű. Az endothel-függő vazorelaxációt mindkét típusú testmozgás szignifikánsan fokozta, de különbséget nem láttunk a mozgásformák között. Az isoproterenolt a kontroll csoportba tartozó állatok közül 0, a rekreációs csoportból 1, az erőltetett futó állatok közül 2 élte túl, illetve a kísérlet teljes ideje alatt a sportoló állatok javuló túlélést mutattak. Következtetések: Eredményeink alapján az idősebb korban elkezdett mindennemű testmozgás kedvezően befolyásolja a retina funkcióját, a szívfunkciós paramétereket, valamint a túlélési görbéket.

Támogatás: TKP2021-EGA-1, GINOP-2.3.4-15-2020-00008

i.p.: intraperitoneális

AZ AYAHUASCA KOMPONENSEINEK TERÁPIÁS POTENCIÁLJA A SZEM ISZKÉMIA-
REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSÁBANSzilágyi Anna¹Varga Balázs¹, Szilvássy Zoltán¹, Juhász Béla¹, Frecska Ede², Takács Barbara¹, Szekeres Réka¹, Tarjányi Vera¹, Bombicz Mariann¹, Priksz Dániel¹, Kovács Attila²

1 Debreceni Egyetem ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet,

2 Debreceni Egyetem Klinikai Központ ÁOK Pszichiátriai Tanszék

Az iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásnak jelentős szerepe van számos szembetegség etiológiájában, úgymint glaukóma, diabéteszes vagy hipertenzív retinopátia és iszkémiás optikus neuropátia. Jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony kezelés az I/R károsodáshoz kapcsolódó szembetegségek kivédésére és gyógyítására. Kísérletünkben az ayahuasca két fontos komponensének, az N,N-dimetiltriptaminnak (DMT) és a harmalinnak a retinoprotektív hatását teszteltük. Spargue Dawley patkányok szemén ligációs módszerrel 60 perc globális iszkémiát provokáltunk, melyet egy 7 napig tartó reperfúziós fázis követett. Ezalatt az állatokat harmalinnal, DMT + harmalinnal vagy vivőanyaggal kezeltük. Egy hét elteltével elektroretinográfiás (ERG) méréseket, western blot analízist és hisztológiai elemzést végeztünk az állatok szemein. A harmalin kezelés önmagában protektívnek bizonyult a szem I/R károsodásával szemben, míg a DMT-vel történő együttes adás esetén, ez a védő hatás nem érvényesült. A harmalin mérsékelte a retina rétegvastagságának csökkenését, valamint ERG méréseink alapján csökkentette a szem funkcionális károsodását. A western blot vizsgálatunk során az I/R patomechanizmusában fontos fehérjéket vizsgáltunk, melyeknek szerepe van a gyulladáshoz vezető válaszban, az oxidatív stressz és a sejthalál kiváltásában és a szöveti destrukcióban. A harmalin csökkentette a PARP1, MMP9 és az NFκB expresszióját és növelte a Hsp70 szintézisét. A DMT kezelésben is részesülő csoportban a hatás ellentétes volt. A DMT ígéretes gyógyszerjelölt számos betegség kezelésében, ezért nemkívánt káros hatása a szem keringészavara esetén további vizsgálatokat tesz szükségessé. Jelen kísérlet felfedte a MAO-A gátlás terápiai potenciálját a szem I/R károsodással összefüggő betegségeiben.

I/R = iszkémia-reperfúzió; DMT = N,N-dimetiltriptamin; ERG = elektroretinográfia; PARP1 = poli(ADP-ribóz) polimeráz-1; MMP9 = mátrix metalloproteináz-9; NFκB = Nucleáris faktor kappa B; Hsp70 = 70 kDa molekulásúlyú hő sokkfehérje

FOSZFATIDILSZERIN RECEPTOROK A VÁZIZOM SÉRÜLÉST KÖVETŐ
REGENERÁCIÓJÁBAN

Szondy Zsuzsa^{1,2}, Nour Al-Zaeed¹, Budai Zsófia¹, Szentesi Péter³, Csernoch László³, Sarang Zsolt¹

¹Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

²Debreceni Egyetem, FOK, Alapozó Orvosi Ismeretek Tanszék, Debrecen

³Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani Intézet, Debrecen

A vázizom sérülést követő regenerációja az izomrostok bazális laminájában elhelyezkedő miogén őssejtek, az ún. szatellit sejtek osztódásának és differenciációjának eredménye. A szatellit sejt differenciációja nem szatellit sejt autonóm folyamat, hanem a környező sejtek által kibocsájtott szignálmolekulák függvénye. A folyamat szervezésében meghatározó szerepet töltenek be a sérülés helyére bevándorló makrofágok, részben mert eltakarítják az elhalt sejteket, részben mert a mioblaszt differenciációt reguláló szignálokat bocsájtanak ki. A folyamat kezdetén ezek gyulladásozó makrofágok, melyek az eltakarítást követően ún. gyógyító makrofágokká alakulnak. Mind a korai szakaszban termelt gyulladási citokinek, mind a gyógyító szakaszban termelt növekedési faktorok és gyulladáscsökkentő molekulák szükségesek a megfelelő szöveti regenerációhoz. Az elhalt sejtek makrofágok általi felismerése PSR-ak segítségével történik. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyha ilyen receptorok hiányoznak, mi történik a vázizom regenerációjával. Megállapítottuk, hogy hiányukban nemcsak az eltakarítás fog késni, hanem késik, illetve nem megfelelő a makrofágok gyógyító irányba történő konverziója is bizonyítva, hogy a konverzió a fagocitózis függvénye. Emiatt kulcs növekedési faktorok termelése zavart, és ez a mioblasztok fúziójának késéséhez, és nem megfelelő izomregenerációhoz vezet. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy vizsgált két PSR nemcsak a makrofágok felszínén tölt be szerepet, hanem szükséges a mioblasztok fúziójához is. Hogy a fúzió is PSR függő, az már korábban is ismert volt, sőt két másik fagocitózis receptorról is leírták már, hogy szükséges a mioblasztok fúziójához. Ezen felbuzdulva átnéztük az irodalmat, és azt találtuk, hogy szinte minden ismert fagocitózis PSR kapcsolatba hozható az izomsejtek fúziójával is. Eredményeink arra utalnak, hogy e receptorok működésének fokozása pl. az őket a PS-hez kötő hídmolekulák adásával, hatékony fokozói lehetnek a vázizom regenerációjának.

Rövidítés: PS, foszfatidilszerin; PSR, foszfatidilszerin receptor

Támogató: OTKA 124244 és 138162

A BURSA FABRICIIBEN ZAJLÓ
LIMFOID FOLLIKULOGENEZIS KARAKTERIZÁLÁSA

Szőcs Emőke¹

Soós Ádám¹, Halasy Viktória¹, Jancsovcics Dalma¹, Nagy Nándor¹

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Őssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium

A bursa Fabricii (BF) a madarak bélhez-asszociált primer nyirokszerve, a B-limfociták proliferációjának, differenciálódásának, az immunrepertoár kialakulásának helye. Az embrionális fejlődés kezdetén a BF epiteliális telepe a kloáka disztális, ektoderma-eredetű szakaszából indul ki. Az organogenezis idején a BF hámkezdeményét vastag mesenchymális sejtréteg borítja, amelyet vér eredetű őssejtek (B-limfocita, makrofág és dendritikus prekursorok) népesítenek be. A véreredetű mieloid prekursorok a mesenchymában a hámsejteket folliculusbimbók képzésére készítetik. A B-limfocita prekursorok további differenciálódását a BF folliculusokat alkotó dendritikus-, makrofág-, és hámretikulum sejtekből álló mikrokörnyezete határozza meg. A stromális mikrokörnyezet jelentősége a lymphopoiezisben főleg az őssejtek differenciálódását irányító növekedési faktorok és citokinek felfedezésével értékelődött fel.

Jelen munkánk során hisztológiai és immuncitokémiai módszerrel tanulmányoztuk a mieloid sejtek megjelenését és differenciálódását, amelyek elindítják a BF limfoid folliculusainak ontogenezisét a B-sejtek bejutása előtt. A 9 napos csirke embrióban az EIVE12 monoklonális ellenanyag (mAb) a hám alatti mesenchymában kis csoportokat képező kerek sejteket jelöl, melyek hámba vándorlását követi a folliculusok kezdeményét alkotó hám bimbók megjelenése. Egy nappal később, CSF1R+, illetve TIM4 receptorokat expresszáló nyúlványos sejtek kolonizálják a hám bimbókat, amiben 24-48 órával később CXCR4+/chB6+/IgM+ B-sejt prekursorok telepednek meg. Kikelést követően a BF-ben képződő chB6+ B-limfociták a perifériára vándorolva a szekunder nyirokszerveket kolonizálják.

Következtetés: Az EIVE12 mAb által felismert sejt epiteliális inváziója az embrionális élet során jóval megelőzi a dendritikus/makrofág sejtek folliculusbimbókba történő bevándorlását. Ez az új megfigyelés arra utal, hogy az eddigi elképzeléssel szemben nem a dendritikus prekursor sejtek és a hám dendro-epiteliális kölcsönhatása, hanem egy új sejt típus, az EIVE12+ „limfoid folliculusbimbó indukáló” sejtek inváziója indítja el a folliculogenezist.

A *RICTOR* AMPLIFIKÁCIÓ ÉS AZ mTORC2 AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA ÉS JELENTŐSÉGE KISSEJTES TÜDŐCARCINOMA SEJTVONALAKBAN

Sztankovics Dániel¹, Krencz Ildikó¹, Dankó Titanilla¹, Nagy Noémi¹, Petővári Gábor¹, Pápay Judit¹, Khoór András², Sebestyén Anna¹

1 Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, Magyarország
2 Mayo Clinic, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Jacksonville, FL, USA

Az újonnan diagnosztizált tüdődaganatos esetek 15-20%-át a neuroendokrin daganatok közé tartozó kissejtes tüdőcarcinomák (SCLC) alkotják. A betegségre jellemző a rendkívül rossz prognózis és a korai áttétképződés. Az SCLC-k kezdetben jól reagálnak a platinabázisú kemoterápiára, azonban a legtöbb esetben néhány hónap alatt rezisztencia alakul ki. A terápiás nehézségek és a kedvezőtlen prognózis miatt az SCLC-k genetikai jellemzése intenzíven zajlik. A közelmúltban az mTORC2 vázfehérjéjét kódoló *RICTOR* gén amplifikációját a leggyakrabban előforduló, célozható genetikai eltérésként azonosították az SCLC-kben.

Munkánkban a humán SCLC sejtvonalak *RICTOR* amplifikációs státuszát és mTOR-aktivitását, valamint a jellemzett sejtvonalak *in vitro* és *in vivo* cisplatin és különböző mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységét vizsgáltuk.

FISH és ddPCR vizsgálatokkal 8 humán SCLC sejtvonal *RICTOR* amplifikációs státuszát jellemeztük. A sejtvonalakon Alamar Blue és Sulforhodamine B esszékkel az mTOR-jelátviteli út inhibitorainak proliferációgátló hatását vizsgáltuk a kezelésben hagyományosan alkalmazott cisplatinnal összehasonlítva. Az mTOR-jelút fehérjéinek expresszióját immunhisztokémiával és Western blottal is vizsgáltuk a különböző mintákban.

A *RICTOR* amplifikáció jelenlétét 2 sejtvonalban, mindkét módszerrel igazoltuk (FISH, ddPCR). A legtöbb sejtvonal a cisplatin kezeléssel szemben rezisztens volt. A *RICTOR* amplifikációval vagy az mTOR-jelút egyéb genetikai eltéréseivel rendelkező sejtvonalak az mTOR-gátló (elsősorban az mTORC1 és C2 kináz inhibitor) kezeléssel szemben érzékenyek bizonyultak.

A *RICTOR* amplifikáció, illetve magas mTORC1 és mTORC2 aktivitás jól targetálható jellegzetessége lehet az SCLC-knek. Ezzel összefüggésben az újgenerációs mTOR-gátlók (elsősorban az mTORC1 és C2 kináz gátlók) kombinációs kezeléseket fokozhatják a kemoterápiás szerek (pl. cisplatin, etoposid, stb.) hatékonyságát, a jövőben lehetséges megoldást jelenthetnek a jelenlegi kezelésekkal szemben kialakuló rezisztencia áttörésében.

Támogatások: NKFI-FK-128404, STIA-KFI2020, ED_17-1-2017-0009

Rövidítések: SCLC – Small Cell Lung Cancer; mTORC1 és C2 - Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1-2; RICTOR - RPTOR Independent Companion Of mTOR Complex 2, FISH - Fluorescence In Situ Hybridization; ddPCR – Droplet Digital PCR

PROTEASZÓMA GÁTLÓ (MG-132) ÉS KINÁZ GÁTLÓK HATÁSA PATKÁNY
FEOKROMOCITÓMA (PC12) SEJTEK JELÁTVITELÉRE

Tarjányi Oktávia^{1,2}

Vecsernyés Mónika^{1,2}, Berta Gergely^{1,2}, Stayer-Harci Alexandra^{1,2}, Balogh Bálint¹, Boldizsár Ferenc³, Szeberényi József^{1,2}, ifj. Sétáló György^{1,2}

1 Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium, Pécs

2 Szentágothai János Kutatóközpont, Jelátviteli munkacsoport, Pécs

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

Bevezetés: A patkány feokromocitóma (PC12) sejt vonal kedvelt modell rendszere az *in vitro* idegsejt differenciáció, túlélés és apoptózis vizsgálatának. Az MG-132 proteaszóma gátló vegyület ezekben a sejtekben beindítja a neuronális differenciáció folyamatát, azonban 24 óra elteltével a sejtek morfológiai változásai egyre inkább a programozott sejthalál jeleit mutatják. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPS) megfelelő működése szükséges számos jelátviteli út szabályozásához. Különböző daganatok, gyulladás és neurológiai kórképek hátterében az UPS diszfunkciója állhat. A hematológiai tumorok terápiájában alkalmazott proteaszóma gátlók egyik mellékhatása a perifériás neuropátia, melynek pontos kialakulási mechanizmusa még nem tisztázott. Másrészt az UPS csökkent működése mutatható ki neurodegeneratív megbetegedésekben.

Módszerek: A proteaszóma-aktivitást fluorimetriás eljárással, a sejtek morfológiai változásait fáziskontraszt mikroszkóppal, az apoptózis folyamatát magfestéssel, flow citometriával, WST-1 kolorimetriás esszével, valamint a különböző jelátviteli útvonalak aktivitását Western-blot analízissel detektáltuk. A jelátviteli utak közti kapcsolatok feltérképezésére kináz gátlókat (LY294002, SB203580, SP600125) használtunk.

Eredmények: Az MG-132 proteaszóma gátlóval végzett kezelés kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Kezdetben neuronális differenciációt indukál, de a hosszabb kezeléseket apoptózishoz vezetnek, melynek hátterében a stressz-kinázok (JNK és p38) és a kaszpáz-3 fokozott, valamint a túlélést közvetítő Akt csökkent aktivitása figyelhető meg. A különböző kináz gátlókkal végzett kísérleteink alapján feltérképeztünk egy komplex szabályozási hálózatot e jelátviteli komponensek között. Végül kimutattuk, hogy egyes kináz inhibitorok képesek gátolni, vagy potenciózni az MG-132 által kiváltott jelátviteli változásokat.

Következtetések: Eredményeink lehetséges magyarázatul szolgálhatnak a proteaszóma gátlók által kiváltott perifériás neuropátia, illetve különböző neurodegeneratív betegségek molekuláris hátterére, és akár újszerű, kombinációs terápiák kidolgozásához is hozzásegíthetnek a jövőben.

JNK: Jun N-terminális kináz, a stressz jelátvitelben szerepet játszó Mitogén Aktivált Protein Kináz

LY294002: Foszfadilinozitol 3-kináz (PI3K) -inhibitor, gátolja az Akt foszforilációját

MG-132: peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátló vegyület

p38: a stressz jelátvitelben szerepet játszó Mitogén Aktivált Protein Kináz

PC12: patkány feokromocitóma sejt vonal

SB203580: egy ATP-kompetitív p38 MAPK-inhibitor, gátolja a p38 aktivitását

SP600125: egy ATP-kompetitív pan-JNK-inhibitor, gátolja a JNK aktivitását

UPS: ubikvitin-proteaszóma rendszer

WST-1: tetrazólium só, melyet az élő sejtek arányának meghatározásához használtunk

A THROMBOSPONDIN-1 FEHÉRJE POSZTTTRANZLÁCIÓS SZABÁLYOZÁSA A PKC-PP2A
ÚTVONALON KERESZTÜL AZ ENDOTÉL SEJTEKBEN

Thalwieser Zsófia, Király Nikolett, Csontos Csilla, Boratkó Anita

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet; Debrecen

Munkánk során a sejtek biokémiai, jelátviteli folyamatainak egyik alapvető reverzibilis szabályozásával a fehérjék foszforilációja/defoszforilációjával foglalkozunk, melyet a protein kinázok és foszfatázok katalizálnak. A protein foszfatáz 2A (PP2A) szubsztrát fehérjéinek vizsgálata során kimutattuk, hogy a B55 α regulátor alegységet tartalmazó holoenzim egy potenciális célpontja a thrombospondin-1 (TSP1) fehérje. TSP1 egy olyan matricelluláris glikoprotein, melyet leggyakrabban az angiogenezis és a tumor növekedés természetes inhibitoraként emlegetnek. Munkánk során pull down, illetve immunprecipitációval igazoltuk a PP2A és TSP1 fehérjék közti kölcsönhatást. Western blot és qPCR technikákkal kimutattuk, hogy a PP2A gátlása okadánsavval, a protein kináz C (PKC) aktiválása PMA-val, valamint a PKC gátlása Gö6976-tal hatással van a TSP1 szintjére endotél sejtekben. Immunprecipitációval igazoltuk, hogy a TSP1 fehérje szerin oldalláncon foszforilálódik. Foszforilációs predikációs szoftver felhasználásával a TSP1 teljes szekvenciájában öt potenciális PKC által foszforilálható szerin oldalláncot azonosítottunk (Ser44, Ser93, Ser297, Ser1113 és Ser1161). A foszforilációs oldallánc azonosításához három fragmentet hoztunk létre (1-221aa, 222-314aa, 972-1171aa), majd az érintett oldalláncok helyspecifikus mutagenézisével foszfomutáns rekombináns fehérjéket hoztunk létre, melyeket *in vitro* PKC foszforilációs kísérletben felhasználva azonosítottuk a foszforilációs oldalláncot. A TSP1 foszforilációja hatással van az endotél sejtek élettani működésére is. A B55 α depletált sejtek érképző képessége megemelkedik, azonban sebgyógyulási képessége csökken a kontroll sejtekhez képest. NanoShuttle rendszer felhasználásával kimutattuk, hogy B55 α depletált sejtek nagyobb, instabilabb 3D spheroidokat képeznek. A továbbiakban a TSP1 foszfomutánsait tervezzük felhasználni a folyamatok tanulmányozásában.

A munkát támogatta: ÚNKP-21-3-II-DE-17 (TZS) és NKFI FK135384 (BA).

PP2A – protein foszfatáz 2A

TSP1 – thrombospondin-1

PKC – protein kináz C

A SZTEARIL-KOA DESZATURÁZ-1 M224L POLIMORFIZMUSÁNAK JELENTŐSÉGE A LIPIDHOMEOSZTÁZISBAN

Tibori Kinga¹, Orosz Gabriella¹, Csala Miklós¹, Kereszturi Éva¹

¹Semmelweis Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék, Budapest

Számos, a túlzott táplálékbevitellel és mozgásszegény életmóddal összefüggő tünetegyüttes hátterében a lipidanyagcsere szisztémás zavara állhat. A lipotoxicitással szembeni védekezés kulcsenzime a telítetlen zsírsavak szintéziséért felelős sztearil-KoA deszaturáz-1 (Scd1). Az enzim fokozott aktivitása vagy túltermelődése azonban szintén kedvezőtlen a szervezet számára, hozzájárulhat a II-es típusú diabétesz kialakulásához.

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy az Scd1 aminosav cserét okozó polimorfizmusa (M224L, rs2234970) hozzájárulhat-e az enzim eltérő működéséhez.

A vad típusú Scd1-et expressziós vektorba klónoztuk, Glu-Glu-tagelt és aminosavcserét hordozó változatait irányított mutagenézissel hoztuk létre, majd HEK293T sejtes rendszerben vizsgáltuk. A fehérje szinteket immunoblottal, az mRNS expresszió változását qPCR-rel, az enzimaktivásokat GC-FID-del követtük.

Bizonyítottuk, hogy az M224L polimorf enzim a lassabb fehérjedegradáció és a stabilabb mRNS szerkezet következtében nagyobb mennyiségben van jelen a sejtekben. A megnövekedett enzimmennyiség megemeli a telítetlen:telített zsírsav arányt, szignifikáns mértékben növelve a C18:1 és a C16:1 intracelluláris mennyiségét. Kimutattuk, hogy zsírsavak (oleát, palmitát, palmitoleát, linoleát, sztearát) jelenlétében az M224L stabilitása tovább fokozódik, míg a vad típusú Scd1 szintjére nincsenek hatással. Az M224A mesterséges variáns vizsgálata során a vad típusú Scd1-hez hasonló intracelluláris enzimmennyiséget detektáltunk, azonban a mutáns fehérje stabilabbnak, az mRNS pedig instabilabbnak mutatkozott. Ugyanakkor a különböző zsírsavak a vad típusúhoz hasonlóan nem befolyásolták a fehérje szintjét.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az M224L polimorfizmus megnövekedett Scd1 szintet eredményez, fokozza a sejt telítetlen zsírsavmennyiségét. Az M224A mesterséges variáns vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a metionin elvesztése stabilizálja a polimorf fehérjét, a leucin megjelenése pedig magasabb mRNS szintet és zsírsav függő fehérje stabilitást eredményez.

A munkát az NKFIH K_125201 és FK_138115 pályázatok segítették.

Scd1: Sztearil-KoA deszaturáz-1

M224L: a 224-es pozícióban Met helyett Leu aminosav található

A BMP-INDUKTOR TILORON ANTIFIBROTIKUS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA LÉGÚTI
FIBROBLASZTOKBAN

Tóth Enikő¹, Szabó Kitti¹, Vég Attila Gergely², Becsky Dániel¹, Dux László¹, Rovó László³,
Keller-Pintér Anikó¹

¹ SZTE SZAOK Biokémia Intézet; ² ELKH SZBK Biofizikai Intézet

³SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika

A laryngeális fibrózis és a következményes gégeszűkület kialakulása a hosszan tartó intubálás súlyos szövődménye. Ismert, hogy a megnövekedett TGF-béta szint felelős a fibroblasztok aktív fenotípusának kialakításáért, a fokozott migrációs képességért, valamint az alfa-SMA és egyéb fibrózis markerek expressziójának indukálásáért. A szintetikus, kis-molekulasúlyú tiloron epithel sejtekben indukálja az antifibrotikus hatású BMP jelutat és *in vivo* csökkenti a tüdőfibrózis mértékét, így célunk *in vitro* a légúti fibroblasztokra gyakorolt hatásának tanulmányozása.

Kísérleteinkhez MRC5 humán légúti fibroblaszt sejtvonalat használtunk, a sejteket 10 nM, 20 nM és 35 nM tiloronnal, illetve 5 ng/ml TGF-bétával kezeltük. Az mRNA expressziót qPCR technikával vizsgáltuk. A foszfo-Smad1/5/8 sejtmagi mennyiségét és az alfa-SMA expressziót fluoreszcens mikroszkópos felvételeken EpiSelector-szoftverrel mértük. Az *in vitro* kétdimenziós sejtmigrációs vizsgálatokat nagy áteresztőképességű élősejtes mikroszkópiával végeztük. A sorozatfelvételeken a sejtek random mozgását CellTracker és FIJI képfeldolgozó programokkal analizáltuk. A mátrix rugalmasságát atomerő mikroszkópiával vizsgáltuk.

A tiloron képes fokozni a BMP jelátvitelben résztvevő molekulák mRNA szintjeit, valamint a pSMAD 1/5/8 sejtmagi jelenlétét is szignifikánsan megemelte, kivédte a TGF-béta hatására indukálódott fokozott fibroblaszt migrációt, csökkentette a TGF-béta okozta alfa-SMA expressziót (kontroll vs. TGF-béta vs. TFG-béta + 20 nM tiloron kezelt vs. TFG-béta + 35 nM tiloron kezelt: $265,8 \pm 12,92$ vs. $823,5 \pm 54,86$ vs. $279,4 \pm 13,83$ vs. $296,9 \pm 10,83$ önkényes egység), valamint helyreállította az extracelluláris mátrix rugalmasságát (kontroll vs. TGF-béta vs. TFG-béta + 20 nM tiloron kezelt vs. TFG-béta + 35 nM tiloron kezelt: $1,156 \pm 0,098$ vs. $2,641 \pm 0,2727$ vs. $1,469 \pm 0,2461$ vs. $1,306 \pm 0,2158$ önkényes egység).

Eredményeink alapján a tiloron kivédi a TGF-béta hatását légúti fibroblasztokban, mely új lehetőségeket nyithat a heges gégeszűkületek, gégefibrózis kezelésére.

Támogatások: NKFI FK 134684, NKFI K 132446, TKP2021-EGA-28. Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00734/19/5), UNKP-21-5-SZTE-571.

TGF-béta: Transzformáló növekedési faktor-béta, alfa-SMA: alfa-simaizom aktin, BMP: csont morfogenetikus fehérje, pSMAD 1/5/8: foszfo-SMAD 1/5/8

A MIF TAUTOMERÁZ INHIBITOR KRP-6 GÁTOLJA A GYULLADÁSOS MAKROFÁG
AKTIVÁCIÓT ÉS VÉDI A MITOKONDRIÁLIS ENERGIATERMELÉST

Vámos Eszter, Bagóné Vántus Viola, Kovács Dominika, Deák Péter, Kőszegi Balázs, Kálmán Nikoletta, Vass Ibolya, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Bevezetés: A MIF az egyik legrégebben leírt citokin, mely például makrofágokban fokozni képes a sejt adhézióját, a fagocitózist, valamint a migráció gátlását is indukálja. A MIF számos krónikus és akut gyulladásos kórképben játszik kulcsszerepet (pl.: szepszis, krónikus tüdőgyulladás). De emelkedett MIF szintet találtak gyulladásos bélbetegségekben is.

Mindezekkel szoros összefüggésben a MIF gátlás pozitív hatását is leírták már számos gyulladásos modellben. A kutatócsoportunk egy MIF gátló család (tautomeráz inhibitorok) egyik új képviselője, a KRP-6 hatását vizsgálta LPS indukálta makrofág sejtekben és a hatását összehasonlítottuk a klasszikus MIF tautomeráz inhibitorával az ISO-1-gyel.

Módszerek: RAW264.7 egér makrofág sejteket LPS-sel (1 µg/ml) indukáltuk és 20µM KRP-6-tal vagy ISO-1-el kezeltük őket. Az LPS-sel kezelt makrofágok ROS termelését dihidrorodamin 123 fluoreszcens festékkel, a képződő nitritet Griess-reagenssel, az aktivált makrofágok által a médiumba szekretált IL-6 mennyiségét Ready-Set-Go ELISA kittel határoztuk meg. A mitokondriális oxigénfogyasztást SeahorseXFp műszerrel mértük, ehhez a RAW 264.7 sejteket 10 ng/ml IFN-γ-val és 100ng/ml LPS-sel önmagában vagy KRP-6-tal (20 µM) vagy ISO-1-el (20 µM) együtt kezeltük.

Eredmények: A KRP-6 kezelés hatására szignifikánsan csökkent az LPS indukálta ROS, nitrit és IL-6 termelés. KRP-6 hatására javult az aktivált sejtek alap- és maximális légzése, ATP termelése és a tartalék respirációs kapacitása is, kis mértékben tovább csökkentette a nem mitokondriális oxigénfogyasztást.

Következtetések: Kísérleteink tehát azt mutatják, hogy az általunk alkalmazott MIF tautomeráz inhibitor, a KRP-6, az LPS indukálta gyulladásos makrofág aktiváció számos aspektusát jobban gátolta, mint az ISO-1. Így jelentős szerepe lehetne különböző gyulladásos kórképek terápiájában, az M0-M1 irányú makrofág polarizáció gátlásával.

Rövidítések: MIF - makrofág migráció gátló faktor, KRP-6 - (3E)-3-(2-Methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one, ISO-1 - 4,5-Dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-5-isoxazoleacetic acid methyl ester, LPS – lipopoliszacharid, IL-6 – interleukin-6, IFN-γ – interferon-gamma

Támogatás: TKP2021-EGA-17 Tématerületi Kiválósági Program

A FESZÜLTÉGKAPUZOTT DIMER ÉS MONOMER PROTONCSATORNA
FLUOROMETRIÁS JELEI

Papp Ferenc¹, Gilman Toombes², Fehér Ádám¹, Pethő Zoltán^{1,3}, Bagosi Adrienn¹, Almássy János⁴, Panyi György¹ és Varga Zoltán¹

¹ Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

² Molecular Physiology and Biophysics Section, Porter Neuroscience Research Center, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, United States

³ Institut für Physiologie II, Robert-Koch-Str. 27b, 48149, Münster, Germany.

⁴ Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani Intézet

A feszültség-kapuzott membránfehérjék konformáció-változásának vizsgálatára az egyik legalkalmasabb technika a Voltage-Clamp Fluorometry (VCF), mellyel a fehérje egyik extracelluláris részéhez csatolt festék fluoreszcencia-intenzitásának változását mérjük. A fehérje konformációs átrendeződését a membránpotenciál elektródák általi megváltoztatása hozza létre. A festék lokális környezetének a változása idézi elő a fluoreszcencia intenzitás növekedését vagy csökkenését. Méréseink során a Hv1 feszültség-kapuzott protoncsatorna VCF jelének keletkezését vizsgáltuk, amely hasonló feszültségérzékelő szerkezettel rendelkezik, mint a többi feszültség-kapuzott ioncsatorna, de hiányzik belőle a pórus, amin keresztül az ionok keresztül haladnak a sejtmembránon. Ezen kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy felderítsük azoknak a fluoreszcenciát kioltó aminosavaknak a helyzetét a Hv1 fehérjében, amelyek hozzájárulnak a VCF jel kialakulásához. A természetben elsősorban dimerként fordul elő a Hv1 fehérje és ezért a méréseinkben is a dimer Hv1-et kezdtük vizsgálni. A dimer mindkét alegységét fluoreszcensen megjelöltük Tamra-MTS festékkel. Eddigi eredményeik azt jelezték, hogy a Tamra fluoreszcenciáját meghatározza, hogy milyen távolságra van kioltó aminosavaktól, valamint a sejtmembrán lipid molekuláitól. Kísérleteinkben annak jártunk utána, hogy ugyanazon alegység kioltó aminosavai hatnak-e kölcsön a Tamra-val, mint amit a Tamra-val megfestettünk, vagy a dimer Hv1 másik alegységének aminosavai is szerepet játszanak a VCF jel kialakításában. Ehhez a szimmetrikus dimer Hv1 mellett aszimmetrikus dimerek VCF jeleit is vizsgáltunk, továbbá monomer Hv1-gyel is végeztünk kísérleteket. Eredményeinket összevetettük egyszerű háromállapotú modellünkkel, amiben egyetlen domináns kioltó aminosavval számoltunk a sejtmembrán lipid molekulái mellett.

TARGETING MC1R WITH PEPTIDE-DRUG CONJUGATES USING IN VITRO AND IN VIVO
MELANOMA MODELS

Vári Balázs¹

Szabó Ildikó², Randelovic Ivan¹, Vári-Mező Diána¹, Mező Gábor², Tóvári József¹

National Institute of Oncology, Experimental Pharmacology¹
Eötvös Loránd Research Network (ELKH), Peptide Chemistry group²

Melanoma is a class of skin cancer when specific type of cells called melanocytes start to proliferate out of control. Melanoma is not among the most common cancer types, but it is rather dangerous because of its high metastatic potential. According to the American Cancer Society's estimations, there will be around 100.000 new melanoma cases. Once, melanoma metastatized, it is extremely challenging to cure patients, therefore, finding new effective treatments is crucial. Melanocortin-1 receptor (MC1R) is highly expressed on cancer cells of a subset of melanoma patients. Since healthy cells do not show high expression of MC1R, it may be used for targeted cancer therapy. Our collaboration partner synthesized targeting peptides based on one of MC1R's ligand called α -MSH. These peptides were connected to a cytotoxic agent, Daunomycin. Expression of MC1R was tested by qPCR and Western blot methods to select suitable experimental models. Cytotoxicity of the newly synthesized peptide-drug conjugates were tested on various cell lines including healthy fibroblasts. Effect of cancer progression was also tested on our murine allograft model. Moreover, murine xenograft models were established to see the result of conjugates on human cells in an in vivo model.

Balázs Vári acknowledges financial support from the National Laboratories Excellence program (under the National Tumorbiology Laboratory project (NLP-17)) and the Hungarian Thematic

Excellence Programme (TKP2021-EGA-44).

NUKLEOLIN-SPECIFIKUS PEPTID-HATÓANYAG KONJUGÁTUMOK TERVEZÉSE CÉLZOTT
TUMORTERÁPIÁRA

Vári-Mező Diána,¹ Basa Bettina,^{2,3} Kiss Krisztina,⁴ Enyedi Kata Nóra,³ Horváth Lilla,^{2,3}
Biri-Kovács Beáta,^{2,3} Vári Balázs,¹ Tóvári József,¹ Mező Gábor^{2,3}

1Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály

2ELKH-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

3Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Intézet

4Tavanta Therapeutics Hungary Zrt.

A tumoros megbetegedések gyógyításban kulcsszerepe van a kemoterápiának, amely azonbanszámos mellékhatással jár. Jelentős előrelépés lehet a célzott terápia alkalmazása, amikor a hatóanyagot olyan irányító molekulához kapcsolják, amely szelektíven ismeri fel a tumorspecifikus vagy a tumorsejteken túlexpresszázó receptorokat, vagy egyéb sejtfelszíni markereket. A teljes gyógyuláshoz elengedhetetlen, hogy ne csak a szenzitív, hanem a rezisztens tumorsejteket is elpusztítsuk. Azonban a rezisztens sejtek, mint például a tumor őssejtek kevesebb és/vagy más típusú sejtfelszíni struktúrával rendelkeznek, így nehéz olyanirányító molekulát találni, amely alkalmas lehet mind a két tumorsejt típus célzására. Egy ilyen fehérje lehet a nukleolin, amely mind a gyorsan osztódó szenzitív tumorsejteken, mind a rezisztens sejteken is nagy mennyiségben megjelenik a sejtfelszínen.

Kutatásainkban igazoltuk a nukleolin jelenlétét különböző tumor típusokon, továbbá *in vitro* és *in vivo* modelleken azt is, hogy a klinikumban alkalmazott hatóanyagokkal történő kezelés hatására megnövekszik a nukleolin szint a tumorokban. Tehát a nukleolin alkalmas célpont lehet a célzott terápiaiban.

Az irodalomban legismertebb nukleolin-specifikus irányító peptid egy 31 aminosavból álló szekvencia (F3 peptid). Egy ilyen méretű peptid alkalmazása terápiás konjugátumban azonban nem költséghatékony. Ezért az F3 peptidből kiindulva kisebb átlapoló fragmenseket állítottunk elő, amelyekhez daunomicint kapcsolunk oxim-kötéssel. Azt tapasztaltuk, hogy az N-terminális dekapeptid fragmensből készült konjugátum hasonló aktivitással (citotoxicitás, sejtbejutási képesség) rendelkezik, mint a teljes hosszúságú peptid konjugátum. Ha ennek a peptidnek a szekvenciáját tovább optimáltuk, akkor növelhető volt a tumorelles hatása. Kompetíciós kísérletekkel vizsgáljuk, hogy a rövidebb peptidet tartalmazó konjugátum szintén specifikus-e a nukleolinra. A leghatékonyabb konjugátumokat *in vivo* vizsgálatokban is teszteljük.

Támogatások:

Tématerületi Kiválósági Program 2021 (TKP2021-EGA-44)

Nemzeti Tumorbiológiai Laboratórium projekt (NLP-17)

NKFIH (2018-1.2.1-NKP-2018-00005, K119552)

AZ EKDISZTEROIDOK VÉR-AGY GÁTRA GYAKOROLT VÉDŐHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
OXIDATÍV STRESSZ SORÁN

Vigh Judit P.^{1,4}

Santa-Maria Ana Raquel¹, Galvis-Montes Daniel S.¹, Walter Fruzsina R.¹, Hunyadi Attila², Deli Mária A.¹

1 Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet, Szeged

2 Szegedi Tudományegyetem, Farmakológiai Intézet, Szeged,

A szteroid hormonok közé tartozó ekdiszteroidok fontos szerepet játszanak az ízeltlábúak egyedfejlődésének szabályozásában. Növényekben termelődve védelmi feladatot látnak el azáltal, hogy képesek megzavarni a növényevő rovarok fejlődését. Ezen kívül emlősökben, köztük az emberben is, számos jótékony, anabolikus, metabolikus és antioxidáns hatásuk ismert. A vegyületcsoport legjobban tanulmányozott tagjai a 20-hidroxi-ekdizon és származéka a kaloniszteron.

A vér-agy gát alapját az agyi hajszálereket alkotó endotélsejtek és a sejtek közötti szoros kapcsolatok alkotják. Mivel a vér-agy gát működése a legtöbb központi idegrendszerrel kapcsolatos megbetegedésekben sérül, rendkívül fontos olyan védőmolekulákat találni, amelyek elősegítik a gátműködés fenntartását.

Kutatási célunk az volt, hogy a 20-hidroxi-ekdizon és a kaloniszteron potenciális védő-hatását vizsgáljuk humán agyi endotélsejtekben élettani körülmények között és oxidatív stressz során.

Vér-agy gát modellként hCMEC/D3 humán agyi endotélsejtvonalat használtunk, melyeket terc-butil-hidroperoxiddal kezeltünk az oxidatív stresszt kiváltása érdekében. A sejtek életképességét impedancia alapú, valós idejű sejtanalízissel követtük nyomon. A gátműködés vizsgálatára transzendentáliális elektromos ellenállás és permeabilitás méréseket, illetve a sejtközötti kapcsolatok β -katenin fehérjéjére specifikus fluoreszcens immunfestést végeztünk. Végül megmértük a reaktív oxigéngyökök termelődését normál körülmények között és a terc-butil-hidroperoxid kezelés következtében létrejövő károsodás során.

Megállapítottuk, hogy alacsony koncentrációjú 20-hidroxi-ekdizon illetve kaloniszteron (0,1 és 0,01 μ M) kezelés hatására erősödött az endotélsejtek alkotta gát szorossága normál tenyésztési körülmények között. A kaloniszteron kezelés védőhatást fejtett ki oxidatív stressz okozta sejtkárosodás során, csökkentette a vér-agy gát sérülését, azonban a reaktív oxigéngyökök termelődésére nem volt hatása. Eredményeink felvetik, hogy a vizsgált ekdiszteroidok vér-agy gát védő hatása kiaknázható lehet terápiás lehetőségként különböző neurovaszkuláris betegségekben.

Munkánk a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány, 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21 és NKFIH (OTKA-K134704) támogatásával készült.

EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK LIPID TARTALOM ALAPJÁN TÖRTÉNŐ MENNYISÉGI
MEGHATÁROZÁSA

Almási Anna^{1,2}, Koncz Anna¹, Németh Krisztina¹, Csomos Attila³, V. Vukman Krisztina¹, Xabier Osteikoetxea^{1,5}, Mucsi Zoltán⁴, Buzás Edit^{1,5,6}, Visnovitz Tamás¹,

¹ Semmelweis Egyetem, ÁOK, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

² Pécsi Tudomány Egyetem, Egészségtudományi Kar, KLK, Pécs

³ Eötvös Loránd Tudományegyetem, TTK, Hevesy György Doktori Iskola, Budapest

⁴ Miskolci Egyetem, Anyagtudományi Kar, Kémia Intézet, Miskolc

⁵ HCEMM-SU Extracellular Vesicles Research Group, Budapest

⁶ ELKH-SE Immun-Proteogenomikai Extracelluláris Vezikula Kutatócsoport, Budapest

Az extracelluláris vezikulák (EV) vizsgálatával foglalkozó tudományterület az egyik legdinamikusabban fejlődő terület az orvos-biológiai alap és alkalmazott kutatások terén. A megjelenő publikációk száma a 2000-es évek elejétől kezdve exponenciálisan nő, a tudományterület robbanásszerűen fejlődik, ugyanakkor az EV-k mennyiségének standardizálására használt módszerek az egyre növekvő kutatói és diagnosztikai igényeket nem elégítik ki.

A leggyakrabban használt módszerek nem tudják megkülönböztetni a fehérje aggregátumokat az EV-ktől, vagy a mérések nagyon költségesek és nagyműszert igényelnek. Az EV-k lipid tartalmának mérése kézenfekvő megoldásnak tűnik az EV-k standardizálására, hiszen minden EV foszfolipid kettősmembránnal határolt képződmény. Azok lipid tartalma egyenes arányban van a vezikulák felületével és mérettartományon belül azok mennyiségével.

Az EV-k lipid tartalmát fehérje/lipid arányát leggyakrabban infravörös spektroszkópia vagy tömegspektroszkópia alapján határozzák meg. Ezek az eszközök egy rutin biológiai labor számára nem vagy csak nehezen érhetőek el. Nemrégiben kolorimetriás, szulfofoszfovanillin (SPV) alapú meghatározási módszert fejlesztettünk ki, mely megbízhatóan alkalmazható EV-k lipid tartalmának meghatározására 0,5-5 µg lipid tartományban. Az érzékenység további növelése fluoreszcens mérésekkel tűnik lehetségesnek.

A lipofil fluoreszcens festékek micellaképző tulajdonsága miatt nem, vagy csak korlátozottan használhatók EV-k lipid tartalmának meghatározására. A jelölt EV-k és a festék aggregátumok nehezen, pl. gradiens ultracentrifugálás segítségével választhatók el. Egyes lipofil fluoreszcens festékek micellái ugyanakkor önmaguk fluoreszcenciáját kioltják. A festék aggregátumok nem, csak a biológiai membránba beépült molekulák fluoreszkálnak. Ilyen fluoreszcens festékeket teszteltünk EV-k lipid tartalmának meghatározására. Az alkalmazott fluoreszcens festékek segítségével sikerült egy nagyságrenddel megnövelnünk az EV-k lipid tartalmának meghatározási tartományát. A fluoreszcens módszerrel kb. 0.05-1 µg lipid, míg a SPV alapú módszerrel 0.5-30 µg lipid mérhető megbízhatóan.

EV: extracelluláris vezikula

SPV: szulfofoszfovanillin

AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX VÁLTOZÁSÁNAK HATÁSA A PANCREAS DUCTALIS
ADENOKARCINOMA ORGANOIDOKRA

Wiener Zoltán¹, Soós András Áron¹, Szabó Dániel Márk¹, Zeöld Anikó¹

¹Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Molekuláris Onkobiológiai Kutatócsoport

A pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) a rákos megbetegedésekkel kapcsolatos halálesetek egyik vezető oka. Az alacsony (<8%) ötéves túlélési arányt a késői diagnózis és a kezelések gyenge hatékonysága magyarázza. A betegekből származó organoidok megtartják a kiindulási szövetre jellemző sejtes heterogenitást, mely különösen fontos a genetikailag változatos PDAC esetében. Így az organoidok az egyik legmodernebb modellt biztosítják a humán tumorok tanulmányozására. Az extracelluláris vezikulák (EV) membránnal körülvett vezikulák, melyek cargo-ja fontos szerepet játszik az intercelluláris kommunikációban. Mivel a PDAC progressziója során a kollagén feldúsul az extracelluláris mátrixban (ECM), így a kollagén I hatását vizsgáltuk a PDAC organoidok i) génexpressziójára és ii) EV kibocsátására. Kollagén hatására inváziós sejtek megjelenését tapasztaltuk. Az inváziós sejtek jellemzésére olyan géneket választottunk ki, mely expressziós változása következetesen megfigyelhető volt minden organoidnál kollagénben. A PDAC organoidokból származó EV-k cargo-jának jellemzése során nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk a miRNS profilban a betegek között. Nem csak a normál hasnyálmirigy ductalis organoidokban, hanem a PDAC organoid vonalakban is megnövekedett EV-szintet detektáltunk kollagén tenyészetekben a lamininban gazdag Matrigelhez képest. A PDAC organoid eredetű EV-k azonban nem voltak hatással a tumor-asszociált fibroblasztok alpopulációira.

Eredményeink szerint az EV-k miRNS cargo-ja nagyfokú heterogenitást mutatott, és kollagén hatására megemelkedett az EV szint, mely azonban nem befolyásolta a fibroblaszt alpopulációk arányát. A kollagén hatására expressziós változást mutató gének lehetővé teszik az inváziós sejtek izolációját és további, célzott vizsgálatát.

Finanszírozás: OTKA137554 (ZW, Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal), TKP2021-EGA-24, ÚNKP Új Nemzeti Kiválósági Program (ÚNKP-21-5-SE-16, ZW, Innovációs és Technológiai Minisztérium), Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00131/20/8, Magyar Tudományos Akadémia, ZW).

COMPARISON OF BIOPHYSICAL PROPERTIES OF WILD TYPE K⁺ CHANNELS WITH A
MUTANT FOUND IN CANCER CELLS

Yen Chiao Hsin, Zoltan Petho and Zoltan Varga

In order to survive and proliferate, tumor cells adapt to their microenvironment, which may involve mutations of their various proteins, including ion channels. We have collected mutation data from public online databases containing sequences of ion channels obtained from different cancers. By aligning the sequences of related channels, we observed patterns and found the residue positions of the most frequent mutations. R367C in the voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel was one such mutation, which involves an arginine residue in the voltage-sensor of the channel. Kv1.3 is found in multiple cell types, but it most abundant in immune cells, such as lymphocytes. Our aim in the study was to characterize the biophysical properties of this mutant channel and compare it to the wild type. For this purpose, we generated the R367C mutant by site-directed mutagenesis.

We studied the channels by performing whole-cell or outside-out patch-clamp experiments on Chinese Hamster Ovary (CHO) cells transfected with the wild type or mutant channel gene, which were tagged with Green Fluorescent Protein. By using various voltage protocols, we studied the activation and inactivation kinetics and voltage sensitivity of the channels. Our results indicate that the mutation significantly slows both opening kinetics and inactivation kinetics by acting on the voltage-sensor domain.

We hypothesize that tumor cells acquire ion channel mutations due to selection pressure, which ultimately affects tumor cell properties. With future experiments, we plan to investigate the pharmacology of the mutant channel and determine the functional relevance of the mutation.

PAC1 RECEPTOR ALTERATION IN AGING OF ARTICULAR CARTILAGE

Yonatan Segal¹

Anna Tóth¹, Kinga Fedor-Lénárt¹, Kálmán Rácz², Róza Zákány¹, Dóra Reglődi³, Tamás Juhász¹

¹University of Debrecen, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Debrecen, Hungary

² University of Debrecen, Department of Forensic Medicine, Debrecen, Hungary

³ University of Pécs, Department of Anatomy, PTE-MTA PACAP Research Team, Pécs, Hungary

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a multifunctional polypeptide regulating various physiological and developmental processes. PACAP is reported to prevent harmful effects of oxidative and mechanical stress in hyaline cartilage. Its most potent receptor is PAC1 which activation leads to enhanced Sox9 expression subsequently, increases the expression of collagen type II, glucose aminoglycans and aggrecan. On the other hand, no data can be found about PACAP function in human articular cartilage aging processes.

Our main goal was to follow the expression of PAC1 receptor and its downstream targets' in aging of human knee joint.

The investigation was performed on articular cartilage of human knee joints, taken from cadavers of varying ages divided into their respective decade age group (28996-2/2018/EKU). Hematoxylin-eosin, dimethyl-methylene blue and picosirius stainings were performed to investigate the morphology, the extracellular matrix components and the thickness of articular cartilage. Western blot and immunohistochemistry was used to follow the expression of PACAP related signalization. Our results suggest that the thickness and extracellular matrix content of articular cartilage of knee joints decreases with aging. The cartilage degeneration process most likely begins between the ages of 40 to 50. Expression of PAC1 receptor decreases in parallel with the reduction of cartilage thickness, that leads to reduced Sox9 expression subsequently with cartilage specific matrix production.

In summary we can see correlation in the reduction of cartilage thickness and quality together with PAC1 receptor expression and activity. These results may open new perspectives in regenerative cartilage medicine.

Supported by NKFIHK139396

A CIKLODEXTRINEK GÁTOLJÁK A SARS-COV-2 TŰSKEFEHÉRJE ACE2
RECEPTORHOZ TÖRTÉNŐ KÖTŐDÉSÉT ÉS FELVÉTELÉTZákány Florina¹Kurtán Kitti¹, Varga Zoltán¹, Nagy Péter¹, Panyi György¹, Kovács Tamás¹¹ Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A SARS-CoV-2 által okozott COVID-19 betegségben az első elfogadott gyógyszer a remdesivir volt, amelyet porként vagy koncentrált oldatként infúzióban alkalmaznak a klinikumban. Azonos mennyiségű remdesivir mellett mindkét formuláció jelentős mennyiségű (3-6 g) szulfobutiléter-béta-ciklodextrint tartalmaz, melynek vérbeli koncentrációja a mM-os nagyságrendet is elérheti. A SARS-CoV-2 sejtekbe történő tüskefehérje által mediált bejutásának kapui a lipidtutajok, amelyekben a tüskefehérje receptoraként szolgáló ACE2 receptor és a sejtbe jutást segítő TMPRSS2 proteáz dúsul.

A ciklodextrinek koleszterinkivonó képességük révén a tutajok roncsolásával képesek csökkenteni számos fehérje tutajbéli lokalizációját. Azt vizsgáltuk, hogy különböző CD-ek és remdesivir formulációk hogyan befolyásolják az ACE2R és a TMPRSS2 lipidtutajokkal való asszociációját, továbbá a vad típusú és a delta variánsú SARS-CoV-2 tüskefehérje ACE2R-hoz történő kötődését és sejtbe történő felvételét.

Kísérleteinket az ACE2R-t és TMPRSS2-t stabilan expresszáló HEK sejteken és Calu-3 sejteken végeztük. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy különböző ciklodextrinek és remdesivir formulációk terápiásan releváns koncentrációkban alkalmazva szignifikánsan csökkentik az ACE2R és TMPRSS2 lipidtutajokkal és egymással való kolokalizációját, míg a remdesivir önmagában nincs hatással ezekre. Áramlási citometria során a ciklodextrinek és remdesivir formulációk dóziszfüggően csökkentették a fluoreszcensen jelölt vad típusú és delta variánsú tüskefehérje ACE2R kötését, hasonlóan a tüskefehérjék felvételéhez, amelyet konfokális mikroszkópiával kvantifikáltunk.

A ciklodextrinek terápiásan releváns koncentrációban alkalmazva az ACE2R, TMPRSS2 és lipidtutajok asszociációjának csökkentése révén gátolják a különböző variánsú SARS CoV-2 tüskefehérjék ACE2R kötését és felvételét. Kétszeres ciklodextrin tartalma révén a remdesivir oldat hatékonyabban gátolja a fenti folyamatokat, ami felhívja a figyelmet a ciklodextrinek eddig kiaknázatlan terápiás potenciáljára, valamint a kétféle remdesivir formuláció esetleges in vivo hatékonyságbeli különbségeire.

ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-4-II-DE-137

Rövidítések: ACE2R: angiotenzin konvertáló enzim 2 receptor, Calu-3: humán bronchiális epitheliális sejtvonal, COVID-19: koronavírus betegség 19, HEK: humán embrionális vese sejtvonal, SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome-koronavírus 2, TMPRSS2: transzmembrán szerin proteáz 2

CERAMIDOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A $K_V1.3$ IONCSATORNA PARKINSON-KÓRRA
JELLEMZŐ FOSZFORILÁCIÓJÁBAN ÉS KAPUZÁSÁNAK MÓDOSÍTÁSÁBANZákány Florina¹Cs. Szabó Bence¹, Székelyhidi Virág¹, Nagy Péter¹, Varga Zoltán¹, Panyi György¹, Kovács Tamás¹¹Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A Parkinson-kór patomechanizmusában kulcsfontosságú a mikroglia $K_V1.3$ függő aktivációja, ami magába foglalja a $K_V1.3$ expressziójának növekedését és betegségekre jellemző foszforilációját, ezáltal a csatorna szelektív gátlása új terápiás módot jelenthet. A betegség másik jellegzetessége a membrán ceramid tartalmának növekedése, amely ceramid platformok megjelenéséhez vezet. Az, hogy a membrán ceramid tartalmának növelése hogyan befolyásolja a $K_V1.3$ membrán mikrodomének közti megoszlását, valamint a ceramid platformok eltérő membránbiofizikai és jelátviteli közegük révén hozzájárulhatnak-e a $K_V1.3$ Parkinson-kórra jellemző foszforilációjához és kapuzásának megváltozásához nem ismert.

Célunk annak vizsgálata, hogy a membrán ceramid (töltés, LPS kezelés) és glikozilceramid (töltés) szintjeit változtató kezelések hatására hogyan változik a $K_V1.3$ és $pK_V1.3$ ioncsatornák szintje és membrán mikrodomének közti laterális megoszlása, valamint a csatorna kapuzása.

Mikroglia sejteken konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy míg a glikozilceramid töltés esetén a $K_V1.3$ és a lipitujak közti kolokalizáció, addig a ceramid szintet emelő kezelések hatására a csatorna és ceramid platformok közti kolokalizáció növekedett. Áramlási citometriás mérések alapján a ceramid töltés és LPS hatására megnőtt a $pK_V1.3$ mennyisége, ami együtt járt a $pK_V1.3$ és a ceramid platformok közti kolokalizáció növekedésével, a $pK_V1.3$ és a lipitujak közti kolokalizáció változása nélkül. Kételektrodás voltage-clamp fluorimetriával kimutattuk, hogy míg a ceramid és a glikozilceramid hasonlóan módosítja a $K_V1.3$ egyensúlyi aktivációját (jobbra tolja el a G-V görbét), a ceramid a csatorna feszültség-szenzorának működését leíró F-V görbére is hasonló hatást gyakorol.

Eredményeink alapján Parkinson-kórban a ceramid szint növekedése a $K_V1.3$ -on keresztül, annak nem vezető (foszforiláció) és vezető funkcióit (kapuzás) egyaránt befolyásolva, közvetlenül hozzájárulhat a mikroglia gyulladásos citokintermeléséhez, ezáltal a neuronpusztuláshoz.

ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-4-II-DE-137, ÚNKP-21-3-I-DE-233

Rövidítések: F-V görbe: fluoreszcens jel feszültségfüggését leíró görbe, G-V görbe: egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését leíró görbe, K_V : feszültségkapuzott káliumcsatorna, LPS: lipopoliszacharid, $pK_V1.3$: Y135-ön foszforilált $K_V1.3$ ioncsatorna

A GM-CSF RECEPTOR β SORSA PATKÁNY MESOTHEL SEJTEKBEŒ GYULLADÁS
INDUKÁLTA EPITHELIÁLIS-MESENCHYMÁLIS ÁTALAKULÁS SORÁNZsiros Viktória¹, Göltl Eszter¹, Dóczy Nikolett¹, L. Kiss Anna¹¹ Semmelweis Egyetem; Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet; Budapest

Korábbi munkáink során igazoltuk, hogy a patkányok hashártyájának mesothel sejtjei Freund-adjuváns indukálta gyulladás során mesenchymális átalakuláson mennek keresztül (EMT II). Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a vérképzésben szerepet játszó, immunmodulátorként is funkcionáló GM-CSF indukál-e EMT-t mesothel sejtekben. Morfológiai és biokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a mesothel sejtek termelik a GM-CSF-et és expresszálják a jelátvitelért felelős GM-CSFR β -t. Kimutattuk, hogy a GM-CSFR β caveolák közreműködésével internalizálódik, a gyulladás korai időpontjaiban korai endoszómákba szállítódik, ahol végbemegy az EMT-hez szükséges JAK2-mediált STAT5 tirozinon való foszforilációja. A gyulladás lecsengésével a GM-CSFR β késői endoszómákban detektálható, majd ezek lizoszómákkal való fúziója során lebomlik.

A jelátviteli utak nem csak lecsengenek, hanem szabályozott mechanizmusok révén gátlódnak. Jelen munkánkban arra kerestünk választ, hogy a GM-CSFR β lizoszómális degradációját milyen molekuláris mechanizmusok szabályozzák, és expresszálódik-e a mesothel sejtekben olyan negatív regulátor, amely a GM-CSF jelátviteli útvonalainak gátlásával megfékezi az EMT-t. Ismeretes, hogy a fehérjék lebontásának szabályozásában az ubiquitin szignál kulcsfontosságú szerepet játszik, ezért immuncitokémiai és biokémiai módszerekkel tanulmányoztuk egy ubiquitin-ligáz komplex komponenseinek (SOCS1, Cullin5) expresszióját, illetve vizsgáltuk a GM-CSFR β , ubiquitin, SOCS1 és Cullin5 kolokalizációját egymással és különböző endocitotikus markerekkel (Cav-1, EEA1, Rab7, Rab11).

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a GM-CSF jelátvitel leállítását és a receptor ubiquitinilálását végző SOCS1 és Cullin5 expresszálódnak mesothel sejtekben. Az ubiquitin a gyulladás és regeneráció napjaiban az endoszómális Rab5, Rab7 markerekkel mutat erős kolokalizációt. A GM-CSFR β és az ubiquitin kolokalizációja a gyulladás 5.-8. napján a legerősebb, bizonyítva, hogy a receptor ubiquitinilálása felelős a receptor degradatív útvonalra, lizoszómákba való tereléséért, lehetővé téve a regeneráció megindulását.

Rövidítésjegyzék: EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), GM-CSFR (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor), SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling), Cav-1 (Caveolin-1), EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), Rab (Ras-related GTP-binding protein)