

# BIOKÉMIA

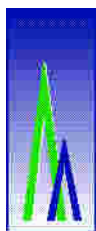
A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata  
XXXIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM 2010. augusztus



## **A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése**

*Budapest, 2010. augusztus 25 - 28.*

Helyszín: Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központ



## Thermo

SCIENTIFIC

Nagyfelbontású tömegspektrométerek  
HPLC/MS<sup>(n)</sup> és MALDI-MS<sup>(n)</sup> rendszerek a  
biokémia és proteomika számára

- UHPLC ill. analitikai HPLC-vel
- Felbontóképesség > 100.000!
- sub-ppm tömegpontosság
- nano-ESI-vel;
- ETD, HCD, CID
- MALDI ionforrással is
- FAIMS
- Fourier Transzformáció
- Több típusváltozatban is

A VILÁGSIKER:



*LTQ Orbitrap Velos: UHPLC/MS<sup>(n)</sup>*

Atlas: Általános kromatográfiás adatelemző szoftver.

Több/sok, akár különböző gyártó cégektől származó, különféle kromatográfiás technikát megtestesítő (GC, HPLC, CE, TLC, stb.) egyidejű összekapcsolása egy adatelemző rendszerbe/egy platformba.

## Kromatográfia a nano-skálán!

*EASY-nLC II asztali nano-HPLC*

### Nano HPLC

20nl/perc – 2000nl/perc!

nano HPLC kolonnák

- Fehérje/peptid tisztítás
- Mikorkolonnák
- Proteomikai adatelemző rendszer



# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata

Szerkesztőbizottság:

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

Főszerkesztő:  
Szűcs Mária

Kötetszerkesztő:  
Székács András

Technikai szerkesztő:  
Márki Árpád

XXXIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM

2010. augusztus

## TARTALOMJEGYZÉK

E0 - Plenáris előadások .....	2
DE - Díjazottak előadásai.....	2
E1 - Receptorok és kapcsolófehérjék .....	3
E2 – Molekuláris biofizika, szerkezeti biokémia .....	5
E3 – Bioinformatika, hálózatok .....	9
E4 – Molekuláris genetika – genomika .....	11
E5 – Pathobiokémia .....	13
E6 – Membráncsatornák és -transzporterek.....	16
P1 – Receptorok és kapcsolófehérjék.....	18
P2 – Molekuláris biofizika, szerkezeti biokémia .....	22
P3 – Bioinformatika, hálózatok .....	29
P4 – Molekuláris genetika – genomika .....	32
P5 – Pathobiokémia .....	40
P6 – Membráncsatornák és -transzporterek.....	45
P7 – További poszterek.....	45
A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke .....	46
Szerző szerinti mutató .....	47

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6, <http://www.mbkegy.hu/>

Felelős kiadó Dr. Fésűs László

Az engedély száma III/SZI/397/1977, HU ISSN 2060 8152 (Online)

HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)



## E0 - Plenáris előadások

### E0-01

#### **Hiszem, ha látom. Biológiai folyamatok megjelenítése és befolyásolása tervezett fluoreszcens fehérjékkel**

Balla T.

*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

A jelátviteli rendszerek jellemzése és pontosabb megismerése egyre nyilvánvalóbbá teszi, hogy a molekuláris jelkódok többsége nemcsak időben, de a sejten belüli térben is igen korlátozott. A "kompartmentalizáció" kifejezés korábban gyakran az érthetetlen jelenségek ködös magyarázatára szolgált, mára viszont olyan konkrétan is vizsgálható fogalomná vált, ami szükséges a sejten belüli szelektív jelátvitel megértéséhez. Munkacsoportunk több éve a jelátvitelben és különféle sejtbiológiai folyamatokban kulcsszerepet játszó inozitol lipidekkel foglalkozik, s ennek részeként olyan módszerek kifejlesztésével, melyek lehetővé teszik ezen lipidmolekulák elhelyezkedésének és dinamikus változásainak követését élő sejtekben. Az inozitol lipidek megjelenítése mellett további célunk, hogy ezen szabályozó lipidek szintjét viszonylag gyorsan meg tudjuk változtatni mesterségesen az általunk választott különböző membránkompartmentekben, hogy aztán ezen változások következményeit tudjuk analizálni az egyes sejt-folyamatokra. Az előadásban igyekszünk átfogó képet adni azokról a módszerekről, amelyeket az utóbbi időben fejlesztettünk ki ezekre a célokra, több alapvető biológiai példát bemutatva a jelátvitel és általános sejtbiológia területéről.

### E0-02

#### **A KIBRA gén szerepe a tanulás és memória folyamataiban**

Nikolich K.

*<sup>1</sup> Stanford University Medical School, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Palo Alto, CA, USA; <sup>2</sup> Amnestix Inc., Burlingame, CA, USA*

A KIBRA fehérje a WWC család tagja. Kódoló génje asszociációt mutatott az emberi memóriával több nagyméretű GWAS analízisben. A KIBRA gén expressziója változik előrehaladott Alzheimer-

kórban. Az előadásban összefoglalom a genetikai és funkcionális adatokat, amelyek arra utalnak, hogy a KIBRA fehérje alapvető szerepet játszik a neuronális folyamatokban, amelyek a memória konszolidációjában részt vesznek. Továbbá bemutatom, hogy a KIBRA gén neuronokban milyen szerepet játszik, és milyen terápiás stratégiákat lehet figyelembe venni az adott mechanizmusok alapján.

### E0-03

#### **Transcription regulation in liver**

A. Tatarakis, T. Margaritis, C. P. Martinez-Jimenez, A. Kouskouti, W. S. Mohan II, A. Haroniti, L. Tora, I. Talianidis

*Biomedical Sciences Research Center, Vari, Greece*

Accurate and efficient transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase II requires the combined activities of several protein complexes assembled at promoter regions. These include sequence-specific DNA-binding proteins, general transcription factors TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH, the Mediator complex and different coactivators. To better understand the function of the core transcription machinery in the regulation of tissue-specific genes during development, we studied animal models in which TAF10, a key component of TFIID, was conditionally inactivated in embryonic or adult liver. We found that hepatocyte-specific inactivation of TAF10 leads to the dissociation of TFIID into individual components and to the downregulation of most hepatocyte-specific genes during embryonic life, with parallel defects in liver organogenesis. In contrast, transcription of the majority of the genes in the adult liver was not affected by TAF10 inactivation and TFIID disassembly. Our results suggest that after the initial activation of genes, TFIID is dispensable for ongoing transcription and that in addition to its pivotal role in the initial activation of hepatic genes, TFIID is also required for the developmental stage-specific repression of previously active genes. These data suggest that TFIID actively participates in the regulation of the temporal pattern of gene expression during liver development.

## DE - Díjazottak előadásai

### **A Bio-Science-díj nyertesének előadása**

#### **DE-01**

#### **Egy jelátviteli szfingolipid kalmodulinhoz való kötődése: a lipid-fehérje kölcsönhatások új aspektusai**

Kovács E.

*MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest*

A lipid-fehérje-kölcsönhatások alapvető szignáltranszdukciós folyamatokban játszanak szerepet, így mechanisztikus megértésük biológiai jelentősége óriási, de technikai nehézségek miatt ritkán nyílik lehetőség részletes szerkezeti jellemzésükre. A szfingozil-foszforilkolin (SPC) számos jelátviteli

útvonal mediátora, külön érdekessége, hogy elsődleges és másodlagos hírvivőként is viselkedhet. Míg sejt felszíni G-fehérje-kapcsolt receptorokat aktiváló hatása alaposan leírt, sejten belüli célfehérjéről nem sokat tudunk. Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy az SPC szelektíven kötődik a kalmodulinhoz (CaM), az általános intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szenzorhoz, és gátolja annak aktivitását. Eredményeink alapján az SPC az első biológiai-  
lag releváns CaM-inhibitor, és feltételezhető, hogy a Ca<sup>2+</sup>-szenzor a másodlagos hírvivő szfingolipid intracelluláris receptora. Előadásomban bemutatom a kölcsönhatás részletes szerkezeti és biofizi-

kai jellemzését, amely számos érdekességet elárul a lipid-fehérje-kölcsönhatások változatosságáról. Meghatároztuk a CaM-SPC komplex 1,6 Å felbontású röntgenszerkezetét: a fehérje a CaM-célpeptid-komplexekre jellemző zárt konformációt vesz fel. A mi szerkezetünkben azonban négy SPC-molekula foglalja el a CaM hidrofób kötőcsatornáját, amely magyarázza a funkcionális mérésekben tapasztalt kompetitív gátlást. ITC, dinamikus fényszórás, ANS-fluoreszcencia és *stopped-flow* adatok alapján felállítottunk egy kétlépcsős sztöchiometriafüggetlenségű kötődési modellt: a CaM alacsony fehérje-lipid-

arányánál a micellákhoz kötődik, míg magas arányánál magába zár néhány SPC-molekulát, felvéve a kristályban látott szerkezetet. Kimutattuk, hogy a kölcsönhatás létrejöhet összetett lipid- és fehérje-környezetekben is, így valószínű, hogy a CaM fiziológiai körülmények között kötődhet az SPC-hez, jelentősen befolyásolva mind a szfingolipid-, mind a  $Ca^{2+}$ -jelátviteli útvonalakat.

### Az MBKE-díj nyertesének előadása DE-02

lásd E2-02

## E1 – Receptorok és kapcsolófehérjék

### E1-01

#### Az AT1-receptor internalizáció inozitol lipidfüggésének vizsgálata emlősejtben

Várnai P.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A sejtek receptoraik internalizációjával képesek változtatni a sejt felszíni receptorszámot, ami alapvetően meghatározza egy adott ligandum iránti érzékenységüket. A G-fehérjéhez kötött receptorok esetében az internalizáció alapvető mechanizmus ismert ( $\beta$ -arresztin-kötés, a receptor eljutása a klatrinburkos vezikulába, lefűződés, korai endoszómákba kerülés), azonban a folyamat szabályozásáról ma még igen hiányos a tudásunk. Mivel az internalizáció létrejöttében fontos fehérjék többsége kötődik a sejtmembrán foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) molekuláihoz, illetve a plazmamembrán-receptorok aktiválódása gyakran jár együtt a PIP2-szint változásával, felmerült ezen lipid szabályozó szerepének lehetősége. A kérdés vizsgálatára egy olyan, munkacsoportunk által korábban kidolgozott módszert alkalmaztunk, amellyel megváltoztatható a sejtmembrán inozitol lipidtartalma. Az eljárás során rapamicin segítségével egy 5-foszfatáz aktivitású enzimet irányítunk a plazmamembránhoz, amely csökkenti ott a PIP2-szintet. Az elmúlt években fluoreszcensen jelzett  $\beta$ -arresztin2 és Rab5, illetve egy a plazmamembrán citoplazmatikus felszínéhez irányított fluoreszcens fehérje segítségével sikerült térben és időben lépéseire bontanunk a luciferázhoz kapcsolt 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT<sub>1</sub>R) internalizációját. Ehhez egyrészt konfokális mikroszkópiát, másrészt az ugyancsak molekuláris kölcsönhatások kimutatására használt biolumineszcens rezonanciaenergia-transzfer (BRET) technikát alkalmaztuk. Azt, hogy a PIP2-depléció módszer a BRET mérések során alkalmazott rendszerünkben is működőképes-e, egy a PIP2-molekulához specifikusan kötődő PH-domén segítségével ellenőriztük. A mérés során a rapamicin hozzáadását követő BRET-jelváltozás a membrán PIP2-szintjének csökkenésére utalt. Ezt követően néztük a PIP2-depléció hatását az endocitózis különböző lépéseire. Méréseinkben azt találtuk, hogy a receptor- $\beta$ -arresztin2 interakciót a lipidszint csökkentése egyik vizsgált receptor esetében sem befolyásolta, ugyanakkor jelentősen gátolta a receptorok plazmamembránról történő

lefűződését, és még nagyobb mértékben a korai endoszómába történő érkezésüket. Ezzel sikerült bizonyítanunk az AT<sub>1</sub>R internalizációjának PIP2-függését.

### E1-02

#### Pleiotróp kannabinoid interakciók hatása a receptor farmakológiájára

Szűcs M., R. Cinar

MTA SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A G-protein-kapcsolt receptorok (GPCR) más fehérjékkel kölcsönhatva olyan új funkcionális egységeket hozhatnak létre, melyeknek a ligandumkötő és jelátviteli tulajdonságai eltérnek az egyedi partnerektől. Munkánk célja, hogy a kannabinoid CB1-receptorok lehetséges interakcióit vizsgáljuk olyan GPCR-okkal, melyekkel ko-lokalizálnak és hasonló fiziológiai folyamatok szabályozásában vesznek részt. A CB1-agonista R-Win55,212-2 (WIN) nagy affinitással és hatékonysággal stimulálta a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötést patkány agyban. A GABA<sub>B</sub>-agonista baclofen és SKF97541 mikromólos potenciával, mintegy 60%-kal fokozta a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötést. A phaclofen ED<sub>50</sub>  $\approx$  1 mM potenciával gátolta a baclofen hatását hippocampus membránban. Azonban a phaclofen nM koncentrációkban szignifikánsan gátolta a WIN hatását, de  $\mu$ M szinteken nem. A GABA<sub>B</sub>-és CB1-receptorok közötti „cross-talk” sztereospecifikus, nem mutatkozott cortexben és gerincvelőben. A jelenség hátterében feltehetően allosztérikus kölcsönhatás áll. [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérleteink szerint a CB1-antagonista SR141716 (Rimonabant, Acomplia) alacsony koncentrációban antagonistaként, mikromólos koncentrációkban inverz agonistaként hat. Utóbbi, azaz az alapaktivitás gátlása detektálható vad típusú és CB1-receptorra géniütött egér cortexben, parentális *Chinese hamster ovary* (CHO) és  $\mu$ -opioid-receptorokkal stabilan transzfektált CHO (MOR-CHO) sejtekben is, ami arra utal, hogy nem CB1-receptorokon keresztül jön létre. Kimutattuk, hogy az SR141716 kompetitíven gátolta a  $\mu$ -opioid agonista DAMGO hatását MOR-CHO sejt- és egér cortex membránban, és direkt kötődik a MOR-hoz. Pertussis toxinkezelés után – ami szétkapcsolja a MOR-t a gátló Gi/o fehérjétől – megszűnt az SR141716 és a DAMGO hatása, viszont együttes jelenlétükben PTX-független új jelátviteli folyamatok indulnak be.

A tárgyalt receptor-interakciók gyökeresen módosítják a kannabinoid-ligandumok farmakológiáját, így fontos gyógyászati, gyógyszeripari jelentőséggel bírnak.

### **E1-03 Intracelluláris kis G-fehérje-aktiválódás vizsgálata az angiotenzin hatásmechanizmusában**

Balla A., Erdélyi L., Soltész-Katona E., Várnai P., Hunyady L.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A közelmúltban egyértelművé vált, hogy az 1-es típusú angiotenzin receptor ( $AT_1R$ ) kis G-fehérjék aktiválódását is okozza agonista stimulus hatása. A kis G-fehérjék (pl. Ras, Rho/Rac/cdc42) génexpressziót, aktin-citoszkeleton, vezikuláris transzportot, mikrotubulus-szerveződést regulálnak. Ezek a folyamatok alapvető szerepet játszanak vaszkuláris *remodelling* folyamatában, endotélium-diszfunkcióban, atherosclerosisban. Az angiotenzin II (AngII) hatását Ras kis G-fehérjék aktiválására biolumineszcencia-rezonancia-energiatranszferrel (BRET) vizsgáltuk élő sejtekben. Az általunk készített szondák az energiaakceptorból (eYFP), a Ras fehérjéből, illetve a Raf-1 Ras kötő doménjéből és az energiadonorból (renilla luciferáz) állnak. A szondák különböző sejtkompartimentekbe (pl. plazmamembrán különböző mikrodoménjei, endoszóma, endoplazmatikus retikulum) irányítását a citoplazmatikus konstrukció és megfelelő *target* peptidszakasz N- vagy C-terminális fúziójával értük el. A HEK293-sejtekben expresszált, a plazma-membránba targetált Ras szondák EGF-, illetve AngII-stimulusra BRET-jel-növekedést, Ras-aktiválódást mutattak. A sejtek belsejébe targetált szondák esetében a transz-Golgihoz, az endoplazmatikus retikulumhoz, illetve a mitokondrium külső membránjához targetált konstrukció mutatott Ras-aktiválódást. Különböző  $AT_1R$  konstrukciók felhasználásával (vad típus és mutánsok) megállapítottuk, hogy a Golgin és az endoplazmatikus retikulumon kapott aktiválódás a plazmamembránnal áll kapcsolatban, míg a mitokondriumok esetében az internalizált receptorok okozhatják a Ras-aktiválódást. EGF receptor kináz inhibitor alkalmazásával kimutattuk, hogy az AngII hatására bekövetkező Ras-aktiválódás nem a hagyományos útvonalon történő, ún. EGF-receptor-transzaktiváció eredménye a plazmamembránban. Eredményeink szerint ezen bioszenzorok alkalmasak növekedési faktorok, hormonok szignalizációjának vizsgálatára, illetve különböző vegyületek ezen szignalizációs jelpályákra történő farmakológiai hatásának tesztelésére élő sejtekben. A szondák targetálásával különböző intracelluláris kompartimentekben vizsgálhatjuk kis G-fehérje-jelpályák működését és különböző farmakonok hatását specifikus sejtkompartimentekben. (OTKA NNF78925; TÁMOP 4.2.2-08/1/KMR-2008-0004)

### **E1-04**

#### **Az Fc-receptorok jelátviteli folyamatainak vizsgálata primer fagocitasejtekben**

Németh T., Jakus Z., Mócsai A.  
SE, Élettani Intézet, Budapest

A világ népességének jelentős hányada szenved fertőzőes vagy autoimmun gyulladási betegségekben, melyek kialakulásában fontos szerep jut a neutrofil granulocitáknak és a felszínükön nagy számban található, az immunglobulin G (IgG) Fc-részét megkötő Fc $\gamma$ -receptoroknak. Ezen immunreceptorok jelátviteléről az adaptív immunitásban résztvevő társaikkal – a T-sejt-receptorral (TCR) vagy a B-sejt-receptorral (BCR) – ellentétben viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Az Fc $\gamma$ -receptorról induló jelpálya feltérképezéséhez genetikai megközelítéssel eltűnt transzgenikus eger-ek felhasználásával. Az immunkomplex-felszínen stimulált neutrofilek rövidtávú sejtválaszaihoz elengedhetetlennek bizonyult az Fc $\gamma$ -receptorokhoz nem kovalensen kapcsolódó homodimer, transzmembrán Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ), ennek a molekulának az intracelluláris régiójában található immunreceptor tirozinalapú aktivációs motívum (ITAM) két tirozinja és az ezen foszfortirozinokhoz kapcsolódni képes, a BCR-jelátvitelben elengedhetetlen, SH2-doménnal rendelkező Syk tirozin kináz. A hosszútávú válaszokhoz ezeken kívül az egyéb immunreceptorok által az NF $\kappa$ B-aktivációhoz vezető *scaffold* proteinhomológ, a CARD9 is szükséges volt, ezáltal is igazolva, hogy az Fc $\gamma$ -receptorok a többi immunreceptorhoz hasonló jelpályamolekulákat használnak. Az autoimmun ízületi gyulladások közé tartozó, részben neutrofil granulociták mediálta K/BxN szérumtranszfer arthritis segítségével olyan fontos betegségek modellezhetőek, mint a humán népesség tekintélyes hányadát érintő rheumatoid arthritis. *In vivo* kísérleteink során az *in vitro* adatoknak megfelelően építettünk fel egy Fc-receptor  $\gamma$ -lánc-Syk jelátviteli tengelyt, melyet egy CARD9-függő és -független jelpályára osztottunk. A fagocita-sejtek Fc $\gamma$ -receptoráról induló jelpályában résztvevő molekulák feltérképezése hozzásegít minket a gyulladási folyamatok pontosabb megértéséhez, és támadáspontját képezhetik a fent említett betegségek farmakológiai kontrolljának a jövőben.

### **E1-05**

#### **Apoptotikus sejtek fagocitózisa glükokortikoid hatására történő növekedésének molekuláris mechanizmusa humán dendritikus sejtekben**

Hodrea J., Majai Gy., Zahuczky G., Nagy J., Fésüs L.

DE, OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, BMBI MTA Apoptózis és Genomika Kutatócsoport, Debrecen

A glükokortikoidok erős gyulladáscsökkentő hatása annak köszönhető, hogy gátolják mind a gyulladási citokinek termelését, mind a gyulladási sejtek vándorlását és válaszadó képességét. A szintetikus glükokortikoiddal, dexametazonnal (Dex)

való kezelés a humán makrofágokban fenotípusos változásokat eredményez, valamint megnöveli az apoptotikus sejtfevételt. Kísérleteinkben a dexametazon humán éretlen dendritikus sejtek (iDC) fagocitózisára gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az apopto-fagocita rendszer szabályozásában résztvevő, általunk kiválasztott 95 gén Dex okozta kifejeződésének változását Taqman *Low Density Array* technikával vizsgáltuk. A kezelés hatására más gének mellett a TG2 (amely egyik közvetítője a fagocitózisnak) expressziója csökkent. Számos fagocitózisreceptor, így a MERTK, CD14, sejtfelszíni molekulák (ADORA3), jelátvitelben szerepet játszó (ALOX5) vagy egyéb molekulák, mint a C1QA vagy DNASE2 indukálódott. A CD1a+ sejtek száma csökkent. Antitestekkel, adenozinreceptor A3 agonistával és antagonistával vizsgáltuk a felszíni molekulák kifejeződésének jelentőségét a Dex hatásában. Az eredmények arra utalnak, hogy a glükokortikoidhatás több apopto-fagocitózis-útvonal aktiválódását eredményezi, amelyek közül egyik sem kizárólagosan meghatározó.

#### E1-06

##### **A JIP1 állványfehérje interakcióinak vizsgálata**

Gógl G., Varga J., Alexa A., Reményi A.  
*ELTE, Biokémiai Tanszék, Budapest*

A mitogénaktivált protein kináz (MAPK) kaszkád folyamat erősen konzervált eukarióta jelátviteli rend-

szer, amely extra- és intracelluláris jeleket továbbít a sejtmembrántól a sejtmag felé három, egymást foszforilációval aktiváló kinázból álló kaszkád segítségével (MAP3K – MAPKK – MAPK). A kaszkád három szintjéről származó kinázok jelátviteli modulokba szerveződnek, specifikus dokkoló motívumokat használva, ám a modulok szerveződésében az utóbbi évtized kutatási eredményei szerint meghatározó szerepe van az állványfehérjéknek is, amelyek képesek felszínükön megkötni a kaszkád elemeit, funkcionális modulokba szervezve azokat, így befolyásolva működésüket. A JIP1-et korábban már az egyik fő MAPK út, a JNK útvonal egyik állványfehérjeként azonosították. Ez a moduláris felépítésű fehérje több fehérjeinterakciós doménnal is rendelkezik, és bizonyítottan köti az MLK3-at a MAP3K, az MKK7-et, a MAPKK és a JNK-t, a MAPK enzimek közül. Mindeztidáig a JIP1 interakcióit többségében *in vivo* körülmények közt vizsgálták, ahol a konkrét interakciós felszíneket nem lehet meghatározni. Vizsgálataink során *in vitro* térképeztük fel a JIP1 funkcionális alegységei és a kaszkád elemei közti interakciókat *GST-pull down* kísérletekkel, melyekhez rekombináns, tisztított fehérjéket használtunk. Eddig sikeresen megtaláltunk több olyan régiót, mely képes a kaszkád több elemét külön-külön megkötni, ezáltal magasabb rendű szerzesi funkcióval rendelkezhet. Célunk ezen interakciók tisztázása és jellemzése további módszerekkel, majd a komplexek szerkezetének meghatározása.

## **E2 – Molekuláris biofizika, szerkezeti biokémia**

#### E2-01

##### **Mechanistic evidence from the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component**

F. Jordan  
*Department of Chemistry, Rutgers University, Newark, USA*

The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex converts the glycolytic product pyruvic acid to acetylcoenzyme A, needed for the citric acid cycle. The complex from *Escherichia coli* has three components, a thiamin diphosphate-dependent E1 to decarboxylate pyruvic acid and to reductively acetylate the lipoylamide of the E2 components, the latter component then generates acetylcoenzyme A, while the flavin-dependent E3 component regenerates the oxidized form of E2 and produces NADH. In the x-ray structure of the *E. coli* E1 component there are three regions (the amino-terminal 1-55 stretch of amino acids, the inner active center loop, 401-413, and the outer active center loop, 541-557) not seen among the 886 residues by virtue of their high mobility. But, the two active center loops are indeed seen in the presence of a pre-decarboxylation intermediate. The dramatic consequence of the presence of the pre-decarboxylation intermediate on loop organization was also underlined by sequence specific assignment of some NMR resonances pertinent to certain

residues in the two loops. Experimental evidence regarding the function of these two mobile loops includes: (1) they control substrate access to the active center; (2) they control the rate of formation of the pre-decarboxylation intermediate; (3) they control the rate of reductive acetylation of the E2 component by the E1 component and pyruvate; (4) the rate of loop movement is very similar to the turnover number estimated for the E1-specific reaction. The evidence suggests that dynamics and catalysis are linked in this important enzyme. (NIH grant GM-50380)

#### E2-02

##### **A szubsztrátindukált oligomerizáció szerepe a humán Bloom-szindróma DNS helikáz (BLM) működésében**

Gyimesi M.<sup>1</sup>, R. H. J. Pires<sup>2</sup>, Sarlós K.<sup>1</sup>, Módos K.<sup>2</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>2</sup>, Kovács M.<sup>1</sup>

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

A genom karbantartásában nélkülözhetetlen szerepet játszó RecQ DNS-helikázok működésük során különféle fokú oligomerizációt mutatnak. Feltételezések szerint az alapvető mechanokémiai aktivitások (ATP-hidrolízis, egyszálú DNS mentén történő transzlokáció, szálszétválasztás) ellátására elegendő a helikázok monomer, illetve dimer formája, de a specializált funkciók (szálanellátás, Holliday-

szerkezetek vándoroltatása, D-hurok-szerkezetek szétbontása) már magasabb rendű oligomerizációt igényelnek. Azonban a humán BLM helikázról elektronmikroszkópos és gél-sűrűs-kromatográfias eljárások alapján azt feltételezik, hogy szubsztrátok hiányában is multimer (tetra- illetve hexamer) formában található. Célunk a különböző szubsztrátok jelenlétében pontosan meghatározni a BLM negyedleges szerkezetét, hogy ezáltal jobban megérthessük annak mechanizmusát, miként szabályozódik az átkapcsolás a különböző oligomer formák között. Ehhez tiszta formában, biokémiai vizsgálatokhoz elegendő mennyiségben előállítottuk a BLM teljes hosszúságú formáját. Egyensúlyi állapotú és gyorskinetikai vizsgálatunkban megállapítottuk, hogy a BLM egyszálú DNS szubsztrát jelenlétében monomerként funkcionál. Dinamikusan mérésünk megerősítették, hogy DNS nélkül, illetve egyszálú DNS jelenlétében jelentős mértékű monomerfrakció van jelen az ATP hidrolízis során, bár apo állapotban valóban megfigyelhető a multimer formák széles spektruma. Pásztázó atomerő-mikroszkópos analízis segítségével egyedi molekuláris szinten is kimutattuk, hogy az ATP hidrolízise a monomerforma dominanciáját idézi elő. Vizsgáljuk továbbá, hogy az *in vivo* szubsztrátként előforduló komplex DNS szerkezetek (pl. D-hurok) milyen hatással vannak az oligomerizáció fokára. Vizsgálataink fényt derítenek arra, hogy mely biológiai funkciók ellátásához nélkülözhetetlen a BLM oligomerizációja, és ebben mely biokémiai sajátságok játszanak kulcsszerepet.

### E2-03

#### Minifehérjék a cukorbetegség gyógyításában

Perczel A.<sup>1</sup>, Rovó P.<sup>1</sup>, Farkas V.<sup>2</sup>, Stráner P.<sup>1</sup>, Tóth G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium, <sup>2</sup> MTA-ELTE, Fehérjemodellező Kutatócsoport Budapest

Az exendin-4 (Ex-4) 39 aminosavból felépülő minifehérje, melyet korábban a viperagyík (*Heloderma suspectum*) nyálából izoláltak. Ez a fehérje hasonló receptorkötő tulajdonsággal rendelkezik, mint a humán glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) inkretin hormon. A GLP-1 receptorhoz való kötődés során mindkét fehérje (Ex-4 és GLP-1) elősegíti a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiből az inzulinszekréciót, így közvetve hat a vércukorszintre. A GLP-1 peptidtól eltérően, az Ex-4 rezisztens a GLP-1-et bontó dipeptidil peptidáz IV (DPP IV) enzimre. Így az Ex-4 *in vivo* életideje meghosszabbodik, ezért és más kedvező tulajdonságai miatt már ma is alkalmazzák a 2-es típusú cukorbetegség gyógyszereként. Munkánk során szerkezeti (ECD, NMR) és dinamikai (NMR) méréseket végeztünk az Ex-4 fehérjén. Csonkítás- és mutációkkal előállítottunk, szerkezeteikben optimált új Trp-kalitka minifehérjéket. Megállapítottuk, hogy a Trp-kalitka „foldamer” egy olyan ideális „C-cap” térszerkezeti elem, amely az  $\alpha$ -hélixek hőstabilitását általában is megnövelheti. Az Ex-4 elem elvben bármely esetben megnövekedett stabilitását ezen az alapon meg tudtuk magyarázni.

Éppen ezért olyan variánsokat terveztünk, amelyek N-terminálisukban az Ex-4, míg C-terminálisukon a megfelelő „C-cap” alkotóit tartalmazzák. Ezek a kimérák jóval stabilabbnak bizonyultak, mint a kiindulási Ex-4-molekula. Ezt követő célunk az volt, hogy teszteljük ezen fehérjék GLP-1 receptorhoz való kötődését *in vitro* assay és NMR-mérések segítségével. Tervezzük továbbá, hogy a ligandum stabilitása (és dinamikája), valamint a receptorkötő affinitás közötti korrelációt vizsgáljuk, és így ki tudjuk választani azt a legjobban kötődő minifehérjét, amely még hatékonyabb biológiai választ eredményezhet.

### E2-04

#### Amiloid és natív szerkezet egymásba alakulásának vizsgálata élesztő foszfoglicerát kináz modellfehérjén

Osváth Sz.

SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

Mintegy húsz olyan betegség ismert, amelyeknél natív állapotukban globuláris fehérjék amiloid plakkokban rakódnak le szövetelhalást okozva. Az amiloid szerkezet egy több lépésből álló aggregációs kaskád végterméke. A kialakult amiloid inert lerakódás, de a felé vezető úton képződő oligomerek a sejtek membránjához kapcsolódva citotoxikus hatást fejtenek ki. A háttérben álló molekuláris mechanizmusok kevésbé ismertek. Keveset tudunk arról, hogy mely tényezők döntenek el, hogy egy fehérje az amiloidképződés vagy a natív szerkezetbe gombolyodás útvonalát követi. Még ennél is kevesebbet tudunk arról, hogy a már kialakult amiloidokból visszaalakulhat-e a biológiailag aktív szerkezet. Kísérleteinkben kitekert fehérjéből kiindulva gyors keveréssel inicializáltuk kompakt szerkezetek kialakulását. A pH változtatásával folytonosan hangoltuk a folyamatot a helyes gombolyodás és az amiloidképződés között. Minden pH-n azt tapasztaltuk, hogy néhány másodperc alatt kialakult egy olvadt gombóc köztes állapot. A helyes gombolyodás és az amiloidképződés útvonala itt azonban elvált egymástól. A pH segítségével a natívtól az amiloidképződés felé hangolva a fehérjét a natív szerkezet destabilizálódik, és kinetikailag is nehezebben elérhetővé válik. Eközben épp a fordított folyamat játszódik le az amiloid szerkezet felé vezető útvonalon: az amiloid egyre stabilabbá válik, miközben egyre könnyebben elérhető. A natív és az amiloid szerkezet egymásba alakulását vizsgálva azt kaptuk, hogy az amiloid fibrillumokból visszanyerhető a biológiailag aktív fehérje. Az aktív fehérje sikeres helyreállításához először destabilizálni kell az aggregált formát, és csak ezután lehet stabilizálni a natív szerkezetet. (ETT 528/2006 és a MTA BO/00468/09 Bolyai János Kutatási Ösztöndíj)



## E2-05

### Molekulárisan rendezett szerkezetek anizotróp tulajdonságainak feltérképezése differenciál-polarizációs mikroszkópiai mód-szerekkel

Steinbach G.<sup>1</sup>, Pomozi I.<sup>1,2</sup>, A. Zupcanova<sup>3</sup>, Szabó M.<sup>1</sup>, Buza Á.<sup>1</sup>, Jánosa D. P.<sup>1</sup>, Horváth V. G.<sup>1</sup>, Makovitzky J.<sup>4</sup>, S. Balaban<sup>5</sup>, Garab Gy.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged;

<sup>2</sup> Pi Vision Bt., Budapest; <sup>3</sup> Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove Hradý, Czech Republic; <sup>4</sup> Department of Neuropathology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; <sup>5</sup> Institute for Nanotechnology, Karlsruhe Institute of Technology, Forschungszentrum Karlsruhe, Germany

Az MTA Szegedi Biológiai Központban az elmúlt évek során egy új mikroszkópos leképezési módszert fejlesztettünk ki azzal a céllal, hogy rendezett szerkezetű biológiai minták főbb polarizációs optikai anizotrópiás sajátosságait megmérjük és ezek térbeli eloszlását megjelenítsük. Ezek meghatározása sok esetben csak mikroszkóp-technikákkal lehetséges. A megépített berendezés, a differenciálpolarizációs lézersugár-pásztázó mikroszkóp (DP-LSM), lehetővé teszi a fő DP mennyiségek gyors és nagy pontosságú kép-pontkénti mérését és így az anizotrópia 2D és 3D feltérképezését. A vizsgált minták között található sejtfal- és sejtmembrán-vizsgálókat, mesterséges és természetes fénybegyűjtő antenna-rendszereket, proteinaggregátumokat, aktin alapú struktúrákat és folyadékkristályokat. Az előadás három kutatási témából nyújt ízelítőt: 1) Az éghajlatváltozás és a globális felmelegedés következtében egyre fontosabb annak felderítése, miként fokozható a növények szárazságtűrése. Számos adat utal arra, hogy ez nagymértékben függ a sejtfal szerkezetétől, illetve a cellulózszerkezet ozmotikus stresszre adott válaszreakciójától. DP-LSM leképezéssel nyomon követtük a fokozatosan növelt ozmotikus stresszhatáshoz adaptálódott és az azt hirtelen elszenvedő, adaptálódni nem képes UNGGI-9 japonika rizsszuspenzió a sejt-fal szerkezetében bekövetkező változásokat. Ezek az eredmények más vonatkozásban, pl. a cellulóz lebontásában és energetikai felhasználása területén is felhasználhatók. 2) Amiloidfilamentumokból összeállt, hierarchikusan rendezett fehérje-aggregátumok számos neurodegeneratív betegségért felelősek. Konfokális DP-LSM leképezéssel sikerült feltérképezni a kongóvörössel megfestett izolált humán amiloidszálak makroszerveződését: a homogén eloszlású fluoreszcenciaintenzitás-képekkel ellentétben a DP képek erős anizotrópiájú, lokálisan előjelet váltó inhomogenitásokat mutattak. Ezzel a leképezéssel feltártuk, hogy ezek  $\mu\text{m}$  méretű peridikus struktúrákból származnak, amelyek valószínűleg a korábban kb. 100 nm-es skálán azonosított helikális szerkezetek szuprarendeződésének és feltekeredésének, tulajdoníthatók. 3) A növények hatékony fotoszintézisét lehetővé tevő fénybegyűjtő pigment-protein komplexek szerkezete a fényenergia mesterséges felhasználásához is iránymutató.

Olyan, lehetőleg fotostabil molekulára van szükség, amely önszerveződő módon képes a fénybegyűjtő antennarendszert kialakítani. Az esetleges rendezett szerkezet elemzéséhez és ellenőrzéséhez a DP-mikroszkópia jól illeszkedő eszköz: a – vizsgált esetben kialakult – makroaggregátum-rodok pár mikronos mérete jól illeszkedik a DP-LSM feloldóképességéhez; segítségével kimutattuk a kialakult struktúra erősen anizotróp jellegét, és meghatároztuk a porfirin-molekulák orientációját. A DP mikroszkópia – más módszerekkel nem kinyerhető kvantitatív információt szolgáltatva az anizotrop molekuláris felépítésről, valamint a polarizált fény és a vizsgált minta kölcsönhatásairól – segíti a magasan szervezett rendszerek molekuláris szerkezetének feltárását.

## E2-06

### Polimerizációra képes GFP-variáns előállítás

Vonderviszt F.

Pannon Egyetem, MÜKKI, Bio-Nanorendszerek Laboratórium, Veszprém

A bakteriális flagellumok helikális filamentumai a flagellin (FliC) fehérje több ezer példányából épülnek fel. A filamentáris szerkezet létrehozásában a flagellin terminális régiói vesznek részt. Az aminosavszekvencia középső szegmense által kialakított hipervariábilis D3 domén a filamentumok felületén helyezkedik el, helyére a polimerizációs képesség megzavarása nélkül más fehérjék jó eséllyel beépíthetők. Munkánk során egy olyan fúziós fehérjét állítottunk elő, amelyben a belső fluoreszcenciára képes zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) ültettük be a flagellinfehérje centrális D3 doménjének helyére. Kísérleteinkben a GFP szuperstabil variánsát (sfGFP) használtuk, amely különösen előnyös feltekeredési képességekkel rendelkezik. Az *Escherichia coli* sejtekben túlexpresszált FliC-sfGFP fúziós fehérjét tisztítottuk, spektrális és polimerizációs tulajdonságait jellemeztük. A fluoreszcens tulajdonságok vizsgálata megmutatta, hogy az sfGFP fehérje a flagellinbe illesztve is ki tudja alakítani natív térszerkezetét. A FliC-sfGFP alegységek képesnek bizonyultak filamentáris szerkezetek kialakítására is. Sikerrel állítottunk tehát elő egy olyan GFP-variánst, amelyet filamentáris nanostruktúráinkba beépítve lehetővé válik azok egyszerű nyomon követhetősége és detektálása.

## E2-07

### Makromolekuláris felismerés szabályozása sejtciklusfüggő foszforilációval a humán dUTPáz sejtmagi transzportja során

Róna G.

MTA SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

Az eukarióták genetikai állományukat külön kompartmentumba különítik el, és így egy térben és időben rendkívül hatásos szabályozási lehetőséghez jutnak. A  $>40$  kDa makromolekulák magi transzportjéért azok nukleáris lokalizációs szignálja (NLS) felelős. A humán dUTPáz domináns izoformája jellegzetes NLS-t hordoz. A dUTPáz működése elengedhetetlen a genomi in-

tegritás megőrzéséhez; hiányában nagymennyiségű uracil épül a DNS-be, ami apoptózishoz vezet. Osztódó sejtekben az enzim zömében foszforilált formában található, ám ezen módosítás funkciója ismeretlen volt. A foszforilációs hely a fehérje NLS-ének közvetlen szomszédságában található, és a CDK1 kináz konszenzus foszforilációs motívumába esik. Bizonyítottuk, hogy ez a foszforiláció kihat a dUTPáz intracelluláris lokalizációjára: az NLS mellett foszforilált fehérjét mimikáló mutáns kireked a sejtmagból. A vad típusú enzim, egy hiperfoszforilációt, valamint egy hipofoszforilációt mimikáló mutáns forma magi akkumulációjának dinamikáit videomikroszkópos kísérletekkel hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy az utódsejtekbe jutó foszforilált dUTPáz *pool* a sejtciklus előrehaladtával, valószínűleg defoszforilációt követően újra akkumulálódhat a magban, de ez a folyamat lassú. A hipofoszforilációt mimikáló mutáns az utódsejtben sokkal gyorsabban jut be újra a magba. A dUTPáz és az importin rendszer kölcsönhatását *in vitro* kötődésvizsgálatokkal igyekszünk jellemezni. A komplexképződést a fenti mutációk jellegzetesen befolyásolják, amit számos biofizikai módszerrel igazoltunk. A két fehérje kölcsönhatását és a foszforiláció hatására bekövetkező változásokat az importin- $\alpha$  és dUTPáz NLS peptidek kristály-szerkezetének tanulmányozásán keresztül próbáljuk megérteni. Vizsgálataink rámutattak, hogy a CDK1-konszenzusnak megfelelő foszforilációs pozíció számos más magi fehérje (p53, APC, ubikvitinaktiváló enzim E1) NLS-ében megtalálható. Így felmerül az azonosított sejtciklus-függő transzlokáció általános jelentősége is.

#### **E2-08 Dezmin-protofibrillumok struktúrájának és rugalmasságának atomerő-mikroszkópos vizsgálata**

Kiss B., Kellermayer M. S. Z.  
SE ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest

A dezmin, az izomszövet intermedier filamentuma feltételezett szerepet játszik a szöveti mechanikai integritás és rugalmasság fenntartásában. Bár a dezminfilamentumok rugalmasságának, valamint össze- és szétszerelődésének dinamikája, illetve a sejtek mechanikájában betöltött szerepe jelenleg élénk kutatás tárgyát képezi, sem a dezmin rugalmasságának, sem pedig a szétszerelődésének molekuláris alapjai nem ismertek pontosan. Jelen munkánkban tisztított, izolált dezminfilamentumok topografikus szerkezetét vizsgáltuk atomerő-mikroszkóppal. Kétértékű kationkelátorok (EGTA, EDTA) hozzáadása esetén a már polimerizálódott dezminfilamentumok órák, illetve napok alatt stabil, változó (esetenként mikrométeres) kontúrhoszszú, sima felszínű és egységes vastagságú fibrilláris struktúrára bomlottak szét, melyeket a fenti paraméterek alapján protofibrillumokként azonosítottunk. A rugalmas dezmin-protofibrillumok csillámfelszínen vizsgált geometriai orientációeloszlásából számított átlagos perzisztenciahossza 51,5 nm-

nek adódott, becsült Young-modulusuk átlaga pedig 10,6 MPa, mely jelentősen meghaladja az érett filamentumok rugalmassági modulusát (3,7 MPa). Fentiek tükrében a dezminfilamentumon belül a protofilamentumok kötegekbe rendeződése a hosszirányú erőkkel szemben nagy szakítószilárdságot biztosít, míg laterális irányú erőhatásokra a filamentum rugalmasan viselkedik. A protofilamentumok megfigyelt stabilitása alapján a dezmin szétszerelődése vélhetően a polimerizáció lépéseitől eltérő módon zajlik.

#### **E2-09 A komplementrendszer lektinútvonalának szelektív gátlása irányított evolúcióval kifejlesztett peptidinhibitorokkal**

Héja D.<sup>1</sup>, Kocsis A.<sup>2</sup>, Dobó J.<sup>2</sup>, Szász R.<sup>3</sup>, Kékesi A. K.<sup>4</sup>; Závodszy P.<sup>2</sup>, Gál P.<sup>2</sup>, Pál G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; <sup>3</sup> DE OEC, ÁOK, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Debrecen; <sup>4</sup> ELTE, Biológiai Intézet, Proteomikai Kutatócsoport, Budapest

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer alapvető eleme, amely három különböző útvonalon, a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalon keresztül aktiválódik. Az egyes útvonalak eltérő biológiai szerepének tisztázásához útvonal-szelektív inhibitorokra van szükség. A lektin út esetében sikerült kifejlesztenünk az első útvonal-szelektív gátlószereket az alábbiak szerint. A lektin útvonalban szerepet játszó MASP-1 és MASP-2 enzimek ellen fág-bemutatáson alapuló irányított evolúcióval peptid inhibitorokat fejlesztettünk. A fág-peptid könyvtárak előállításához két eltérő inhibitor vázból indultunk ki. A szelektált szekvenciák alapján számos peptidet állítottunk elő, amelyeket részletesen jellemeztünk. Mind a MASP-1, mind pedig a MASP-2 enzim ellen sikerült specifikus inhibitorokat kifejlesztenünk. A MASP-2 enzimről eddig is ismert volt, hogy rendelkezik mindazon aktivitásokkal (önaktiválódás, C2 és C4 hasítás), amelyek a lektin út beindításához szükségesek. Ezek alapján nem meglepő, hogy a MASP-2 szelektív inhibitoraink képesek tökéletesen meggátolni a lektin út aktiválódását. A MASP-1 enzim szerepe jelenleg is vitatott. A lektin út beindításához szükséges aktivitásoknak csak egy részével (önaktiválódás és C2 hasítás) rendelkezik, ezért széles körben elfogadott, hogy az útvonal aktiválódásában pusztán kisegítő szerepe van. Ezzel szemben mi azt tapasztaltuk, hogy a MASP-1 specifikus inhibitorok is tökéletesen meggátolják a lektin útvonal aktiválódását. Egy többféle funkcionális tesztet kombináló vizsgálatsorozatunk eredményei arra utalnak, hogy a MASP-1 kulcsszerepet tölt be a lektin út aktiválódásának kezdeti szakaszában azáltal, hogy aktiválja a MASP-2 zimogént. A lektin út aktiválódása szerepet játszik olyan életveszélyes folyamatok lezajlásában, mint a szívrohamot követő tömeges szívizompusztulás. Ezért alapvető jelentőségük mellett ezek az inhibitorok lektin útvonalat blokkoló terápiás szerek kifejlesztésének fontos kiindulópontjai is lehetnek.

## E2-10

### Exosite kölcsönhatások szerepe a MASP-2 autoaktivációjában

Harmat V.<sup>1</sup>, Kocsis A.<sup>2</sup>, Szilágyi K.<sup>2</sup>, Fodor K.<sup>3</sup>, Závodszy P.<sup>2</sup>, Gál P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Labor, Budapest; <sup>2</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest; <sup>3</sup> EMBL, Hamburg, Germany

A manózkötő lektinasszociált szerin proteáz 2 (MASP-2) a komplementaktiválás lektinútja során a C3-konvertázt generálja, ezért a lektinút kulcsenzimének tekinthető. Egy MASP-2-dimer tölti be a MBL-MASP komplexben mindazokat a funkciókat, amiket a klasszikus aktiválódási út C1s-C1r-C1r-C1s enzim-tetramere a C1 komplexen belül: autoaktiválódik és elhasítja a C2 és C4 fehérjét. Ez az autoaktiválódás a komplement-aktiválódási kaszkád első proteolitikus eseménye, ezért szigorúan szabályozott. A MASP-2 enzimmel homológ fel-

építésű MASP-1 és C1r szintén autoaktiválódó enzimek, ezek szabályozási mechanizmusa is hasonló lehet, mint a MASP-2 esetében. Célunk a MASP-2 és rokon enzimek nagy szubsztrátspecifitása és autoaktiválódási képessége alapjának vizsgálata atomi szinten. Meghatároztuk a MASP-2 aktív forma katalitikus fragmentumának kristályszerkezetét egy új kristályformában. A kristályban a szomszédos molekulák kontaktusai enzim-szubsztrát kölcsönhatásnak felelnek meg. A kanonikus proteáz-peptid kölcsönhatásokon kívül további, kiterjedt („exosite”) kölcsönhatások észlelhetők a két MASP-2-molekula között. Az „exosite” régiók felderítése segíthet az autoaktiválódási mechanizmusnak és a MASP-2, valamint a hozzá hasonló, a komplementaktiválás kezdeti lépéseiben részt vevő proteázok szűk szubsztrát-szelektivitásának jobb megértésében. (OTKA F67937, NK67800)

## E3 – Bioinformatika, hálózatok

### E3-01

#### Genomannotáció

Patthy L.

MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A genomannotáció – az a folyamat melynek során az egyes DNS-elemekhez biológiai információt, tudást rendelünk – először is azt igényli, hogy a genomban azonosítsunk valamennyi funkcionális szempontból fontos DNS-elemet (fehérjekódoló géneket, RNS-géneket stb.), és meghatározzuk pontos szerkezetüket. Prokarióta genomok esetén a fehérjekódoló gének szerkezetének predikciója triviális feladat, az introngazdag eukarióta genomok fehérjekódoló génjeinek predikciójára használatos bioinformatikai eszközök azonban kevésbé megbízhatóak [Harrow J, Nagy A, Reymond A, Alioto T, Patthy L, Antonarakis SE, Guigó R (2009) *Genome Biol.*, 10(1): 201.1-8]. A génpredikciós módszerek hibái következtében a szekvencia-adatbázisokat jelentős mértékben „szennyezik” hibás szekvenciák, ezért rendkívül fontos a hibás szekvenciák azonosítására alkalmas minőségellenőrző rendszerek kidolgozása. A MisPred minőségellenőrző rendszer [Nagy A, Hegyi H, Farkas K, Tordai H, Kozma E, Bányai L, Patthy L. (2008) *BMC Bioinformatics*, 9: 353.1-26] különböző eszközeinek alapja az a megfontolás, hogy azok a hipotetikus fehérjeszekvenciák, melyek megsértenek valamely, az adott fehérjecsoportra érvényes törvényszerűséget „életképtelennek” minősíthetők, valószínűvé téve, hogy a hipotetikus fehérjeszekvencia (és a megfelelő génszekvencia) téves predikció eredménye. A MisPred módszer számos minőségellenőrző eszköze például azt vizsgálja, hogy az adott fehérje képes-e eljutni abba a celluláris kompartmentbe, ahol fel tudja venni natív, stabil és funkcióképes térszerkezetét. Például: azok a fehérjék, melyek extracelluláris doméneket tartalmaznak, de hiányzanak belőlük azok a szekvenciajelek, melyek az extracelluláris doméneket az

extracelluláris térbe irányítják, nagy valószínűséggel funkcióképtelenek, és téves predikciót tükröznek. A MisPred minőségellenőrző módszer előnye, hogy nemcsak a hibás szekvenciák azonosítására alkalmas, hanem segítséget nyújt azok korrekciójára is.

### E3-02

#### Az antibiotikumrezisztencia evolúciója

Pál Cs., Papp B.

MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged

A mikroorganizmusok nagy populációjuk, magas mutációs rátájuk és rövid generációs idejük révén rendkívül gyorsan képesek alkalmazkodni a legkülönbözőbb stressz körülményekhez. Ezt a folyamatot különösen jól érzékelteti kórokozók antibiotikumokkal szembeni ellenállóképességének rendkívül gyors evolúciója. Van-e lehetőség arra, hogy ezt a folyamatot specifikus beavatkozások révén lelassítsuk? Hogyan befolyásolják különböző stresszhatások és nehézfémzennyezés az antibiotikumokkal szembeni érzékenységet? Hogyan és hány lépésben alakulhat ki rezisztencia több antibiotikummal szemben? Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához elengedhetetlen a rezisztencia kialakulását szabályozó genetikai faktorok feltérképezése. Hála a szinte teljes genetikai állományra kiterjedő *Escherichia coli* mutáns és génexpressziós könyvtárak jelenlétének, mára azonosíthatók azok a gének, amelyek nem közvetlenül az ellenállóképesség mértékét, hanem annak evolúcióját befolyásolják. Munkánk során ötvözzük a funkcionális genomika, laboratóriumi evolúciós vizsgálatok és rendszerbiológia módszertanát.

### E3-03

#### Kölcsönható rendezetlen fehérjék, a fehérje-hálózatok fontos elemei

Mészáros B., Dosztányi Zs., Simon I.

MTA SzBK Enzimológiai Intézet, Budapest

Az egy-két évtizede még ismeretlen fehérjeosztályról, a rendezetlen fehérjékről először az derült ki, hogy a törzsfajlás előrehaladásával egyre nagyobb arányban fordulnak elő a proteomokban. Később azt is kimutattuk, hogy a fehérjehálózatok csomópontjaiban ezek a fehérjék az átlagosnál gyakrabban találhatók meg. A rendezetlen fehérjeszakaszok kölcsönhatásai más fehérjével tehát fontos szerepet játszanak a fehérjehálózatok kialakításában. Ráműtöttünk, hogy a rendezetlen fehérjék és fehérjeszakaszok szekvenciából történő becslésénél használt párkölcsönhatási energia számítása, az IUPred becslő módszer algoritmusának alapja, kiválóan alkalmazható annak valószínűsítésére, hogy egy rendezetlen fehérjeszakasz mely részei alakíthatnak ki stabil kölcsönhatást rendezett fehérjékkel. Erre épül az ANCHOR becslő módszer algoritmus. A felismerésnek jelentős gyakorlati haszna is lehet például új gyógyszer-célfehérjék azonosításában.

### E3-04

#### **Kölcsönhatás-szabályozott hálózati dinamika**

Csikász-Nagy A.

*CoSBI, The Microsoft Research – University of Trento, Centre for Computational and Systems Biology, Trento, Italy*

Biológiai és egyéb hálózatok is dinamikusán változtatják kapcsoltságukat: a hálózat tagjai szeparálódhatnak, és kapcsolataik sűrűsödhetnek az idő változásával. A hálózat tagjainak egyedi kölcsönhatásai nagyban befolyásolják, hogyan változik a hálózat struktúrájának a sorsa. A játékelméleti módszereket alkalmazva vizsgáljuk, hogy a hálózat elemeinek együttműködése vagy éppen együtt nem működése hogyan hat a hálózat struktúrájának evolúciójára. Azt tapasztaljuk, hogy általánosan elterjedt kooperáció képes sűrű kapcsoltságú hálózatokat létrehozni, míg az öntörvényű egyedek terjedése a hálózat széteséséhez vezethet. Az is megfigyelhető, hogy a hálózat egészének sikeressége (átlagos fitness) a hálózat sűrűségével nő, de ugyanígy nő a hálózat szétesésének a valószínűsége is, azaz a hálózat nem tud maximális sikerességgel stabilan működni. Ezt az elméleti fejtegetést terjesztjük ki a normál és rákos sejtek közötti sejt-sejt-kapcsolatok által szabályozott szövettömegnövekedésre, és példaként említünk még egyéb, hasonlóan működő kooperáció alapuló biológiai rendszereket.

### E3-05

#### **Szabályozott fehérje-kinázok és -foszfatázok a sejtciklus során: az egyszerű hálózati motívumoktól az eukarióta sejt osztódási ciklusának a modelljéig**

Kapuy O., M. R. Domínguez-Sananes, Novák B.  
*Oxford Centre for Integrative Systems Biology, University of Oxford, UK*

A sejtosztódási ciklus működését egy komplex fehérjemolekula-hálózat irányítja. A szabályozó rendszer megértésének elengedhetetlen tartozéka,

hogy az azt felépítő egyszerű hálózati motívumok viselkedését megvizsgáljuk. A szabályozásban kiemelkedő szerepe van az egymás ellen ható fehérje-kinázoknak és -foszfatázoknak, amelyek együttesen határozzák meg a szubsztrátjaik foszforilációs állapotát. Mivel a szubsztrátok gyakran maguk is kinázok vagy foszfatázok, és vissza is hathatnak a regulátoraikra, így különböző, ún. visszacsatolási és előreccatolási hurkokat hoznak létre a szabályozási hálózatban. Egyszerű matematikai modellek segítségével és kísérleti adatok felhasználásával bemutatjuk a sejtciklus működését meghatározó szabályozási motívumokat. A kinázok között kiemelkedő szerepe van a magosztódási ciklushoz nélkülözhetetlen Cdk1/CycB (CDK) mitózis kinázoknak. A CDK aktivitása jellegzetesen változik a sejtciklus folyamán: a sejt növekedési szakaszában alacsony az értéke, a mitózisba lépve megnő, majd annak végén közel nullára esik le. Míg a mitózis kináz ellen ható fehérje-foszfatáz (PP) aktivitását a sejtciklus során sokáig állandónak hitték, addig az új kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a CDK mellett a PP aktivitása is pontosan szabályozott. Az előadásban megmutatjuk, hogy a sejtciklus ellenőrzési hálózatának középpontjában a CDK-PP antagonizmusa áll, amely motívum két alternatív egyensúlyi állapottal rendelkező rendszert hoz létre (CDK-aktív és PP-inaktív, illetve CDK-inaktív és PP-aktív állapotok). Ahhoz, hogy a hálózati rendszer az egyik stabil állapotból a másikba tudjon eljutni, egy kináz vagy egy foszfatáz tranzienst aktiválódására van szükség. A CDK-PP-antagonizmusra alapozva és további egyszerű szabályozási motívumok felhasználásával általános modellt építettünk fel, amely jól leírja az univerzális eukarióta sejt osztódási ciklusa során a mitózis CDK és az ellene ható foszfatázok kinetikai viselkedését.

### E3-06

#### **Több forrásból származó omikai adatok és információk kiértékelése hibrid tudásbázis-technológiával**

Temes G.<sup>1</sup>, Antal P.<sup>2</sup>, Falus A.<sup>1</sup>, Szalai Cs.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest

A teljes emberi géntérkép összeállításának milliárdos költségvetése óta eltelt 10 évben évente közel feleződött a genetikai mérések költsége. A nyilvánosan elérhető genetikai adatok mennyisége még ennél is gyorsabban nő, a kutatások mégsem hozták meg a várt eredményeket, a legtöbb multifaktoriális betegség genetikai hátterének alig néhány százalékát ismerjük. Az elérhető omikai tudásanyag mennyisége hasonló mértékben növekszik, egy-egy szűkebb szakterület követése is egyre komolyabb kihívás az emberi szakértők számára. A fejlődés egyik kulcsa ezen adatok és információk hatékonyabb feldolgozása, rendszerezése és értelmezése. Csoportunk olyan hibrid tudásbázis-szoftvertológia fejlesztésén dolgozik, amelyben egyesíthetőek a laboratóriumi mérések által szolgáltatott numerikus adatok, azok statisztikus

tikai kiértékelésének eredményei, valamint a szakértői háttértudás és a szakirodalom gépi elemzésével történő automatizáltan kivonatolt szemantikus információk. Kiemelt hangsúlyt kap több adatforrás együttes értelmezése. Bár elsősorban genetikai asszociációs vizsgálatok támogatása a célunk, az alkalmazott Bayes statisztikai keretrendszer lehetővé teszi különböző szabályzási szintekről érkező (DNS, RNS, proteomika, lipidomika, klinikai adatok stb.) mérési eredmények hipotézismentes, teljes modell alapú kiértékelését, legyen szó saját mérési eredményekről vagy nyilvánosan elérhető adatbázisok metaelemzéséről. A keretrendszerben adott

szakterület alapvető rendszerbiológiai ismeretanyagának manuális formalizálásával, külső tudásbázisok (pl. Gene Ontology) felhasználásával, vagy nagy mennyiségű szakszöveg automatizált kivonatolásával témaorientált tudásbázisok hozhatóak létre. A hibrid tudásbázis normatív módon kezeli az adatokból és információkból adódó bizonytalanságot, és képes orvosbiológus szakértők kérdéseire felelni, pl. melyek azok az SNP-k, amelyek legalább 10% valószínűséggel relevánsak asztma esetén, és mely asztmához még nem kapcsolt útvonalrészleten találhatóak?

## E4 – Molekuláris genetika – genomika

### E4-01

#### Az inzulinrezisztencia agyi hatásai

Sasváry-Székely M.<sup>1</sup>, Abdul Pahman, O.<sup>1</sup>, Vér Á.<sup>1</sup>, Rosta K.<sup>2</sup>, Keszler G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

A 2-es típusú diabétesz jelentős komorbiditást mutat hangulati zavarokkal és kognitív funkciócsökkenéssel, de a közös pathomechanizmus nem ismert. Néhány szakirodalmi adat arra utal, hogy a vér-agy-gáton átjutott inzulin fontos szerepet tölt be a táplálékfelvétel és a kognitív funkciók szabályzásában, az inzulinrezisztencia központi idegrendszeri hatásairól azonban keveset tudunk. Bemutatásra kerülő vizsgálatainkban patkány diabétesz-modellek agyi génexpresszió változásait vizsgáltuk 1-es típusú diabétesz modellben (DM1; streptozotocinkezelés) és a 2-es típusú diabétesz egyik fontos állatmodelljében (DM2; Goto-Kakizaki patkány). A teljes genomi expresszió-vizsgálatok jelentős eltérést mutattak a DM2 vs. kontroll összehasonlításánál, míg a DM1 vs. kontroll értékeknél alig tapasztaltunk eltérést. A DM2 modell vizsgált agyterületeiből elsősorban a prefrontális kéreg és a hippokampusz mutatott jelentős változásokat, míg a striatumban nem találtunk változást. A szignifikáns expresszió változást mutató gének útvonalelemzésre és validálásra kerültek. A valós idejű PCR módszerrel validált, eltérő expressziójú gének közül néhányánál irodalmi adatok is valószínűsítik a kettős funkciót. Közülük különösen érdekesnek tűnik a galanin emelkedett expressziós szintje a DM2 hippokampuszban. Állatkísérletekből ismert ugyanis, hogy a galanin túltermelése kognitív deficitet, fokozott táplálékfelvételt és depresszív tüneteket okoz, mely jól egyezik a humán komorbiditási ismereteinkkel. Eredményeink alapján az inzulinrezisztencia jelentős agyi expressziós változásokat okoz állatmodellben. Az eltérő expressziót mutató gének további vizsgálata hozzásegíthet a diabéteszes betegeknek gyakran előforduló depresszió rizikófaktorainak és pathomechanizmusának megismeréséhez.

### E4-02

#### A glukokortikoidok hatásmechanizmusában szerepet játszó génpolimorfizmusok és fehérje-izoformák szerepe komplex öröklődésmentű betegségek pathogenezisében

Patócs A.<sup>1,2</sup>, B. Boyle<sup>2</sup>, Szappanos Á.<sup>2</sup>, Feldman K.<sup>2</sup>, Likó I.<sup>3</sup>, Rácz K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTA TKI, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest; <sup>2</sup> SE, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest; <sup>3</sup> Richter Gedeon Nyrt, Budapest

A glukokortikoidok a glükóz- és zsírsavcsere szabályozása mellett fontos szerepet játszanak az immunfolyamatok, a kardiovaszkuláris rendszer és a viselkedés szabályzásában. Hatással vannak a növekedésre, az egyedfejlődésre, a kalcium-metabolizmusra, a csontszövet metabolikus folyamataira, a pajzsmirigy és ivarmirigyek funkciójára. Jelentőségüket tovább fokozza, hogy napjaink leghatékonyabb gyulladáscsökkentői közé tartoznak. A glukokortikoidok hatására a sejtekben létrejövő válaszreakció és a glukokortikoid-érzékenység lényegesen különbözik a különböző egyedekben, szövetekben és sejttípusokban. A glukokortikoidok hatását a glukokortikoidreceptor (GR) közvetíti, ami tulajdonképpen egy ligandum által aktivált transzkripciófaktor. A GR génjének számos genetikai variánsa ismert, amelyek közül számos fokozott, míg mások csökkent glukokortikoidok iránti érzékenységgel járnak. A génvariánsok mellett a receptornak különböző izoformáit fedezték fel, melyek részben ismert, részben még ismeretlen körülmények hatására eltérő arányban képződnek és szerepük lehet a glukokortikoidok hatására kialakuló biológiai válaszok sokféleségében. A megváltozott glukokortikoidok iránti érzékenységnek szerepe van számos nem monogénesen öröklődő betegség és állapot (obesitas, inzulinérzékenység, autoimmun kórképek, szteroidterápiára adott válaszkészesség) pathomechanizmusában. Klinikai szempontból különös jelentőséggel bír a glukokortikoidok iránti rezisztencia, melynek kialakulásában a receptor  $\beta$ -izoformájának pathogenetikai szerepét valószínűsítik. Az előadás a genetikai asszociációs vizsgálatokból kiindulva bemutatja az érintett

pathomechanizmusokat és a társuló eltéréseket. (Norvég Alap és OTKA NNF77756, Bolyai János kutatási ösztöndíj – Patócs Attila)

#### E4-03

##### **Feltételezett mikroRNS-kötőhely-polimorfizmusok funkcionális és asszociáció-vizsgálata diabetesben**

Rónai Zs.<sup>1</sup>, Kovács-Nagy R.<sup>1</sup>, Brauswetter D.<sup>1</sup>, Nagy G.<sup>2</sup>, Somogyi A.<sup>2</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> SE, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

A 2-es típusú diabetes mellitus (DM2) napjaink egyik leggyakoribb multifaktoriális betegsége, melynek számos genetikai rizikófaktort azonosították, de még több vár felfedezésre. A mikroRNS-ek (miRNS) a gének 3' nem kódoló régiójába (3' UTR) kötődő oligonukleotidok, melyek komplex folyamatok révén szabályozzák a keletkező fehérje mennyiségét. Célunk olyan mikroRNS-kötőhely-polimorfizmusok (miR SNP-k) vizsgálata, melyek összefüggésbe hozhatók a DM2 genetikai kockázatával. Munkánk első lépésként *in silico* megvizsgáltuk, hogy a DM2 kórképpel összefüggésbe hozható gének közül melyekben azonosítható feltételezett miR SNP, majd a kandidáns miR SNP-k listáját elméleti és gyakorlati szempont szerint szűrtük. A jelen munka fő célja a DM2 kandidáns génjeiben *in silico* azonosított miR SNP-k közül azok kiválasztása, melynek funkcionális szerepe igazolható. Az SNP vizsgálat a Szegedi Biológiai Központban 'open array' rendszerrel történt. A kapott adatokat AutoCaller 1.1 szoftverrel elemeztük. A statisztikai értékelés SPSS programmal történt. A kiválasztott gének 3' UTR régióját klónoztuk, az allélvariánsokat irányított mutagenézissel hoztuk létre. 48 miR SNP genotípusát határoztuk meg összesen 891 DNS-mintán (diabetes + kontroll) SNP-chip segítségével, a statisztikai elemzés során 5 miR SNP esetben találtunk asszociációt egy adott allélvariáns és a DM2 előfordulása között. Ezek közt szerepel a már korábban is vizsgált Hif1alfa (rs11549465: p=0,015), valamint 3 új gén (WFS1 (wolframin), rs9457: p=0,005; FABP2 (fatty acid binding protein 2, intestinal), rs2964: p=0,011 valamint MYO5B (miozin 5B), rs9959610: p=0,046 és rs12457962 p=0,078). A gének 3' UTR régióját luciferáz riportergént tartalmazó vektorba klónoztuk, hogy az allélvariánsok fehérjetermelődésre kifejtett hatását molekuláris szinten igazolhassuk. A DM2 genetikai hátterének mind pontosabb feltérképezése hozzájárulhat hatékony terápiás és megelőző stratégiák kidolgozásához. (258/2009ETT)

#### E4-04

##### **A humán kópiaszám-variáció RCCX genetikai átrendeződéseinek szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben**

Doleschall M.<sup>1</sup>, Szilágyi Á.<sup>2</sup>, Patócs A.<sup>3</sup>, Prohászka Z.<sup>4</sup>, Fürst Gy.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MTA-SE, Gyulladásbiológiai és Immunogenomikai Kutatócsoport, Budapest; <sup>2</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>3</sup> SE, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest; <sup>4</sup> SE, III. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Az RCCX szegmentális duplikációt négy megkettőződött gén – a szerin/treonin kináz 19, a komplex komponens 4 (C4), a szteroid 21 hidroxiláz (CYP21A2) és a tenascin X fehérjéket kódoló gén – alkotja. A gének a fenti sorrendben, tandem módon helyezkednek el, de a megkettőződött génpárok közül az egyik pszeudogén, kivéve a C4 gént, amelynek mindkét változata – a C4A és a C4B – funkcionális. A kardiovaszkuláris betegségekben (CVD) az alacsony C4B-kópiaszámmal (*copy number variation*, CNV) nő a morbiditás és a mortalitás. Feltételezve, hogy nem a C4 gén a közvetlen okozója a megfigyelt CVD-fenotípusnak, hanem a kortizolszintézisért felelős CYP21A2, az alacsony C4B CNV-vel genetikailag kapcsolt CYP21A2 haplotípusokat kerestünk. Allélspecifikus *long-range* PCR technikát és az ebből nyert teljes CYP21A2 gének szekvenálását alkalmaztuk a C4 gének és a CYP21A2 haplotípusok együttes meghatározásához. Azokban az esetekben, ahol a diploid kombinációja az RCCX haplotípusoknak nem tette lehetővé a molekuláris haplotipizálást, a C4- és CYP21A2-kópiaszámok RT-PCR meghatározását és genotipizálást követően *in silico* rekonstruáltuk a RCCX és CYP21A2 haplotípusokat. Kimutattuk, hogy a különböző RCCX haplotípusok, a bennük elhelyezkedő C4 gének és a CYP21A2 haplotípusok genetikailag kapcsoltak. Mind az RCCX, mind a CYP21A2 haplotípusok kialakulásában intenzív szerepet játszik a konverzió és az egyenlőtlen átkereszteződés, majd az ezeket követő fixáció. A CYP21A2 génben található polimorfizmusok kapcsoltsága töredezetebb, mint a CNV-ken kívüleső, alapvetően átkereszteződéssel és pontmutációkkal rekombinálandó géneké, így a CYP21A2 teljes haplotípusa szükséges a CVD fenotípusokkal való asszociáció felméréséhez.

#### E4-05

##### **Hisztonmódosítások és a génműködés kapcsolata**

Boros I.

SzTE TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tan-  
szék és SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged

Az eukarióta DNS transzkripciójához feltétel a kromatin-szerkezet fellazítása, amit hisztonokat módosító és nukleoszómákat átrendező/eltávolító fehérjék, illetve komplexeik végeznek. Az egyik elképzelés szerint a nukleoszómát alkotó négy hisztonfehérje N-terminális részein bekövetkező posztranszlációs módosítások – leggyakrabban acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubiquitináció – egy ún. hisztonkódot képeznek, ami felismerési jelként szolgál a transzkripcióban résztvevő fehérjék számára. A sejt élete során flexibilisen változtatható, de sejtről sejtre is átörökíthető hisztonmódosítási mintázat, így általá-

nos és génspecifikus transzkripció meghatározója, ezáltal epigenetikai szabályozási programok megvalósításának irányítója. Csoportunk több éve vizsgálja hisztonacetilációt végző fehérjekomplexek szerepét a génműködés általános szintjének és specifikus gének transzkripciójának meghatározásában. Két metazoospecifikus hiszton acetiltranszferáz komplex, a SAGA és ATAC működésének részletes analizésével megállapítottuk, hogy bár acetiltranszferáz enzim alegységük ugyanaz, szerepük drámaian eltér: az ATAC komplex gének ezreinek működését szabályozza, a SAGA szerepe ezzel szemben a gének sokkal szűkebb csoportjára korlátozott. A két komplex eltérő hatásának oka lehet eltérő hisztonspecifitásuk és kapcsolatuk más hisztonmódosító komplexekkel, amivel a hisztonfoszforiláció és -metiláció mértékét befolyásolják. Adataink szerint e komplexek kialakította módosítások az egyedi gének szintjén sokkal inkább moderátori, mint egy ki-bekapcsoló szerepet töltenek be. A nagyszámú gén működésére kifejtett hatás háttérben kulcsszerepet játszó szabályozó molekulát szintetizáló enzimek, az ATAC komplex esetében a szteroid-bioszintézisben résztvevő fehérjéket kódoló gének transzkripciójának szabályozása állhat. A hiszton acetiltranszferáz komplexek szerepéről eddig főként *Drosophila* modellben szerzett adatokra építve az utóbbi időszakban elkezdtük a hisztonmódosítások szerepének feltárását daganatos sejtekben és a daganatossá válás folyamatában, valamint drogrezisztencia kialakulásában [Pankotai T., Popescu C., Martin D., Grau B., Zsindely N., Bodai L., Tora L., Ferrús A., Boros I. (2010) *Mol. Cell. Biol.*, in press; Peláez IM, Kalogeropoulou M, Ferraro A, Voulgari A, Pankotai T, Boros I, Pintzas A. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(6): 911-920; Zsindely N, Pankotai T, Ujfaludi Z, Lakatos D, Komonyi O, Bodai L, Tora L, Boros IM. (2009)

*Nucleic Acids Res.*, 37(20): 6665-6680]. Az előadás rövid áttekintést ad az ezekről szerzett ismeretekről is.

#### **E4-06 Genomikai vizsgálatok a rákkutatásban**

Puskás L.

*MTA SzBK, Funkcionális Genomika Laboratórium és Avidin Kft., Szeged*

Az új, nagy áteresztőképességű genomikai technológiák megjelenése, amelyek lehetővé teszik a genomikai eltérések genomszintű analízisét, drámai módon megváltoztatták a tumorok genomjának, epigenomjának, transzkriptomjának kutatását. A vizsgálatok az egyedi ráktípusok elkülönítését, molekuláris szintű megismerését, a kezelések hatékonyságának nyomon követését és genomikai markerek diagnosztikai célú felhasználását célozzák. Az előadás az irodalmi áttekintésen túl betekintést nyújt a legújabb módszerek hátterébe, azok alkalmazhatóságába, valamint több példán szemlélteti az új hatóanyagok szűrésére és azok hatásmechanizmusára vonatkozó genomikai kutatásokat, új felfedezéseket. A rákkutatás sarkalatos és eddig csak részben megválaszolt kérdéseire (a tumorigenitás, a metasztázishajlam, a de-/differenciáció, a klonális szelekció, a heterogenitás, a tumorossejt-szelekció és -átalakulás, a kromatinstabilitás és a genom-átrendeződés, az immunrendszer kikerülése, a sztróma szerepe és kialakulása, a krónikus gyulladás és fertőzések szerepe, a közeli mezők léte, szinkron tumorok előfordulása, a tumor-hierarchia, stb.) a közeljövőben mélyreható válaszok várhatóak főként az átfogó genomikai vizsgálatok eredményei alapján.

### **E5 – Pathobiokémia**

#### **E5-01**

**A szöveti transzglutamináz (TG2) szerepe az akut promielocitás leukémia NB4-sejtek neutrofil granulocita irányba történő ATRA-indukált differenciációjában. Adhat-e a TG2 gátlása egy lehetséges megoldást a differenciálszindróma kezelésére?**

Balajthy Z., Csomós K., Német I., Fésüs L.  
*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

Az emlősökben többfajta transzglutaminázt (TG) írtak le. Ismert a keratinocita TG, szöveti TG, epidermális TG, prosztatata TG és a XIII-as faktor. A szöveti transzglutamináz (TG2) a legtöbb emlős szövetben jelen van és a TG-k között a legnagyobb mennyiségben előforduló enzim. Ismert a fehérjéket kovalensen keresztkötő aktivitása, de multifunkcionális enzimeként, szignalizációs G-fehérjeként, adhéziós faktorként vagy kinázaktivitással rendelkező fehérjeként is leírták. Jelenlétét kimutatták intracellulárisan a legtöbb sejtkompartimentben és extracellulárisan a mátrix molekulái között. Ennek ellenére a fiziológias és

patológiás szerepéről hiányosak ismereteink. Az utóbbi pár évben elkezdtük szisztematikusan vizsgálni a TG2 expressziójának a hozzájárulását az ATRA (all-transz-reténsav) indukálta neutrofil granulocita irányba történő differenciációs folyamathoz NB4 promielocitás *in vitro* sejtmódelrendszerben. A TG2-ről előzőekben leírtuk, hogy a differenciáció alatt a sejtmagba transzlokálódik, majd kimutattuk, hogy a NB4 promielocitás sejtek ATRA-indukált differenciációjában a legnagyobb mértékben expresszáldó fehérjék egyike. A TG2 gén expressziójának siRNA-csendesítésével bizonyítottuk, hogy a génexpressziós mintázatban és így az érett neutrofil granulocita gyulladáshoz való válaszában a TG2 moduláló szerepet tölt be. A TG2-expresszió alacsony szintjével együtt jár számos a neutrofil granulocita funkciójához szükséges gén expressziójának az elmaradása, ami kifejeződik a neutrofil granulociták csökkent adhéziójában, vándorlásában, fagocitózisában és szuperoxid-termelésében. Az akut promielocitás leukémia (APL) ATRA-kezelésének egyik hátránya, hogy az esetek 25%-ában differenciációs szindróma (DS) alakul ki, ami a keringési-légzési rendszer működésének a

leromlásához, majd ezt követően halálhoz is vezethet. A DS kialakulásában döntő szerepet játszik az ATRA-indukált differenciálódó sejtek magas CCL2, CCL3, CCL22, CCL24 kemokinek és IL1B és IL8 citokinek termelése. Eredményeinkből feltételezzük, hogy a TG2 expressziójának a csökkentése *in vivo* a differenciálódó APL-sejtekben enyhébb ATRA-indukált gyulladással járhat együtt.

## E5-02

### Az endoplazmás retikulum redox homeosztázisának szerepe az elhízás és a metabolikus szindróma pathogenezisében

Csala M.

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

Az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenje és a citoplazma anyagcseréjét az ER membránján keresztüli anyagforgalom kapcsolja össze. Az utóbbi években számos megfigyelést tettünk, amelyek azt támasztják alá, hogy az ER tápanyagszenzor-funkciót lát el, és ezáltal – a fiziológiás szabályozás mellett – az elhízással kapcsolatos betegségek kialakulásában is jelentős szerepet játszhat. Megerősítettük, hogy az ER lumenében a citoplazmától elkülönült NADP–NADPH-készlet található. A lumenbeli hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) és 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 $\beta$ HSD1) e közös piridinnukleotid-készlet révén funkcionális kapcsolatban áll egymással. Az előbbi enzim tartja fenn a magas [NADPH]:[NADP] arányt, amely szükséges az utóbbi által katalizált kortizolaktiváláshoz. A H6PD szubsztrátellátását pedig a glukóz-6-foszfát-transzporter (G6PT) biztosítja. A glukokortikoidok fontos szerepet játszanak a zsírsejtek kialakulásában, és így az elhízásban. Mivel az említett G6PT–H6PD–11 $\beta$ HSD1 triád aktivitása a lokális kortizolszint egyik legfontosabb meghatározója, megvizsgáltuk, hogyan alakul a triád komponenseinek szintje a preadipociták differenciálódása során. Azt találtuk, hogy a 11 $\beta$ HSD1 expressziója és aktivitása nagyságrendekkel növekszik, míg a másik két fehérje mennyisége változatlan marad. A 11 $\beta$ HSD1 indukciója azonban önmagában is elegendő a pre-receptorális kortizoltermelés fokozódásához, ami egyben pozitív visszacsatolásként a sejt-differenciálódás lényeges eleme. Ha metiraponnal csökkentjük a [NADPH]:[NADP] arányt az ER lumenében, az inaktív prohormon kortizon aktív kortizollá redukálását meg tudjuk gátolni, és kivédhetjük a preadipociták kortizonnal indukált differenciálódását. A bemutatott kísérletes munka a fiziológiás szabályozás új mechanizmusait tárta fel, egyúttal potenciális gyógyszer-támadáspontokat is azonosítva. Ezek rendkívüli jelentőséggel bírnak a metabolikus szindróma, illetve a diabetes megelőzésében és terápiájában.

## E5-03

### ABCC6 transzporter: új játékos az érfali meszesedés kialakulásában

Arányi T., H. de Bousac, Fülöp K., C. Bacquet,

Szabó Z., Pomozi V., Váradi A.

*MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest*

Az *ABCC6* gén egy membrántranszportert kódol, mely a hepatociták citoplazmájából egy ismeretlen vegyületet juttat a véráramba. A transzporter működésének genetikai eredetű hiánya a pseudoxanthoma elasticum kórkép kialakulásához, az elasztikus rostok fragmentálódásához és kalcifikálódásához vezet. Így a betegség tünetei elasztikus rostokban gazdag szövetekben jelentkeznek. A betegeknek tehát bőrtüneteiken kívül jelentősen romlik a látásuk és gyakran szenvednek hipertóniában. A közelmúltban kimutattuk, hogy már egy funkcionális *ABCC6* allél elvesztése is rizikófaktor a koronáriabetegség kialakulásában. Kísérleteink során az *ABCC6* gén szövetspecifikus kifejeződésének szabályozását vizsgáltuk. Elsőként egy kisebb vegyületkönyvtárt teszteltünk, és megvizsgáltuk az egyes molekulák hatását az *ABCC6* gén expressziójára. Megállapítottuk, hogy HepG2-sejtekben több vegyület is hat a gén kifejeződésére, melyek közül a hepatocita és epidermális növekedési faktorok gátló hatását találtuk legizgalmasabbnak. Kimutattuk, hogy hatásukat az ERK1/2 útvonal aktiválásán keresztül fejtik ki, az ERK1/2 pedig a HNF4 transzkripció faktor aktivitását gátolta rendszerünkben. A májbeli anyagcseré szabályozásában fontos szerepet játszó HNF4 fehérje pontos kötőhelyét és magi környezetben történő kötését is meghatároztuk. Az *ABCC6* gént sejtmagi környezetben is vizsgáltuk, hogy a szabályozásban fontos szerepet játszó régiókat felderíthessük. DN-áz hiperszenzibilitási teszt segítségével három szabályozó régiót mutattunk ki. Az egyik a már ismert HNF4-régió volt, míg a másik kettő az első intronban található. A szekvenciát luciferáz riportergénteszt segítségével térképeztük, és azonosítottunk egy 60 bp hosszúságú szakaszt az első intronban, melyhez kötődik a C/EBPbeta nevű transzkripció faktor. Eredményeink azt is bebizonyították, hogy a promóter és az intronikus erősítő szekvenciák, illetve az azokhoz kötődő transzkripció faktorok egy funkcionális egységet alkotnak és együttesen felelősek a gén szövetspecifikus kifejeződéséért.

## E5-04

### A Tks4/HOFI szerepe az EGF-függő sejtmozgásban

Sipeki Sz.<sup>1</sup>, Gujdár A.<sup>1</sup>, Bögel G.<sup>1</sup>, Lányi Á.<sup>2</sup>, Geiszt M.<sup>3</sup>, Buday L.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> DE, Immunológiai Intézet, Debrecen; <sup>3</sup> SE, Élettani Intézet, Budapest; <sup>4</sup> MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A sejtek mozgásának alapvető szerepe van a szövetek, szervek fejlődésében, az immunvédekezésben és a daganatos áttétképzésében. Ugyanakkor ezt a bonyolult folyamatot csak mozaikosan ismerjük. Munkacsoportunk hosszú ideje vizsgálja a sejtmozgásokat irányító jelátviteli utakat, külö-



nős tekintettel az epidermális növekedési faktor (EGF) jelpályájára. Jelen munkánkban a PX és SH3 doméneket tartalmazó állványfehérjék közé tartozó Tks4/HOFI szerepét vizsgáltuk az EGF jelpályában. Kimutattuk, hogy ez az állványfehérje EGF-kezelés hatására komplexet képez az EGF-receptorral, illetve tirozin-oldalláncokon foszforilálódik. Megállapítottuk, hogy a foszforilációért nem maga az EGF-receptor, hanem az Src tirozin kináz felelős, mely EGF-fel stimulált sejtekben szintén asszociálódik a Tks4/HOFI-val. Vizsgáltuk a fehérje PX doménjét is, és azt találtuk, hogy mutációja (R71-94L) az EGF-függő tirozin foszforiláció elvesztését okozza. Boyden-kamrában követve kimutattuk továbbá, hogy ha HeLa-sejtekben géncsökkentéssel lecsökkentjük a HOFI/Tks4 mennyiségét, akkor a sejtek szérum-, illetve EGF-indukálta vándorlása drámaian csökken. Kísérleteinkkel párhuzamosan, 2010. februárjában publikálták, hogy egy ritka, autoszomális recesszív öröklésmentet mutató emberi megbetegedésért, a Frank-Ter Haar-szindrómáért a Tks4/HOFI fehérje teljes vagy részleges hiánya felelős. A Frank-Ter Haar-szindrómával születettek jellegzetes koponya- és csontdeformitásokat, szemfejlődési rendellenességeket mutatnak, fejlődésükben visszamaradnak és nem élnek tovább a kora gyermekkoránál. 2010. májusában született meg az első, általunk előállított *Tks4/HOFI*-génhiányos egér, amely intrauterin retardációt mutatott. A génhiányos egér jellemzését jelenleg végezzük. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a HOFI/Tks4 fehérje fontos szerepet játszik a sejtmozgás EGF-függő szabályozásában. Hiánya vélhetően ezért okoz olyan súlyos elváltozásokat mind az említett humán betegségben, mind egérmodellben.

#### E5-05

##### **Az oxidatív stressz az RNS-interferencia révén gátolja a hő sokkválasz indukcióját és a stresszadaptációt**

Spiró Z., Somogyvári M., Dancsó B., Csermely P., Sőti Cs.

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

Az öregedés a stresszadaptációs képesség progresszív csökkenése, melynek egyik példája a hő sokkválasz indukálhatóságának időskori visszaesése. A hő sokkválasz a hő sokk transzkripció faktorának aktivációja révén hő sokkfehérjék által biztosítja a fehérjék natív konformációjának fenntartását, kulcsszerepet játszik az akut túlélésben és a betegségekkel szembeni ellenállóképességben. Az öregedés és számos korfüggő betegség egyik fontos kóroki tényezője az oxidatív stressz, mely a makromolekulák károsítása, illetve a sejten belüli redoxegyensúly felborítása révén fejti ki negatív hatását. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogyan befolyásolja az oxidatív stressz a hő sokkrendszer indukálhatóságát. Eredményeink szerint az előzetes hidrogén-peroxidos ( $H_2O_2$ ) kezelés jelentősen gátolta a hő sokkválasz-márker Hsp70 fehérje hő sokk indukcióját COS-7 emlőssejtvonalon, illetve az ennek kapcsán kifejlődő termotoleranciát (ma-

gas hőmérsékleten való túlélést) *Caenorhabditis elegans* fonálférgen. Riporteraktivációs és turnover-mérés alapján a transzkripció és poszttranszlációs támadáspontot kizárhattuk. A poszttranszkripció szinten ható RNS-interferencia szerepét vizsgálva beláttuk, hogy a mikroRNS kialakulásában érintett *dicer* csendesítése mind sejteken, mind *C. elegans* fajon kivédte a  $H_2O_2$  hatását. Továbbá, az emlős Hsp70 3'UTR hő sokk általi aktivációját a  $H_2O_2$ -kezelés és a *dicer* csendesítés hasonlóan gátolta. Az RNS-interferencia szerepét egy másik gén csendesítésével is megerősítettük, míg az oxidatív stressz esetleges romboló hatását mikroRNS riporterexpressziós vizsgálatokkal cáfoltuk meg. A *dicer* csendesítés a szabadgyök-eliminációban deficiens mutánsokban kivédi, az öregedő férgekben pedig késlelteti a termotolerancia gyengülését. Eredményeink alapján a fokozottan oxidatív környezet az RNS-interferencia közvetítésével gátolja a hő sokkválaszt és a hő stresszadaptációt, mely gyengítheti a betegségekkel szemben mutatott ellenállóképességet.

#### E5-06

##### **A heroinfüggőségben szerepet játszó dopaminerg polimorfizmusok vizsgálata**

Vereczkei A.<sup>1</sup>, Barta Cs.<sup>1</sup>, Péter A.<sup>2</sup>, Demetrovics Zs.<sup>3</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>3</sup> ELTE, Addiktológiai Tanszéki Szakcsoport, Budapest

A kábítószer-függőség kialakulásában a környezeti hatások mellett genetikai tényezők, illetve ezek interakciói is szerepet játszanak. Az öröklött faktorok szerepe az addikcióban 40-60%-ra tehető. Habár korábbi tanulmányok kimutatták, hogy több génnek is szerepe lehet a függőség kialakulásában, ezen géneknek önmagukban kis hatásuk van. Mivel a dopaminerg rendszer az agy jutalmazó központjának része, a neurotransmisszióban részt vevő fehérjék génjeit a függőség kandidáns génjeinek tartják. Vizsgálataink célja a függőség kialakulását esetlegesen befolyásoló genetikai rizikófaktorok felderítése, ezen belül elsősorban az agyi jutalmazási rendszerhez kapcsolódó dopaminerg receptorok génjei által betöltött szerep tisztázása. Eset-kontroll-vizsgálatunkban ezen gének polimorfizmusait vizsgáltuk 303 heroinfüggő beteg és 555 egészséges kontroll összehasonlításával. A vizsgált polimorfizmusok a dopamin D4-es receptor génje (*DRD4*) kódoló régiójának (3-as exon VNTR – változó számú egymás után ismétlődő régiók), illetve 5' régiójának (-521CT, -616CG, -615AG SNP-k – egyponyos nukleotidvariációk – és a 120 bázispár duplikáció) polimorfizmusai; a dopamin transzporter (*DAT*) 3' VNTR és 8-as intron VNTR polimorfizmusai; a katekol-O-metiltransferáz (*COMT*) 158 AG SNP polimorfizmusai; illetve a dopamin D2-es receptor (*DRD2*) TaqIA, TaqIB és TaqID polimorfizmusai. Eredményeink alapján a dopamin D2-es receptor génjének két polimorfizmusai – melyek valójában

a szomszédos ANKK1 génben található – szignifikáns asszociációt mutattak a heroinfüggőséggel. A többi polimorfizmus esetében klasszikus statisztikai elemzéssel nem találtunk szignifikáns eltérést a heroinfüggő csoport és a kontrollcsoportbeli genotípus gyakoriságai között, a Bayes-elemzés

viszont feltárt néhány szignifikáns összefüggést. Mindezek alapján vizsgálataink alátámasztották a dopaminerg rendszer kandidáns polimorfizmusainak szerepét a függőség kialakításában, és a nagy mintaszám (N=853) által a fő hatások pontosítása is lehetségessé vált.

## E6 – Membráncsatornák és -transzporterek

### E6-01

#### Molekuláris átrendeződések a *Shaker* K<sup>+</sup>-csatornák inaktivációja során

Szántó G. T., Papp F., Panyi Gy.  
DE OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A feszültségkapuzott K<sup>+</sup>-csatornák citoszolikus bejáratánál található aktivációs kapu (A-kapu) és a csatorna extracelluláris bejáratához közel elhelyezkedő inaktivációs kapu (I-kapu) csatoltak, az I-kapu zárt állapota lassítja az A-kapu kapu mozgását. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a két kapu közötti csatolásban lehet-e szerepe az aktivációs és inaktivációs kapuk kialakításában résztvevő S6 jelű transzmembrán helikális szegmens mozgásának. Az S6 szegmens cisztein-scanning mutagenézisét (470C-474C) és a beépített ciszteinek különböző metán-tioszulfonát (MTS) reagensekkel történő módosíthatóságát vizsgáltuk a csatornák zárt, nyitott és inaktivált állapotában. A ciszteinek MTS reagensekkel történő reakciója a csatorna funkciójának elvesztését jelenti, így a reakció az ionáram mérésével követhető. Zárt A-kapu mellett a *Shaker* 449A/47XC mutánsok egyike sem mutatott reakciót MTS reagensekkel, azaz a csatorna zárt A-kapuja mellett a reagensek nem érik el a csatorna aktivációs és inaktivációs kapuja között az S6-hélixet alkotó 470-474-es pozíciójú aminosavakat. Az I-kapuhoz közeli 470C és az A-kapuhoz közeli 474C a csatorna nyitott és inaktivált állapotában is módosíthatók voltak. Az S6-szegmens helikális szerkezetéből következően a 470 és 474 pozíciók között elhelyezkedő 472C a csatorna pórusától elfelé mutat, ennek megfelelően a csatorna egyik állapotában sem reagált MTS reagensekkel. Ezzel szemben, a 471-es pozícióban lévő cisztein a nyitott állapotban nem, de inaktivált állapotban gyors kinetikával módosítható volt MTSEA reagenssel. A 471C jelentős, állapotfüggő módosítása azt jelentheti, hogy az S6-hélix a saját tengelye körül rotációs mozgást végez a nyitott állapotból az inaktivált állapotába történő átmenetkor, biztosítva ezzel az inaktivációs és az aktivációs kapuk közötti csatolást.

### E6-02

#### A TRESK háttér-káliumcsatorna szabályozása (foszforiláció és fehérje-kölcsönhatások)

Enyedi P., Cziráj G.  
SE, Élettani Intézet, Budapest

Az alegységenként két pórusdoménnel rendelkező 2P típusú kálium-ioncsatornák aktivitását a membránpotenciál változása nem vagy csak kis mérték-

ben befolyásolja. Ennek megfelelően a rajtuk folyó káliumáram hozzájárul a sejt nyugalmi potenciáljának kialakításához, befolyásolja a sejt ingerlékenységét, és egyben elősegíti az akciós potenciál során, a depolarizációt követően a nyugalmi potenciál helyreállítását is. A 2P típusú káliumcsatornák első képviselőjét, a TWIK csatornát 1996-ban fedezték fel. Azóta a család ismert tagjainak száma 15-re nőtt. Az elmúlt években az is nyilvánvalóvá vált, hogy a 2P káliumcsatornák nem tekinthetők a sejt ionháztartását befolyásoló egyszerű paszszív elemeknek. Az egyes csatornák működését a sejt környezetében bekövetkező számos változás (pH, hőmérséklet, a sejtet érő mechanikai inger, telítetlen zsírsavak stb.), receptoringerlést követő intracelluláris jelátviteli folyamatok és több, a klinikumban használt szer is befolyásolja. Vizsgálataink a sorrendben utolsóként megismert TRESK 2P csatorna szabályozásának mechanizmusára irányultak. Eredményeink szerint a *Xenopus laevis* petesejtjében kifejezett csatorna aktivitása kalciummobilizáló receptor ingerlésére jelentősen fokozódik. A TRESK-et a kalciumszignál hatására aktiváló kalcineurin defoszforilálja, ezáltal aktiválja. A csatorna intracelluláris hurokrégiójának több aminosavja is foszforilált nyugalmi helyzetben, a foszfatáznak a 264-es és a 276-os (illetve e pozíció közelében elhelyezkedő) szerinek a szubsztrátjai. A kalcineurin aktiválódásának fontos megelőző lépése, hogy a foszfatáz a TRESK-hurok PQIVID szekvenciájához kötődik. Ez az interakció elengedhetetlenül szükséges a defoszforilációs lépésekhez. Kimutattuk továbbá, hogy a csatorna rendelkezik egy 14-3-3 kötőmotívummal, melynek része a 264-es foszfoszerin, a kalcineurin egyik szubsztrátja. A 14-3-3 foszforilációs állapottól függő módon hozzáfolyó ehhez a kötőhelyhez, és jelentősen befolyásolja a kalciumfüggő szabályozás kinetikáját.

### E6-03

#### MDR-szelektív antitumor szerek felfedező kutatása

Szakács G.  
MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A korszerű daganatellenes terápia jelentős sikerei ellenére a kemoterápiával szemben fellépő rezisztencia (multidrog-rezisztencia, MDR) továbbra is megoldásra váró klinikai kihívás. Számos rosszindulatú és áttétet adó daganatos megbetegedés hatékony kezelése a terápia során rendszerint kialakuló MDR-hatás miatt a mai napig nem megoldott. A rezisztens fenotípus gyakran társul az ABC-transzporterek családjába tartozó fehérjék emelkedett expressziójával. E család legismertebb

képviselője az MDR1/Pgp (P-glikoprotein) membránfehérje, mely az ATP energiáját felhasználva megakadályozza a citosztatikus vegyületek sejten belüli felhalmozódását. A transzporter gátlásával az *in vitro* tenyésztett sejtek rezisztenciája áttörhető, ám a klinikai próbák tanúsága szerint ez a stratégia nem alkalmas a drogrezisztens tumorok eliminálására. Farmakogenomikai megközelítés révén kimutattuk, hogy az egyébként multidrog-rezisztens sejtek paradox módon sebezhetőek [Szakács *et al.* (2004) *Cancer Cell*, 6: 129-137], később azonosítottunk egy sor ún. MDR-szelektív vegyületet, melyek toxicitása fokozódik a Pgp-t expresszáló sejtekben [Türk *et al.* (2009), *Cancer Res.*, 69(21): 8293-8301]. Megközelítésünk szerint ezért a P-glikoprotein, mely a klinikai drogrezisztencia univerzális markere, egyben a multidrog-rezisztens tumorsejtek molekuláris célpontja („Achilles-ina”) lehet.

#### E6-04

##### **Plazmamembrán kalciumtranszporterek: lokalizáció és funkció összefüggései**

Enyedi Á.<sup>1</sup>, Padányi R.<sup>1</sup>, Antalffy G.<sup>2</sup>, Hegedűs L.<sup>2</sup>, E. E. Strehler<sup>3</sup>, Lőr K.<sup>1</sup>, Pászty K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Országos Vérellátó Szolgálat, Molekuláris Sejtbiológiai Osztály, Budapest; <sup>2</sup> MTA-SE, Membránbiológiai Kutatócsoport, Budapest;

<sup>3</sup> Mayo Clinic College of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Rochester, MN, USA

A Ca<sup>2+</sup>-jelátvitel egyik kulcsfontosságú eleme a plazmamembránban található Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz (PMCA), mely az ATP kémiai energiájának terhére Ca<sup>2+</sup>-ionokat távolít el a citoszólból az extracelluláris térbe. E fehérjék különleges strukturális egysége a C-terminális régió, amely számos regulációs lehetőséget tartalmaz: kalmodulinkötő motívum, foszforilációs és proteáz-hasító helyek. A C-terminálison található PDZ-kötő motívumon keresztül pedig a PMCA olyan multiprotein-komplexekhez kapcsolódhat, melyek speciális szignalizációs membrándoménokba irányíthatják e fehérjéket. Kimutattuk, hogy az egyik általánosan előforduló izoforma a membránasszociált guanilát kináz (MAGUK) fehérjecsald egyes tagjaival együtt kifejezve a plazmamembránban szigetszerű elrendeződést mutat. A „fehérjeszigetek” a membrán alatti aktinváz tartja fenn – az aktinsejtváz szétesése a szigetek összeolvadását eredményezi. Egy másik izoforma, mely a laktáló emlőmirigysejtek apikális membránjában található, speciálisan az apikális membránban lokalizálódó NHERF-2 állványfehérjével együtt kapcsolódik multiprotein-komplexekhez. A NHERF-2 ezrinen keresztül polarizált sejtek apikális citoskeletonjához horgonyozza, s ezáltal stabilizálja a PMCA fehérjét az apikális membránban. A komplex összetételében tehát ebben az esetben is az aktinvázban van kitüntetett szerepe, továbbá mindkét jelenség szigorúan a PDZ-kölcsönhatás függvénye, hiszen a PDZ-kötő motívum eltávolítása teljes mértékben megszünteti a PMCA fehérjék speciális membrán-

elrendeződését. A hagyományos felfogás szerint a PMCA Ca<sup>2+</sup>-jelátvitelben betöltött szerepét komplexen szabályozott aktivitása határozza meg. Eredményeink arra utalnak, hogy a megfelelő Ca<sup>2+</sup>-jel kialakításához a PMCA aktivitásának közvetlen szabályozásán túl a PMCA speciális membrán csoportokba rendeződése is fontos szerepet játszik. Jelen kísérleteink arra irányulnak, hogy genetikusan kódolt Ca<sup>2+</sup>-indikátorok segítségével olyan fúziós fehérjéket hozunk létre, amelyek alkalmasak lehetnek PMCA közeli Ca<sup>2+</sup>-jelek monitorozására, és ez által a PMCA aktivitásának meghatározására a különböző membrándoménokban.

#### E6-05

##### **Gátló neurotranszmitterreceptor-ioncsatornák allosztérikus szabályozása: neuroszteroidok és tropeinek**

Maksay G.<sup>1</sup>, R. Schemm<sup>2</sup>, Fodor L.<sup>3</sup>  
MTA KKK, Molekuláris Farmakológiai Osztály, Budapest; <sup>2</sup> Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Germany; <sup>3</sup> Richter Gedeon Nyrt, Budapest

A  $\gamma$ -amino-vajsav A-típusú (GABA-A) és a glicin (GlyR) receptorai a pentamer szerkezetű ioncsatornák családjába tartoznak. Agonistáik és antagonistáik, illetve allosztérikus modulátorok más-más üregben kötődve végzik a gátló neurotranszmisszió élettani és farmakológiai szabályozását. A neuroszteroidok a GABA-A-receptorok endogén allosztérikus modulátorai. A két legfőbb neuroszteroid, az allopregnanolon és az 5 $\alpha$ -THDOC eltérő és polifázisos potenciáló hatást fejtett ki a GABA-A-receptor kötődésére és Cl<sup>-</sup>ioncsatorna funkciójára, az extraszinaptikus  $\alpha$ 6 $\beta$ 2-receptorokkal való eltérő kölcsönhatás eredményeképpen. GABA-A-agonisták és neuroszteroidok leszorító hatása az [3H]EBOB-kötődésre heterogén volt, amelynek nanomólos fázisa  $\alpha$ 6KO egerek kisagyában hiányzott. Az allopregnanolon 17 $\beta$ -szubsztituált származéka nanomólos affinitással, szelektíven antagonizálta allopregnanolon potenciáló hatását  $\alpha$ 6 $\beta$ 2 GABA-A-receptorok kloridáramára kisagyi szemcsesejt-tenyészetben. GlyR-okra a (nor)tropin (hetero)aromás észtereinek nanomólos potenciáló és mikromólos gátló hatása lehetőséget kínál nagyaffinitású, alegységselektív, allosztérikusan moduláló és eddig hiányzó (gyógy)szerek kifejlesztésére. A tropeinek kémiai szerkezetének és receptorkötődési affinitásának, valamint az  $\alpha$ 1-GlyR-ok pontmutánsainak funkcionális vizsgálata alapján a tropeinek az ortosztérikus kötőüregben eltérő módon kötődve fejtik ki potenciáló, illetve gátló hatásukat. Molekuláris dinamikai szimuláció alapján a nortropeinek potenciáló kötődése a C-kötőhurkot a kötőüregre húzza. Míg az R119A mutáció szelektíven felszámolta (nor)tropeinek potenciáló hatását, R119K viszont a gátlást szüntette meg. R119 és D97 az *interface*-részt áthidaló ionpárt képez, amit a tropeinek és R119 közti hidrogénhid perturbál. Az R119 rotamerei feltehetően a jelátvitel mikrokapcsolóiként funkcionálnak. (OTKA K62203)

## E6-06

### A Phe<sup>1296</sup>- és Asn<sup>1303</sup>-oldalláncok szerepe a CFTR második nukleotidkötő alegységének ATP-indukált doménzáródásában

Szöllősi A.<sup>1</sup>, P. Vergani<sup>2</sup>, Csanády L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Biokémia Intézet, Budapest; <sup>2</sup>

Department of Neuroscience, Physiology and Pharmacology, University College London, UK

A CFTR Cl-ioncsatorna a kanonikus ABC fehérjékhez hasonlóan két transzmembrán régióból és két nukleotid kötő alegységből (NBD-k) épül fel. A CFTR sajátosága egy ún. regulációs alegység, melynek foszforilációja permisszív szerepet tölt be a csatorna aktivitásában. Homológ fehérjék szerkezete alapján feltételezhető és indirekt módszerekkel bizonyított, hogy a CFTR-csatorna pórusának nyitódása az NBD-k közötti szoros dimer kialakulásához kapcsolható, jelenleg azonban nem ismert, hogy az ATP kötődése az NBD régióhoz milyen szerkezeti átalakuláson keresztül segíti elő a dimer képződését. Izolált NBD alegységeken végzett szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy a dimerképződést megelőzi az NBD-k ATP-indukált szerkezeti átalakulása, amit doménzáródásnak neveztek el. Munkánk során a CFTR második NBD

alegységében található három oldallánc (Phe<sup>1296</sup>, Asn<sup>1303</sup> és Arg<sup>1358</sup>) alloszterikus kölcsönhatásait vizsgáltuk, mivel egy bioinformatikai analízis ko-evolúciót jósolt a három pozíció között, továbbá homológ NBD-k kristályszerkezetében a három oldallánc közötti kölcsönhatások ATP-bekötődés hatására átrendeződnek. Méréseink során makroszkópikus áramokat rögzítettünk *inside-out patch clamp* technikával *Xenopus*-petesejtekből kiszakított membránokban, amelyek vad típusú vagy mutáns CFTR-ioncsatornákat fejeztek ki. Termodinamikai mutáns-ciklusanalízissel becsültük meg az egyes oldalláncpárok közötti interakciókat a CFTR kapuzási ciklusának egyes szakaszaiban. Ehhez az egyensúlyi átalakulások kinetikai paramétereit használtuk fel, nevezetesen az ATP iránti látszólagos affinitást, a nyitvatartási valószínűséget ATP hiányában, illetve nem hidrolitikus mutánsok esetén a telítési ATP-koncentráció mellett mért nyitvatartási valószínűséget és a csukódási sebességi állandót is. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a Phe<sup>1296</sup> és Asn<sup>1303</sup> közötti interakció molekuláris kapcsolóként segíti az NBD2-domén záródását és ezáltal az NBD-dimer kialakulását.

## Poszterek

### P1 – Receptorok és kapcsolófehérjék

#### P1-01

#### Miozin foszfatáz, egy lehetséges regulátor az eNOS aktivitásának szabályozásában

Bátori R., Lontay B., Erdődi F.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A miozin foszfatáz (MP) holoenzimet protein foszfatáz 1 katalitikus (PP1c), 130/133 kDa regulátor (MYPT1) valamint 20 kDa molekulatömegű alegység alkotja. Az enzim konvencionálisan a miozin könnyű lánc defoszforilációjáért felelős, azonban ma már számos a MP által szabályozott nem kontraktilis folyamat is ismert. Az endotéliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) konstitutívan expresszálandó fehérje, amelynek aktivitása foszforilációval szabályozható aktivitást fokozó (pl. Ser<sup>1177</sup>) valamint gátló (pl. Thr<sup>495</sup>) foszforilációs helyeken. A foszforilált Thr<sup>495</sup> defoszforilációját a PP2A, PP2B és PP1c is katalizálhatja, azonban a defoszforilációt végző protein foszfatáz holoenzimek nem ismertek. Kísérleteinket HUVEC- és HEK293-sejteken végeztük. HUVEC-sejteken végzett vizsgálataink alapján a MYPT1 és eNOS közötti kölcsönhatást immunprecipitációval és *pull down* módszerrel is kimutattuk, valamint sejten belüli kolokalizációjukat konfokális mikroszkópiával is alátámasztottuk. A két fehérje részleges ko-lokalizációját figyelhetjük meg a citocentrumokban és a mikrotubulusok mentén. Osztódó HUVEC-sejtekben az aktivitást fokozó Ser<sup>1177</sup> foszforilációjának fokozódását, ugyanakkor a Thr<sup>495</sup> foszforilációjának csökkenését detektáltuk immunfluoreszcens felvételeken. HEK293-sejteket MYPT1- és/vagy eNOS-

plazmidaal transzfektáltunk. Az eNOS-plazmidaal transzfektált sejtekben PKC-aktivátor forbolészter kezelés hatására növekszik a Thr<sup>495</sup> és a Ser<sup>1177</sup> foszforilációja, ami tovább fokozódik PMA és a foszfatázgátló kalikulin-A együttes hatására. A HEK293-sejtek NO-szintetizáló képességét a Thr<sup>495</sup> fokozott foszforilációja gátolja. MYPT1- és eNOS-plazmidaal ko-transzfektált HEK293-sejtek lizátumából a két fehérje ko-precipitációját detektáltuk. Eredményeink a MYPT1 és az eNOS kölcsönhatására utalnak, és felvetik azt a hipotézist, hogy az eNOS Thr<sup>495</sup> defoszforilációját a MP katalizálhatja, és ennek szerepe lehet a sejtciklus szabályozásában. (OTKA 68416)

#### P1-02

#### A Nod-like receptor családba (NLR) tartozó NLRC5 fehérje, mint a gyulladáshoz vezető gátló molekulája

Benkő Sz.<sup>1</sup>, J. Magalhaes<sup>2</sup>, D. J. Philpott<sup>2</sup>, S. E. Girardin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Immunológiai Intézet, Debrecen; <sup>2</sup> Department of Immunology, <sup>3</sup> Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Canada

A Nod-like receptorok (NLR) olyan intracelluláris fehérjék, melyek a mikrobák és a vérszignálok érzékelésén keresztül szabályozzák a velünk született immunitás egyes kulcsfontosságú folyamatait. A humán genomon kódolt 22 NLR fehérje nagy részének funkciója jelenleg ismeretlen. Munkánk során azonosítottuk és jellemeztük

az NLR-családdhoz tartozó NLRC5 fehérjét, mely elsősorban mieloid és limfoid sejtekben fejeződik ki, és expressziója IFN-gamma hatására erősen indukálódik. A fehérje, amely a citoszol és a sejtmag között ingázik, gátolja az NFkB-, az AP-1- és az I. típusú interferon által szabályozott szignál-útvonalak működését. Az NLRC5 csendesítése egérmakrofág-sejtvonalban (RAW264.7) fokozza az LPS indukálta proinflammatorikus citokinek (TNF, IL-6, IL-1beta) termelődését, ugyanakkor csökkenti az antiinflammatorikus IL-10 expresszióját. Ezek alapján az NLRC5 a gyulladással kapcsolatos útvonalak negatív szabályozó fehérjeje.

#### P1-03

##### **A $\mu$ -opioid receptorok regulációja morfin dependencia és megvonás hatására patkány agyban**

Birkás E.<sup>1</sup>, Kékesi O.<sup>1</sup>, Bakota L.<sup>2</sup>, Gulya K.<sup>2</sup>, Szűcs M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged; <sup>2</sup> SzTE ÁOK, Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék, Szeged

A morfin ismételt adásakor tolerancia és dependencia alakul ki, megvonásakor pedig súlyos elvonási tünetek jelentkeznek. Munkánk célja az agyi  $\mu$ -opioid receptorok kötési paramétereiben és regionális lokalizációjában bekövetkező változások vizsgálata volt. Wistar patkányokat 5 napig kezeltünk emelkedő dózisú morfinnal (teljes dózis 370 mg/kg, s.c.), majd naltrexonnal (1 mg/kg, i.p.) precipitált megvonást idéztünk elő. A szer beadását követően 15 perccel az állatokat dekapitáltuk, az előagyakat honogénizáltuk, differenciál- és sűrűséggradiens centrifugálással a sejtfelszíni receptorokat hordozó szinaptikus plazmamembrán (SPM), valamint az intracelluláris kötőhelyeket tartalmazó mikroszóma (MI) frakciót tisztítottunk. Az ismert  $\mu$ -agonista DAMGO-val végzett homológ kompetíciós kísérletekben azt találtuk, hogy a morfin-dependens állatokban a sejtfelszíni receptorok száma és affinitása nem változott az SPM-ben, azonban 26 %-kal nőtt az intracelluláris  $\mu$ -kötőhelyek száma az MI-ben. Naltrexonnal kezelt állatokban viszont az SPM-ben emelkedett 66%-kal a kötőhelyek denzitása. A változások régió-specifikitásának vizsgálatára receptor autoradiográfias vizsgálatokat végeztünk. Az agyból koronasíki metszeteket készítettünk, amelyeket tárgylemezre vettünk fel. Ezután a metszeteket 2 nM [<sup>3</sup>H]DAMGO-val inkubáltuk, pufferral mostuk, majd a metszetekre Kodak X-OMAT röntgenfilmet helyeztünk. Kilenc hónapos expozíciós idő után a filmeket előhívtuk. A specifikus kötéshez rendelhető autoradiográfias jelet az ImageJ program segítségével mértük, és [<sup>3</sup>H]microscales standardokat alkalmazva kvantitáltuk.

#### P1-04

##### **Az ARHGAP25 a Rac kis G-fehérjén keresztül szabályozza a neutrofil granulociták fagocitózisát**

Csépányi-Kömi R., Lázár E., Szabó J., Wisniewski É., Sirokmány G., Geiszt M., Ligeti E.

SE, Élettani Intézet, Budapest

A monomer (kis) G-fehérjék számos sejtfuncióban résztvevő, szabályozó proteinek. GTP-kötött formájuk aktív, GDP-t kötve pedig inaktívvá válnak. Ezen folyamatot a GTP-áz-aktiváló proteinek (GAP-ok) katalizálják, melyek működéséről, szabályozásáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésre. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az ARHGAP25 GAP fehérvérésejtekben expresszálódik és *in vitro* körülmények között a Rac kis G-fehérjét szabályozza. Csendesítése PLB-985 neutrofil sejtvonalban a fagocitózis indukálta szuperoxid-termelés fokozódását eredményezte. Jelen munkánk során célul tűztük ki az ARHGAP25 fagocitózisban és aktin-citoszkeleton-átrendeződésben betöltött szerepének, valamint lehetséges szabályozásának pontosabb feltárását. Kísérleteink során vad típusú COS7, illetve a fagocita oxidáz enzim komponenseit és az FcyRIIa-receptort stabilan expresszáló COSPhox-sejteket alkalmaztunk. A sejteket transzfektáltuk a cián-fluoreszcens proteinnel jelzett, teljes hosszúságú ARHGAP25-tel. Kontrollként az inzertet nem tartalmazó vektort alkalmaztunk. A COSPhox-sejtek fagocitózisát *Cell Tracker Red* szupravitalis, intracelluláris festékkel jelölt, kevert humán savóval opsonizált élesztővel vizsgáltuk. A COS7-sejtekben az endogén Rac-ot monoklonális ellenanyaggal, az aktint phalloidinnel jelöltük. Eredményeinket konfokális mikroszkóppal értékeltük. Az *in vitro* foszforilációs és a lipidkötési (*PIP-Strip*) vizsgálatokhoz rekombináns, teljes hosszúságú GST-fúziós ARHGAP25 fehérjét, illetve különböző doménjeit használtunk. Eredményeink szerint az ARHGAP25 COS7-sejtekben főként citoplazmatikus elhelyezkedést mutat. Helyenkénti dúsulása, valamint *PIP Strip* kísérleteinkben megfigyelt kötődése foszfatidil-inozitolozhoz, felveti sejtorganellumokhoz való kapcsolódásának lehetőségét. Kimutattuk ko-lokalizációját az endogén Rac-kal és a filamentáris aktinnal, valamint *in vitro* foszforilációját. Az ARHGAP25 fehérjét túlexpresszáló COSPhox-sejtek nem voltak képesek opsonizált élesztő-fagocitózisra, szemben a kontrollvektorral transzfektált sejtekkel. Ezen eredményeink szerint az ARHGAP25 a Rac kis G-fehérjén keresztül szabályozza az aktin-átrendeződést, amely kulcsfontosságú a fagocitózis során.

#### P1-05

##### **A foszforilálható protein foszfatáz-1 (PP1) gátlófehérjéinek szerepe a daganatos sejtek túlélésében**

Dedinszki D., Kiss A., Erdődi F.

DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

Kemoterápiás szerek, mint pl. a daunorubicin (DNR) által kiváltott apoptózisban fontos szerepe van a fehérjefoszforiláció-változásoknak. A protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek gátlása antiapoptotikus fehérjék (Erk1/2, Akt, pRb) foszforilációjához vezet, és csökkenti a DNR által kiváltott sejthalál mértékét. Daganatos sejtekben a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációs szintje

magas, ami fokozott sejtproliferációt okoz. Korábban kimutattuk, hogy a foszforilált pRb fehérjét PP1 defoszforilálja, így a PP1-gátlásnak fontos szerepe van a pRb-foszforiláció és a sejtciklus szabályozásában. A kezeletlen daganatos sejtekben tapasztalható magas pRb-foszforilációs szint arra utalhat, hogy a PP1 eleve gátolt a sejtekben. Célnk az volt, hogy a 17 kDa foszforiláció-függő PP1-inhibitor (CPI-17) valamint rokon fehérjék jelenlétét és azok foszforilációs szintjét vizsgáljuk THP-1- és MCF-7-sejtekben. Számos, a CPI-17 foszforilációs helyére specifikus antitesttel keresztreakciót adó fehérje jelenlétét mutattuk ki. Szekvencaanalízissel olyan fehérjéket azonosítottunk, amelyekben megtalálható a CPI-17 foszforilációs hely környezetének megfelelő szekvencia. Ezt a CPI-17-családba tartozó fehérjéken (KEPI, PHI-1) kívül más fehérjék, mint pl. a LIM-kináz (LIMK), valamint emlőtumor-antigének is tartalmazzák. THP-1-sejtekben a LIMK nagyfokú foszforilációja a foszfatázgátlást okozó helyen lehet felelős a PP1-gátlásért és a megnövekedett pRb foszforilációért. FLAG-KEPI-plazmid MCF-7-sejtekbe történő transzfektálásával modelleztük a PP1-inhibitorok hatását a pRb foszforilációjára. Kimutattuk a transzfektált KEPI spontán és foszfatázgátló hatására megnövekedett foszforilációját, amit a pRb-foszforiláció fokozódása kísért. Eredményeink arra utalnak, hogy a PP1-gátló fehérjéknek fontos szerepe van a pRb foszforilációjának szabályozásában, és így befolyásolják a daganatos sejtek sejtciklusát és túlélését. (OTKA K68416)

#### **P1-06**

##### **Neutrofil granulociták gyulladási citokinválasza szöveti transzglutamináz-hiányos állapotban**

Német I., Csomós K., Fésüs L., Balajthy, Z.

*DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

A szöveti transzglutamináz (TG2) megtalálható a sejtcitoszómban, a sejtmagban, a mitokondriumban és az extracelluláris mátrixban. Intracelluláris fehérjeként rendelkezik  $Ca^{2+}$ -függő kereszt kötő, membránfelszíni GTP-áz és szerin/treonin-kináz-aktivitással. Extracelluláris térben integrin-receptorok ko-receptoraként is funkcionálhat. Ismert egyes immunsejtek terminális differenciációjában valamint a gyulladási folyamatokban betöltött szerepe is. All-transz-retinsavas (ATRA) kezelés hatására az NB4 humán promielocitasejtek neutrofil granulocita irányba differenciálódnak. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az NB4-sejtek neutrofil granulocita irányba történő differenciálódásakor a TG2 kifejeződése mind gén szinten, mind fehérje szinten jelentősen fokozódik és módosítja egyes gének (pl. *GP91*) expresszióját [Balajthy *et al.* (2006) *Blood*, 108 (6): 2045-2054]. Munkahipotézisünk szerint a TG2 a neutrofil granulocitákban nemcsak a differenciációban, hanem a terminálisan differenciálódott sejtek celluláris immunválaszában is részt

vesz. Ennek igazolására TG2 *knock down* (KD) NB4-sejtekből differenciáltatott neutrofil granulociták teljes genomvizsgálatát (DNS-*microarray*) végeztük el, és a gyulladási citokinválaszt vizsgáltuk lipopoliszacharid- (LPS) kezelés hatására ELISA módszerrel. TG *knock out* (KO) egerekből izolált neutrofil granulociták gyulladási citokinválasztát *ex vivo* körülmények között szintén vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a KD, mind a KO neutrofilek alacsonyabb gyulladási citokin- (TNF $\alpha$ , IL6) válasszal reagálnak az LPS-kezelésre. A *microarray*- és RT-QPCR-eredmények a differenciálódott sejtekben alacsonyabb génexpressziós szintet mutatnak ugyan (pl. TNF $\alpha$ , Myd88), de ez fehérje szinten nem minden esetben volt igazolható. Megerősítésre vár az a feltevés, hogy a sejtek esetleges differenciáltsági fokának alacsonyabb volta vagy az LPS-receptorból induló jelátvitel egy vagy több komponensének az LPS-szignál átvitelében történt megváltozása áll-e a jelenség hátterében.

#### **P1-07**

##### **A Caskin1 állványfehérje és az EphB1-receptor kapcsolatának vizsgálata**

Pesti Sz.

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

Az extracelluláris jelek sejten belüli továbbításában kitüntetett szerepük van az állványfehérjéknek. Ezek az enzimaktivitással nem rendelkező fehérjék jelátvitelben fontos szerepet játszó fehérjéket kötnek meg és ezáltal azokat egymás fizikai közelségébe hozzák. Különösen az idegrendszerben vannak jelen nagy molekulatömeggel rendelkező állványfehérjék (PSD95, Shank, stb.) Munkacsoportunk a posztszinaptikus denitásban megtalálható egyik állványfehérje-családot, a Caskin fehérjéket kezdte vizsgálni. Az irodalomban eddig a Caskin fehérjecsaládnak egyetlen interakciós partnerét azonosították, a Cask fehérjét, melyről a nevüket is kapták. Ugyanakkor a fehérje szerkezetéből adódik, hogy a Caskin számos más fehérjével is képes asszociálódni. Élesztő-kéthibrid módszerrel munkacsoportunk korábban azonosított több Caskin-kötő fehérjét (Abi2, Nck, MyoB1, stb.), melyek közül az Abi2-vel való interakciót már bizonyítottuk. Jelenlegi célunk a Caskin1 és az Nck adapterfehérje interakciójának, illetve a Caskin1-nek Nck-n keresztül az Ephrin tirozin kináz receptorcsalád egyik tagjához, az EphB1-hez való kötődésének a kimutatása. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy *in vivo* a Caskin1 kötődik az Nck-hoz. Kimutattuk továbbá, hogy *in vitro* a Caskin1 az Nck SH3-doménjeihez kapcsolódik. Irodalmi adatoknak megfelelően sejtes rendszerben sikerült ko-immunprecipitálnunk az Nck-t és az EphB1-t. COS7-sejtekbe ko-transzfektálva, majd ko-immunprecipitálva a Caskin1 és az EphB1 fehérjéket, sikerült kimutatnunk az EphB1-Nck-Caskin1-komplexet. Tovább vizsgálva a fenti komplexet

megállapítottuk, hogy a ko-transzfecció hatására a Caskin1 tirozinon foszforilálódik. A foszforilációs helyek megállapítása jelenleg zajlik. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a hármas komplex kialakulása során az Nck SH2-doménon keresztül az autofoszforilált EphB1-receptorhoz kötődik, míg SH3-doménjeivel a Caskin1-hez asszociálódik. További terveink között szerepel ezen kapcsolat funkciójának a felderítése.

#### **P1-08**

##### **A retinoidok fokozzák a T-sejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist, és elősegítik a glükokortikoidreceptor által mediált transzkripció folyamatokat**

Tóth K. Á.

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

A szteroidhormonok családjába tartozó glükokortikoidok nagy jelentőségű antiinflammatorikus, immunszuppresszív és antineoplasztikus aktivitással bírnak, beleértve képességüket a T- és B-limfociták apoptózisának kiváltására. A timociták glükokortikoid indukálta apoptózisa az egyike volt a programozott sejthalál első között elfogadott formáinak. Ez a hatás a glükokortikoidoknak a glükokortikoidreceptorhoz való kötődésén keresztül valósul meg, melynek következtében a hormon-receptor komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol génexpresszió szabályzásán keresztül, alapvető sejthalál folyamatokat indít el. A glükokortikoidokon kívül, a transz-retinsav és a 9-cisz-retinsav, melyek ligandumaik mind az RAR, mind pedig az RXR receptoroknak, különböző módokon szintén timocitaaoptózist szabályoznak. A retinoidreceptorok, a glükokortikoidreceptorhoz hasonlóan, a sejtmagi receptorok családjába tartoznak. Retinoidok jelenlétében a retinoidreceptorok RAR/RXR heterodimer, illetve RXR/RXR homodimer formájában fejtik ki aktivitásukat és génexpressziót szabályoznak. Előzetes kutatásaink igazolták a retinoidok szerepét a timocitasejt-elhalás indukciójában és negatív szelekciójuk szabályozásában. Jelen kísérleteink arra irányultak, hogy a retinoidok befolyásolják-e a timuszsejtek glükokortikoidok által kiváltott apoptózist, ha igen, ez mely retinoidreceptorokon keresztül és milyen mechanizmussal történik. Kísérleteink során igazoltuk, hogy mind az RARa, mind pedig az RXR képes kapcsolódni a glükokortikoid-receptorhoz, és ezáltal képes retinoidkezelést követően befolyásolni annak transzkripció aktivitását. További eredményeink igazolták, hogy a glükokortikoidreceptor a mitokondriumba transzlokálódik, ahol a Bcl2 fehérje szabályzásán keresztül szerepet játszik a T-sejtek mitokondriumon keresztül történő apoptózisának kiváltásában.

#### **P1-09**

##### **AZ ADENOZIN A<sub>2A</sub> RECEPTOR SZEREPE AZ APOPTÓTIKUS SEJTFELVÉTEL GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSÁBAN**

Köröskényi K., Sándor K., Sarang Zs., Szondy Zs.  
*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

Az apoptotikus sejtek makrofágok általi hatékony és gyors eltakarítása kulcsfontosságú folyamat az immunhomeosztázis fenntartásának szempontjából. Az eltakarítás három szakaszra bontható: (1) fagociták mobilizálása szolubilis 'find me' szigálok közreműködésével, (2) sejtfelszíni 'eat me' motívumok általi felismerését követő fagocitózis, (3) gyulladásos válasz gátlása direkt módon, illetve gyulladáscsökkentő mediátorokon keresztül. Vizsgálatainkkal a főként gyulladásgátló jelet közvetítő adenzin A<sub>2</sub> (A<sub>2</sub>AR) receptor részvételét vizsgáltuk a makrofágok apoptotikus sejtekre adott immunválaszában. Munkánk során azt találtuk, hogy a makrofágok egyrészt adenzin termeléssel, másrészt az A<sub>2</sub>AR sejtfelszíni és génexpressziós szintjének megemelésével reagálnak az apoptotikus sejtekre. Ez utóbbi sejtfelvétel-függőnek bizonyult és valószínűleg két, az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatását közvetítő magreceptor a PPARd, és az LXR aktivációján keresztül valósul meg. Emellett apoptotikus sejtekkel kezelt vad típusú makrofágokban az A<sub>2</sub>AR stimulációja a NO-termelés gátlásán keresztül csökkenti a neutrofil kemoattraktáns MIP-2 és KC szekrécióját. Ennek megfelelően A<sub>2</sub>AR hiányában mindkét kemoattraktáns szintje emelkedett, melynek eredményeként fokozott neutrofil migráció figyelhető meg apoptotikus sejtekkel injektált A<sub>2</sub>AR knock out egerekben *in vivo*. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az adenzin egyike azon, makrofágok által termelt szolubilis mediátoroknak, melyek részt vesznek az apoptotikus sejtek gyulladásgátló hatásban.

Támogatta: OTKA F-67632, OTKA T049445 és ETT 100/2003.

#### **P1-10**

##### **A retinoidok által kiváltott apoptózis szabályozásának vizsgálata egér timuszsejteken**

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

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

Régóta ismert, hogy az A-vitamin hiánya immundeficienciával jár együtt és számos fertőző betegség iránt érzékenyít. A-vitamin hiányos állatokban határozott, erőteljes lép és timusz atrofia-t figyeltek meg. Az adatok arra utalnak, hogy az A-vitamin immunrendszerre gyakorolt hatását valószínűleg annak aktív metabolitjai, a retinsavak - az

all-(csupa) transz- és 9-cisz-retinsav - közvetítik, melyek a sejtmagban elhelyezkedő retinsav receptor család ligandjai. Laboratóriumunkban folyó előzetes kutatások igazolták, hogy a retinoidok az RARgamma receptor ligálásán keresztül apoptózist váltanak ki egér tímuszsejteken. Jelen kísérleteinkben Affymetrix 430Av2 microarray analízissel azonosítottunk számos olyan gént, melyek kifejeződése retinoidok által szabályozott. Ezek egyike a Nur77 transzkripció faktor, melyről ismert, hogy overexpressziója sejthalált idéz elő timocitákban. A Nur77 knock out tímuszsejtek esetében retinoidok által nem indukálható apoptózis, mely bizonyítja a transzkripció faktor retinoid kiváltotta timocita sejthalál során betöltött központi szerepét. A

retinoidok számos sejthalálban szerepet játszó gén kifejeződését szabályozzák Nur77 függő módon. Ilyen például a FasL és TRAIL, melyek sejtfelszíni sejthalál receptorok ligandjai, az NDG1, mely képes apoptózist kiváltani a kaszpáz-8 aktiválásán keresztül, illetve a Bid, mely kaszpáz-8 hasítást követően a Bax függő mitokondriális utat erősíti. Továbbá megfigyeltük, hogy a Nur77 képes a mitokondriumba transzlokálódni, ahol gátolja a Bcl-2 fehérje antiapoptotikus funkcióját. Adataink arra utalnak, hogy a retinoidok képesek átprogramozni az I-es típusú sejteket II-es típusú sejtekké és a mitokondriális úton keresztül halál ligand mediálta sejthalált indukálnak. Támogatta: OTKA K 77587

## P2 – Molekuláris biofizika, szerkezeti biokémia

### P2-01

#### A dihidrolipoil dehidrogenáz enzim patogenikus mutációi által kiváltott emelkedett reaktív oxigénszarmazék-képzés

Ambrus A.<sup>1</sup>, Törőcsik B.<sup>1</sup>, Tretter L.<sup>1</sup>, Ozohanics O.<sup>2</sup>, Ádám V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Biokémia Intézet, Budapest; <sup>2</sup> MTA KKK, Kémia Intézet, Tömegspektrometria Osztály, Budapest

A piruvát és alfa-ketoglutarát dehidrogenáz enzimkomplexek (PDHc, KGDHc) közös harmadik alegységének, a dihidrolipoil dehidrogenáznak (LADH) a mutációja annak csökkent aktivitásához és számos betegség kialakulásához vezethet (E3-deficiencia). A vad típusú LADH patológiás körülmények között (magas NADH/NAD<sup>+</sup> arány, pH<7.0) meghatározó mennyiségben képes reaktív oxigénszarmazékokat (szuperoxidot, hidrogén-peroxidot, összefoglalóan ROS-t) termelni enzimatis reakciójának nem fiziológiás irányában (reverz reakció). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a LADH néhány betegségét okozó mutációja akár 200%-kal is megnövelheti *in vitro* a vad típushoz képest a ROS-képzést, aminek szerepe lehet a mutációkhoz köthető betegségek kialakulásában. Tizenkét LADH mutánst fejeztünk ki *Escherichia coli* szervezetben, tisztítottunk meg és vizsgáltunk. A mutánsok többsége esetében az aminosavcserek hatással voltak egyszerre a *forward* és a reverz reakciókra, a proszretikus csoport (FAD) kötődésére, a fehérje konformációjára és a LADH „ping-pong bi-bi” kinetikai reakciómechanizmusára is. A LADH homodimer dimerizációs felszínén lévő mutációk nem okoztak monomerizációt, ahogy korábban azt gondolták, így az ezen mutációk által kiváltott deficienciák mechanizmusára más magyarázatot kellett találnunk. Eredményeink tükrében az E3-deficienciában szenvedő betegek kezelésének – az itt azonosított specifikus mutációk esetében – figyelembe szükséges vennie a ROS-szint csökkentését is (pl. antioxidáns terápiával).

### P2-02

#### A TIMAP és a protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének vizsgálata daganatos sejtekben

Boratkó A., Czikora I., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.

DE OEC, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A Ser/Thr specifikus protein foszfatáz-1 (PP1) holoenzim a sejtekben egy 37 kDa PP1 katalitikus alegység izoforma (PP1 $\alpha$ ,  $\gamma$  vagy  $\delta/\beta$ ) és regulátor alegység (R) komplexéből áll. A több mint 50 potenciális R fehérje közös szerkezeti eleme a PP1c-kötő motívum (K/R-x1-V/I-x2-F/W). A MYPT (*myosin phosphatase target subunit*) a miozin foszfatáz holoenzimben a PP1c-hez és miozinhoz is kötődő regulátor alegység. A 64 kDa TIMAP (TGF- $\beta$ -*inhibited membrane associated protein*) fehérje a MYPT-vel mutat szerkezeti rokonságot, mivel PP1c kötőmotívumot és ankirin-szerű ismétlődéseket is tartalmaz. A TIMAP-ra jellemző elemeknek tekinthetők a fehérje szerkezetében a nukleáris lokalizációs szignál (NLS) és prenilációs motívumszekvenciák, ez utóbbi a fehérje membránlokalizációjáért lehet felelős. Előzetes eredményeink szerint a TIMAP a PP1c regulátor alegységeként funkcionál, és specifikusan a PP1c $\delta$  izoformával asszociál. Jelen munkánkban a TIMAP lokalizációs sajátosságait tanulmányoztuk monocita eredetű THP-1 leukémiás sejtekben. Immunfluoreszcenciás kísérleteinkben, kontroll sejtekben a TIMAP a citoplazmában és a plazmamembránban lokalizálódik. Proteinfoszfatáz-gátlószeres (50 nM kalikulin-A) kezelést követően a sejtmagban is megjelenik. A citoplazma- és sejtmagfrakciók izolálását követően a CLA hatására bekövetkező sejtmagi transzlokációját *Western blot* kísérletekkel is megerősítettük. A TIMAP vad típusú és mutáns formáját (amely nem tartalmazza a NLS-szekvenciát), valamint a PP1c $\delta$  vad típusú, illetve katalitikusan inaktív formáját transzfektáltuk HeLa-sejtekbe, melyek nem tartalmaznak TIMAP-ot, így a túlexpresszált fehérje lokalizációs sajátosságai ezekben a sejtekben jól vizsgálhatók. A



transzfecció sikerességét *Western blot* módszerrel ellenőriztük. A továbbiakban megvizsgáljuk, hogy foszfatáz-gátlókkal történő kezelést követően a TIMAP milyen lokalizációs sajátságokat mutat, és a PP1c-vel történő ko-expresszióknak van-e hatása a lokalizációjára. (OTKA CNK80709 és K68416)

### P2-03

#### Csillámfelületre adszorbeálódott liposzómák nanomechanikájának vizsgálata atomerő-mikroszkóppal

Bozó T.<sup>1</sup>, Murvai Ü.<sup>2</sup>, Kovács L. G.<sup>2</sup>, Gróf P.<sup>1</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> PTE ÁOK, Biofizikai Intézet, Pécs

A liposzómákat elterjedten alkalmazzák modell-kompartmentként, membrántulajdonságok vizsgálatára és potenciális nanomedicinális gyógyszerhordozóként is. A vizsgálatokra alkalmazott fénymikroszkópos módszerek esetében a megfelelő térbeli feloldás hiánya, az elektronmikroszkópos technikánál pedig a fixálás és festés során keletkező műtermékek akadályozzák a morfológiai tulajdonságok megismerését. Ezen problémák kiküszöbölhetőek atomerő-mikroszkóp alkalmazásával, ami a nanométeres felbontású képalkotás és pikonanoneuton nagyságrendű erőmérés, valamint a topográfiai és mechanikai információk térben összehangolt regisztrálása révén egyedülálló lehetőséget biztosít lipidvezikulák és kettősrétegek vizsgálatára. Munkánk során felületre adszorbeálódott liposzómák morfológiáját és nanomechanikai tulajdonságait vizsgáltuk atomerő-mikroszkóppal. Átlagosan 100 nm átmérőjű, extrudált DPPC-vezikulákat 1 óráig inkubáltuk atomi simaságú csillámfelületen, majd a minta felületét pufferben, tapogató módban pásztáztuk. A liposzómák lapos, szabálytalan foltokként jelentek meg, a szubsztráttól mért kb. 5 nm-es magasság egy foszfolipid-kettősréteg vastagságának felel meg, ami a vezikulák teljes szétterülésével magyarázható. Helyenként részlegesen szétlapult vezikulák jelenlétét is regisztráltuk. Az nanomechanikai erőgörbék felvételéhez meghatároztuk a tú rugóállandóját, és a méréseket izolált lipidfoltok közepén végeztük. A közelítési erőgörbéken jelentkező, a kettősréteg átszúrásához szükséges erőhatás mellett, a tú felszíntől való eltávolításakor, az esetek mintegy 7%-ában konstans (80 + 16 pN) erővel jellemezhető plató, illetve többszörös platók jelentek meg, hosszuk 5 nm és 680 nm között váltakozott. A jelenség feltételezhetően membránnanocsó (illetve -csövek) kihúzásával magyarázható. Az ehhez szükséges erő állandó nagysága a szerkezet viszkózus tulajdonságára utal. A platóhossz és a kihúzásához szükséges erő között nem találtunk egyértelmű összefüggést.

### P2-04

#### A TIMAP fehérje és a protein foszfatáz 1 kölcsönhatásának vizsgálata tüdő-endotélisejtekben

Czikora I., Bécsi B., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.

DE OEC, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A tüdőendotélium *barrier* funkciójának szabályozásában a citoszkeletonhoz kötődő fehérjék foszforilációja és defoszforilációja kulcsszerepet tölt be. A TIMAP (TGF protein) fehérje a MYPT (protein foszfatáz 1, PP1 regulátor) családdal szerkezeti rokonságot mutat, így feltételezhető, hogy a PP1 katalitikus alegység (PP1c) regulátor alegysége. Más sejttípusokhoz viszonyítva a TIMAP expressziós szintje az endotélisejtekben igen magas. Korábban TIMAP-depletált és kontroll humán tüdőartéria-sejtekben (HPAEC) a TIMAP *barrier* védő funkcióját mutattuk ki. Jelenlegi munkánkban a TIMAP és a PP1c fehérjék közötti kölcsönhatást mutattunk ki immunoprecipitációval, valamint rekombináns, tisztított fehérjékkel Biacore készülék (felületiplazmon-rezonancia) segítségével. A TIMAP S333/S337 helyen (GSK/PKA által) foszforilált formái jelentősen gyengébb kölcsönhatást mutattak. A TIMAP plazmamembránhoz asszociáló fehérje; immunfluoreszcenciás kísérletekben elsősorban a sejtmembránban valamint a sejtmagban detektáltuk. A sejtmembránban ko-lokalizációt mutattunk ki a TIMAP és a moezin (ezrin-radixin-moesin (ERM) fehérjecsald tagja) között. A TIMAP és a moezin közötti kölcsönhatást immunoprecipitációval is megerősítettük. Az ERM fehérjék aktivált állapotban vannak, ha a C-terminális treonin-oldalláncukat a PKC- $\theta$  vagy a Rho kináz foszforilálja, ezáltal képesek az aktinfilamentumokat a plazmamembránhoz kötni. Rekombináns moezin fehérjét (vad típus és trunkált mutáns) Rho kináz enzimmal foszforiláltunk, melyet *in vitro* foszfatáz assay kísérletekben szubsztrátként használtunk. A PP1c aktivitása TIMAP jelenlétében gátolt, míg a PKA/GSK-val foszforilált TIMAP a PP1c aktivitását nem befolyásolta. Feltételezzük, hogy a TIMAP a PP1c aktivitásának szabályozásával szerepet játszhat az ERM fehérjék defoszforilációjában és ezen keresztül az ERM által szabályozott sejtmembrán-folyamatokban és a *barrier* funkcióban. (OTKA CNK80709 és K68416)

### P2-05

#### A *Thermobifida fusca* fajból származó intracelluláris $\beta$ -D-xilozidáz enzim aktív centrumának topológiai vizsgálata

Fekete Cs. A.<sup>1</sup>, Elek R.<sup>1</sup>, Batta Gy.<sup>3</sup>, Kukolya J.<sup>2</sup>, Kiss L.<sup>1</sup>, Barna T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DE-TEK, TTK, Genetika és Alkalmazott Mikrobiológia Tanszék, Debrecen;

<sup>2</sup>Agruniver Holding Kft., Gödöllő;

<sup>3</sup>DE-TEK, TTK, Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen

A xilanázok növényi hemicellulózt bontó enzimek, amelyek jelenleg a világ biotechnológiai enzimfelhasználásának közel 20%-át adják. A heterogén összetételű xilán teljes lebontásához egy több enzimből álló enzimrendszerre van szükség, amelynek utolsó tagja a  $\beta$ -D-xilozidáz (EC 3.2.1.37). A *Thermobifida fusca*  $\beta$ -D-xilozidáz enzime jellegzetes felépítésű, kizárólag  $\beta$ -redőkből álló moduláris fehérje, a katalitikus egység ötlapátos  $\beta$ -propeller, míg a szénhidrátkötő domén  $\beta$ -szendvics szerkezetű.  $^1\text{H-NMR}$ -vizsgálattal bizonyítottuk, hogy az enzim a szubsztrátját (rövid láncú xilooligoszacharidok) inverziós mechanizmus szerint hasítja. Termékgátlás volt megfigyelhető xilóz esetén amelyet, STD  $^1\text{H-NMR}$ -technikával, valamint klasszikus kinetikai mérésekkel is meghatároztunk ( $K_i = 67 \text{ mM}$ ). Továbbá azt is megállapítottuk, hogy az enzim aktív centrumában a glikon-kötőhely abszolút szubsztrátspecifitást mutat. Az inhibíciós vizsgálatokból pedig az derült ki, hogy az aglikonkötődést nagymértékben elősegítik a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások, amikor az aglikon aril- vagy azidcsoport. A  $\beta$ -redős szerkezetnek köszönhetően az enzim nagy termostabilitású. A CD spektroszkópiás mérések alapján ez a szerkezeti motívum torzul, amikor szubsztrátanalóg inaktívátor (N-brómacetil- $\beta$ -D-xilopiranozilamin) kötődik az aktív centrumba. A *T. fusca*  $\beta$ -D-xilozidáz esetén négy inaktívátor molekula kötődése vált bizonyítottá a MALDI-TOF mérések során, arra utalva, hogy az általánostól eltérően nem kettő, hanem négy esszenciális karboxilcsoport található az aktív centrumban. A módosított aminosavak peptid térképezéssel történő azonosítása folyamatban van. Egy másik megközelítéssel az esszenciális karboxilát oldalláncok részvételét a szubsztrát hidrolízisében, specifikus reagensek (*N*-(3-dimetilamino-propil)-*N'*-etil-karbodiimid, glicin-metil-észter) alkalmazásával is igazoltuk. NKTH TECH\_08-A3/2-2008-0385 (OM-00234/2008)

## P2-06

### A szubsztrátindukált oligomerizáció szerepe a humán Bloom-szindróma DNS helikáz (BLM) működésében

Gyimesi M.<sup>1</sup>, R. H. J. Pires<sup>2</sup>, Sarlós K.<sup>1</sup>, Módos K.<sup>2</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>2</sup>, Kovács M.<sup>1</sup>

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

A genom karbantartásában nélkülözhetetlen szerepet játszó RecQ DNS-helikázok működésük során különféle fokú oligomerizációt mutatnak. Feltételezések szerint az alapvető mechanokémiai aktivitások (ATP-hidrolízis, egyszálú DNS mentén történő transzlokáció, szálszétválasztás) ellátására elegendő a helikázok monomer és dimer formája, de a specializált funkciók (szálanellátás, Holliday-szerkezetek vándoroltatása, D-hurokszerkezetek szétbontása) már magasabb rendű oligomerizációt igényelnek. Azonban a humán BLM helikázról elektronmikroszkópos és gélszűrés kromatográfias eljárások alapján azt feltételezik, hogy szubsztrátok hiányában is multimer (tetra- illetve hexamer) for-

mában található. Célunk a különböző szubsztrátok jelenlétében pontosan meghatározni a BLM negyedleges szerkezetét, hogy ezáltal jobban megérthessük annak mechanizmusát, miként szabályozódik az átkapcsolás a különböző oligomer formák közt. Ehhez tisztán, biokémiai vizsgálathoz elegendő mennyiségben előállítottuk a BLM teljes hosszúságú formáját. *Steady-state* és gyorskinetikai vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a BLM egyszálú DNS szubsztrát jelenlétében monomer formában funkcionál. Dinamikus fényszórás-méréseink megerősítették, hogy DNS nélkül, illetve egyszálú DNS jelenlétében jelentős mértékű monomer frakció van jelen az ATP-hidrolízis során, bár apo állapotban valóban megfigyelhető a multimer formák széles spektruma. Pásztázó atomerő-mikroszkópos analízissel egyedi molekula szinten is kimutattuk, hogy az ATP hidrolízise a monomer forma dominanciáját idézi elő. Vizsgáljuk továbbá, hogy az *in vivo* szubsztrátként előforduló komplex DNS szerkezetek (pl. D-hurok) milyen hatással vannak az oligomerizáció fokára. Vizsgálataink fényt derítenek arra, mely biológiai funkciók ellátásához nélkülözhetetlen a BLM oligomerizációja, és ebben mely biokémiai sajátságok játszanak kulcsszerepet.

## P2-07

### Humán kimotripszin C inhibitorainak fejlesztése irányított evolúcióval

Héja D.<sup>1</sup>, Zboray K.<sup>1</sup>, Szakács D.<sup>1</sup>, Szabó A.<sup>2</sup>, Sahin-Tóth M.<sup>2</sup>, Pál G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Biokémiai Tanszék, Budapest; *Uratim Kft.*, Budapest; <sup>2</sup> Department of Molecular and Cell Biology, Boston University, Boston, MA, USA

A kimotripszin C (CTRC) egy hasnyálmirigy enzim, amely proteolitikusan szabályozza az egyik fő lebontó enzim, a kationos tripszin aktivációját és degradációját. A CTRC gén mutációi kockázati tényezők krónikus hasnyálmirigy gyulladás kialakulásában. Célunk nagy hatékonyságú, szelektív CTRC inhibitorok létrehozása volt. Ehhez a *Schistocerca gregaria* Proteáz Inhibitor-2 (SGPI-2) molekulából indultunk ki, amely egy 35 aminosavas hatékony kimotripszin inhibitor. Az SGPI-2 proteázköti hurok régiójának kombinatorikus mutagenézisével inhibitor könyvtárat hoztunk létre, amelyet M13 fág felszínén jelenítettünk meg. Az inhibitorban elhasadó kötéstől mindkét irányban 4-4 aminosavnyi szakaszon (P4-P4') két cisztein kivételével minden pozícióban megengedtük a 20-féle aminosav előfordulását. A több milliárdnyi variánst tartalmazó könyvtárból CTRC-hez való kötődés alapján szelektáltunk klónokat. 25 egyedi klón DNS szekvenálásából kirajzolódott a CTRC által preferált szekvencia mintázat. Ez alapján rekombináns fehérje formájában létrehoztunk egy konszenzus szekvenciának megfelelő inhibitorot valamint ennek számos variánsát. Az izolált inhibitorok proteázgátló képességét CTRC-n kívül a következő humán hasnyálmirigy enzimeken teszteltük: CTB1, CTB2, elasztáz 2A, 3A és 3B; kimotripszin szerű enzim 1. A fágbemutatással kifejlesztett inhibitorok a CTRC-t pikomólos kötési állandóval, míg a többi proteázt

200-200 000-szer gyengébben gátolják. A P1 pozícióban szelektálódott Leu, valamint a P4' pozícióban domináló negatív töltésű Asp és Glu meghatározó szereppel bírnak a nagy affinitású CTRC kötésben. A P2' helyen minor komponensként szelektálódott Asp oldalláncról kiderült, hogy nagymértékben fokozza az inhibitor szelektivitását. Az újonnan kifejlesztett inhibitorokkal lehetőség nyílik arra, hogy a CTRC hasnyálmirigy gyulladásban betöltött szerepét in vivo kísérletekben is vizsgálni lehessen.

#### **P2-08**

##### **A protein foszfatáz 2A (PP2A) regulátor alegységek szabályozó szerepe a sejtek közötti kapcsolatokban az endotéliumban**

Kása A., Csontos Cs., Gergely P.

*DE OEC, AOK, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

Az endotélium *barrier* funkciójában a fehérjefoszforiláció és -defoszforiláció fontos szerepet játszik, hiszen számos citoszkeletonfehérjének, és a sejtkapcsolatok fehérjéinek működését szabályozza. A sejtkapcsolatokban a kölcsönható fehérjék foszforilációjáról és az abban résztvevő kinázokról már vannak adatok. Az adherens kapcsolatokban a cadherin Ser/Thr foszforilációja szükséges a  $\beta$ -catenin kötődéséhez. A foszfatázokat és azok szabályozását viszont még nem vizsgálták endotélisejtekben. Korábban kimutattuk, hogy az endotélisejtekben a PP2A-aktivitás részt vesz a *barrier* funkció szabályozásában és a citoszkeleton újrendeződésében. A PP2A holoenzimet, egy 36 kDa tömegű katalitikus alegység (PP2Ac) és egy 65 kDa tömegű regulátor alegység (PP2Aa) alkotja. Ehhez a dimerhez kapcsolódik a B regulátor alegység (PP2Ab), melynek több egymástól eltérő formáját ismerjük. A különféle B alegységek az enzim szubsztrátspecifitását és a sejten belüli lokalizációját határozzák meg. Jelenleg a B alegységek szerepét kívánjuk vizsgálni, mind a citoszkeleton, mind a sejtkapcsolatokban résztvevő fehérjék defoszforilációjának szabályozásában. Ezért marhatüdőartéria-endotélisejteket (BPAEC) PP2Ab és PP2Ab' konstrukciókkal transzfektáltunk. A túlexpresszált B és a B' alegységek a sejtmagban lokalizálódnak, továbbá a B és B' regulátor alegységek túlexpressziója a sejtekben jelentős morfológiai változást okoz. Immunfluoreszcens kísérleteink alapján az endogén B és B' alegységek a citoplazmában, illetve a citoplazmában és a sejtmagban található. Trombinkezelés hatására a B alegység jelentős része a plazmamembránba transzlokálódik, míg a B' alegység a sejtmagban dúsul fel. Az adherens kapcsolatban fontos szerepet betöltő  $\beta$ -catenin kapcsolatát vizsgáltuk a B alegységgel. Trombinkezelt PP2ABa-depletált sejtek membránjában a  $\beta$ -cateninszint lecsökkent, mely PP2AB alegység sejtkapcsolatokban betöltött lehetséges szabályozó szerepére utal. (OTKA CNK 80709)

#### **P2-09**

##### **Transthyretin amyloid oligomers annular formed by non-native dimers assemble to form protofibrils**

Pires R.<sup>1</sup>, Karsai A.<sup>2</sup>, M. J. Saraiva<sup>3</sup>, A. M. Damas<sup>3</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> PTE, Biofizikai Intézet, Pécs; <sup>3</sup> Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal

Transthyretin (TTR) is a human protein, whose aggregation in the form of amyloid fibrils is associated with severe neurological and systemic disorders. Cytotoxicity in amyloidoses has been attributed to pore-forming annular oligomers and protofibrils. Understanding to which extent these two morphologically dissimilar intermediates are structurally related can shed light into the cytotoxicity mechanism of amyloidoses. Here we investigated the early events in the amyloid aggregation of TTR using atomic force microscopy in liquid coupled to dynamic force spectroscopy (DFS). We observed that the formation of protofibrils is preceded by the appearance of annular oligomers with 16 nm in diameter and 6 nm in the substructure suggestive of the presence of a TTR dimer as the underlying unit. We show that annular oligomers associate laterally, forming linear structures made of several annuli. Subsequently, amyloid protofibrils positive for thioflavin T and Congo red appeared. Annular oligomers are therefore likely to be elements on the pathway to form amyloid protofibrils. To test this hypothesis we promoted protofibril disassembly at near physiological conditions and again we observed annular oligomers this time with a diameter of 7.2 nm. Further structural details were revealed by DFS. Force curves of native TTR and its amyloid aggregates show a fundamental 4 nm pattern, likely correspondent to successive unfolding of the  $\beta$ -strands. Manipulation of the annular oligomers resulted in an 8 nm spacing to be more frequent, indicating for this case to the more unfolded state of the TTR monomer. Furthermore, from manipulating annular oligomers and protofibrils we also observed the presence of a dimeric structure which corroborates our imaging data. In sum, our results show that annular oligomers composed of non-native dimers are involved in the assembly of protofibrils via an associative mechanism. Their reversal to an annular oligomeric state might explain their cytotoxicity.

#### **P2-10**

##### **Enzimek irányított evolúciója mikrofluidikai cseppekben**

Kintses B., C. Hein, C. Laine, S. Jonas, G. Whyte, F. Hollfelder

*Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK*

A képesség, hogy új enzimeket tudjunk létrehozni biotechnológiai alkalmazásokhoz, a fenntartható európai vegyipar egyik fontos pillérének tekinthető.

Ugyanakkor, enzimek tervezése mérnöki módszerekkel komoly kihívásnak bizonyul a tudomány számára. Ezért a mai módszerek alapja, hogy hatalmas génkönyvtárakból választjuk ki a feladatra legmegfelelőbb enzimeket. Jelentős limitációt jelent, hogy a jelenlegi robotizált hatásszűrési technológiák átteresztőképessége ( $10^5$  enzimvariáns) nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a molekuláris biológiai módszerekkel létrehozható génkönyvtárak mérete ( $> 10^7$ ). Ráadásul túkeigényük korlátozza a potenciális felhasználók körét. Mind a két problémára megoldást jelenthet egy új miniaturizációs technika (*in vitro* kompartmentalizáció), melyet enzimkönyvtárak hatásszűrésére alkalmazunk irányított evolúciós kísérleteink során. Az eljárás lényege, hogy az enzimreakciók parányi, pikoliter térfogatú vízcseppekben zajlanak, és a reakció által generált fluoreszcens jel alapján kvantitatíve analizálhatók. Kísérleteink igazolják, hogy a legjobban működő enzimvariánsok fluoreszcenciaaktivált cseppszortírozó eszközzel – mely másodpercenként 1000 csepp átnézését teszi lehetővé – kiválaszthatók a könyvtárból. A rendszer előnye, hogy az egyetlen kritérium az enzimreakció alkalmazhatóságára egy fluoreszcens teszt, amely a reakciót kvantifikálja. Így enzimkönyvtárak szűrésére ez az első általánosan alkalmazható, nagy átteresztőképességű technika. A tesztreakció jelentős, 100.000-szeres méretcsökkenése komoly költségmegtakarítást eredményezhet a felhasználók számára.

#### P2-11

##### A kalcineurin szerepe a miozin foszfatáz szabályozásában endotélsejtekben

Kolozsvári B.<sup>1</sup>, Bakó É.<sup>2</sup>, Gergely P.<sup>1</sup>, Kiss A.<sup>2</sup>, Bécsi B.<sup>1</sup>, Erdődi F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; <sup>2</sup> MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Debrecen

Gyulladásos folyamatokban bioaktív ágensek (pl. trombin) hatására az endotélsejtek kontrakciója figyelhető meg, a sejtek között hézagok jönnek létre és a *barrier* funkció sérül. A kontrakcióval párhuzamosan a miozin könnyű láncának (MLC) foszforilációja növekszik, amelynek mértékét a miozin könnyű lánc kinázok (MLCK) és a protein foszfatáz-1 (PP1) típusú miozin foszfatáz (MP) aktivitásának aránya szabályozza. A MP holoenzimben a PP1 katalitikus alegységhez regulátor alegység (MYPT1) kötődik. A MP MYPT1 alegységének foszforilációja kulcsszerepet játszik a foszfatázaktivitás és ezzel a miozin foszforilációjának szabályozásában. A MYPT1 defoszforilációját katalizáló és ezzel a foszfatáz reaktivációját elősegítő foszfatázokról keveset tudunk. Korábbi munkánk során tanulmányoztuk a kalcineurin szerepét emlősendotél-sejtvonal citoskeletonszerkezetének szabályozásában. A kalcineurin (PP2B)  $Ca^{2+}$ -kaldmodulin- (CaM-) függő Ser/Thr specifikus protein foszfatáz. A PP2B gátlószere, a cyclosporin A (CsA), amelynek jelenlétében a trombin hatására kialakuló hézagok hosszabb ideig megmaradnak. Jelen munkánkban kimutattuk, hogy a CsA-kezelés után növekszik a

MYPT1 gátlást okozó foszforilációs szintje a Thr695 és Thr850 oldalláncokon. Trombin hatására a MYPT1 foszforilációs szintjének változása tranzienst, amely azonban CsA-előkezelést követően fenntartott marad. A PP2B a tisztított, foszforilált MYPT1-et  $Ca^{2+}$ -CaM-függő módon defoszforilálja. A PP2B és a MYPT1 kölcsönhatását GST-MYPT1 *pull-down* kísérletekben is igazoltuk. A PP2B kötődése vad típusú és rekombináns MYPT1-fragmentumokhoz arra utalt, hogy a PP2B a MYPT1 N-terminális régiójához kötődik. A PP2B defoszforilált MYPT1 alegységgel kialakuló komplexe meglehetősen stabil ( $K_d = 1,86 \times 10^7$ ), ami arra utal, hogy ezen fehérjék kölcsönhatásának az egyszerű enzim-szubstrát-kölcsönhatáson kívül más biológiai funkciója is lehet.

#### P2-12

##### Vázizomtitin nanomechanikai vizsgálata erő-visszacsatolt lézercsippessel

Mártonfalvi Zs.<sup>1</sup>, P. Bianco<sup>2</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> Department of Evolutionary Biology, University of Florence, Florence, Italy

A titin a fél szarkomert áthidaló filamentáris fehérje, mely molekuláris rugóként, szarkomerikus templánként és feltehetően mechanoszenzorként funkcionál a harántcsíkolt izomban. A molekulát felépítő globuláris szerkezetű domének tandem ismétlődése miatt a titin kedvelt kísérleti modell az erővezérelt fehérjetekeredési vizsgálatokban. Mivel azonban a hagyományos mechanikai manipulációs kísérletekben az erő és a molekulahossz egyszerre változó paraméterek, a tekeredési mechanizmusok pontosabb megértése érdekében az egyik változót ideálisan konstans értéken kell tartani. Kísérleteinkben erővisszacsatolt lézercsippel segítségével állandó erőnél vizsgáltuk a titinmolekula tekeredési folyamatait. Állandó erővel ( $\sim 100$  pN) történő megnyújtás során a molekula kontúrhossza diszkrét lépésekben növekedett, ami az egyes globuláris domének sorozatos kitekeredését reprezentálja. Ezen diszkrét kontúrhossz növekmények alacsony erőnél ( $\sim 50$  pN) is megfigyelhetők voltak, esetleges alacsony mechanikai stabilitású domének jelenlétére utalva. Állandó erő ( $\sim 2$  pN) melletti relaxáció során a molekula rövidülése többfázisú, összetett erőválaszt mutatott, ami arra utal, hogy a kitekert polimer-lánc nem tisztán entropikus mechanizmusokon keresztül veszi fel alakját. A feltekeredett molekula újbóli megnyújtása során a doménkitekeredések ismét megfigyelhetők voltak. Állandó terhelés melletti ciklusos erő-rámpa-kísérletek során, a részlegesen kitekert molekula 2 pN erőig történő relaxációja során entropikus „féregszerű” láncként viselkedett, majd azonnali újra megnyújtása során nem tapasztaltunk szignifikáns doménkitekeredést. A teljes domén újratekeredéshez feltehetően hosszabb időt kell a molekulának alacsony erőnél ( $< 2$  pN) megrövidült állapotban töltenie. A kitekeredett titinmolekula rövidülését tehát nemcsak entropikus, hanem entalpiikus mechanizmusok is segítik, és a molekula hosszú ideig

diffundál a konformációs energiaprofilon, mielőtt térbeli szerkezete teljesen stabilizálódik.

#### P2-13

##### **Az LPFFD beta szerkezetromboló peptid hatása orientált A $\beta$ 25-35 hálózatra**

Murvai Cs. Ü.<sup>1</sup>, Kellermayer M. S. Z.<sup>1</sup>, Soós K.<sup>2</sup>, Penke B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> SzTE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged;

<sup>3</sup> MTA-SZTE, Szupramolekuláris és Nano-szerkezetű Anyagok Kutatócsoport, Szeged

Az amiloidfibrillumok olyan önszerveződő struktúrák, melyeknek kiemelt jelentőségük van bizonyos neurodegeneratív betegségekben és fehérjefelhalmozódással járó kórképekben. Az amiloid-beta 25-35 (A $\beta$ 25-35) peptid az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős teljes hosszúságú  $\beta$ -peptid biológiailag aktív, toxikus fragmentuma. Az A $\beta$ 25-35 peptid csillámfelszínen stabil, orientált hálózatot képez, így ezen egyszerű, reprodukálható rendszer lehetővé teszi különböző faktorok amiloid-peptidekre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Kimutatták, hogy úgynevezett beta-szerkezetromboló (*beta-sheet-breaker*, BSB) peptidok gátolják az amiloidképződést. Ámbár a BSB peptidoknak a jövőben ígéretes terápiás szerepük lehet, hatásmechanizmusuk nem egészen tisztázott. Jelen munkánkban az LPFFD (Lys-Pro-Phe-Phe-Asp) BSB peptidnek a csillámfelszínen orientált A $\beta$ 25-35 hálózatnövekedési kinetikájára, morfológiai és mechanikai tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk *in situ* atomerő-mikroszkóppal. A hozzáadott LPFFD enyhén módosította a fibrillumok felépülésének kinetikáját. A már meglévő fibrillumok nem estek szét magas koncentrációjú LPFFD hatására sem. A fibrillumok mechanikai stabilitását erőspektroszkópiás módszerrel vizsgáltuk. Az A $\beta$ 25-35-fibrillumok nanomechanikai viselkedésére erőlépcsők megjelenése jellemző, melyek a kifejtett erő hatására szétcipzározódó, illetve disszociálódó protofilamentumoknak felelnek meg. LPFFD jelenlétében egyszeres erőplatók domináltak. A fibrillumok felépülésére és stabilitására gyakorolt hatásuk alapján feltételezhető, hogy az LPFFD peptid enyhén fellazítja az amiloid-protofilamentumok közötti kölcsönhatásokat. Teljes fibrillumszétesést azonban nem figyeltünk meg. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az LPFFD nem tekinthető általános hatású beta-szerkezetrombolónak.

#### P2-14

##### **Az LC8 dinein könnyű lánc kölcsönhatása a miozin-5a és az EML3 fehérjével: térszerkezeti vizsgálatok**

Radnai L.<sup>1</sup>, Rapali P.<sup>1</sup>, Tichy-Racs A.<sup>1</sup>, Hetényi Cs.<sup>2</sup>, W. Wahlgren<sup>3</sup>, Katona G.<sup>3</sup>, Harmat V.<sup>4</sup>, Nyitray L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Biokémiai Tanszék, <sup>2</sup> Genetikai Tanszék, Budapest; <sup>3</sup> Department of Chemistry, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; <sup>4</sup> MTA-ELTE, Fehérjemodellező Kutatócsoport, Budapest

Az LC8 dinein könnyű lánc (DYNLL) erősen konzervált eukariótafehérje, melynek mára több tucat kölcsönható partnerét azonosították. Eredetileg a miozin-5a és a dinein alegységeként írták le, és feltételezték, hogy a kargókötésben játszik szerepet. Az újabb vizsgálatok tükrében olyan csomóponti fehérjének tekintjük, amely kötődésével szabályozza a vele kölcsönható fehérjéket. A DYNLL homodimer szerkezetű, és az alegységek kölcsönható felszínén kialakuló két parallel kötőárokba illeszkedik a partnerek nyolc aminosavból álló lineáris DYNLL-kötő motívuma, amelyet változtatott szekvencia és kötéserősség (100 nM < K<sub>d</sub> < 50  $\mu$ M) jellemez. A motívum egyetlen erősen konzervatív aminosava egy Gln, amelyet azonban Met helyettesít a miozin-5a-szekvenciában. A partnerek többsége fiziológiai körülmények között dimer, ennek megfelelően a DYNLL-kötő motívumok bivalens ligandumként, aviditással kapcsolódnak a DYNLL-hez. Az itt bemutatott munka során két DYNLL-kötőpartner komplex szerkezetét határoztuk meg. A miozin-5a-ból származó peptiddel alkotott komplex kristályszerkezeti modellje (1,8 Å felbontás) azt mutatja, hogy a nem kanonikus motívum is a többi ismert szerkezethez hasonlóan a DYNLL kötőárkában helyezkedik el. Ez valószínűtlenné teszi, hogy a DYNLL kargoadapter funkciót töltsön be, viszont a két miozin nehéz láncot összetartva stabilizálja a *coiled-coil* szerkezetű farokrégiót, és ezáltal szabályozhatja a szállítómotor működését. A szerkezet alapján magyarázni tudjuk a miozin-5a gyenge affinitását a kanonikus kötőmotívumokkal összevetve. Az EML3 (*echinoderm microtubule associated protein like*) az eddig ismert legnagyobb affinitású kötőmotívumot tartalmazza, amelyet *in vitro* evolúciós technikával találtunk meg. Az eddigi legjobb felbontású (1,3 Å) szerkezeti modell és molekuladinamikai szimulációk alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a komplex nagyfokú stabilitásáért a kötőárok alját alkotó peptidszakasz és a kötőmotívum között létrejött optimális  $\beta$ -szerkezet, valamint a kötőpeptid N-terminális végén található Val és az árok oldalán elhelyezkedő His oldallánc közötti kölcsönhatás tehető felelőssé. A DYNLL-EML3-kölcsönhatás biológiai szerepének megismerése további kutatásokat igényel. (OTKA K61784, NK81950)

#### P2-15

##### **Jósolható-e a kooperativitás a fehérjeszerkezet alapján?**

Szabó J. E., Merényi G., Vértessy B., Tóth J. MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A dUTPáz a DNS-integritás megőrzésében fontos nukleotid hidroláz enzim, mely ígéretes gyógyszer-célpont olyan jelentős betegségekben, mint a tuberkulózis vagy a rák. Az enzim homotrimer felépítésű, három aktív helyet tartalmaz. Egy aktív hely két alegység határán alakul ki, de a katalí-

zishez szükséges a harmadik alegység C-terminális nyúlványa is, amely beépül a szomszéd monomer központi  $\beta$ -redőjébe egy  $\beta$ -lánc segítségével. Az alegységek ily mértékű összefonódása felveti azt a kérdést, hogy a reakció során létrejövő szerkezeti változások révén nem befolyásolják-e az aktív helyek egymás működését. Ennek vizsgálatára hoztunk létre olyan kovalensen összekapcsolt trimereket, melyek alegységeibe külön-külön vihetők be mutációk. Az így előállított mutáns heterotrimerek szubsztrátkötési tulajdonságait és katalitikus hatékonyságát vizsgáltam spektroszkópiai és kinetikai módszerekkel. Eredményeink azt mutatják, hogy – bár az egyes heterotrimerek enzimatis paramétereiben van különbség – az aktív helyek működése között jelentős kooperativitás nincs. Így nyitva marad a kérdés, hogy milyen evolúciós hatásra jön létre egy ilyen bonyolultan összefonódott alegységszerkezet. A kooperativitás hiányából azonban következtetéseket vonhatunk le a dUTPáz-szabályozás és -anyagcsere tekintetében.

## P2-16

### Egyláncú ecotin bemutatása fágon

Szakács D., Héja D., Pál G.

ELTE, Biokémiai Tanszék, Budapest

Az ecotin az *E. coli* periplazmatikus, homodimer szerin proteáz inhibitor fehérjéje. Az ecotin egyedülálló tulajdonsága a szubsztrátszerű inhibitorok között, hogy számos olyan enzimet gátol a  $10^{-9}$ - $10^{-13}$ M-os tartományokba tartozó  $K_1$ -vel, amely enzimek szubsztrát-specifitása egymástól jelentősen eltér. Az ecotin monomernek kétféle (elsődleges és másodlagos) proteáz-kötő felszíne van. A dimer ecotin egyidejűleg két proteázt köt úgy, hogy egyszerre mindkét proteáz mindkét monomerhez kapcsolódik, az egyikhez az elsődleges, a másikhoz a másodlagos kötőhelyen. Ez a hálózatos kötésrendszer szerepet játszhat az ecotin széles specifitásban. A széles specifitás molekuláris háttere a kötőhelyek szisztematikus mutagenézisével térképezhető fel. A fág-bemutatással történő irányított evolúció kiválóan alkalmazható lenne a jelenség hátterének felderítésére, ha az ecotint garantáltan dimer formában tudnánk megjeleníteni fág-felületen. Létrehoztunk egy olyan egyláncú (Single Chain, SC) ecotint, amelyben az egyik monomer C-terminálisát egy megfelelő linkerrel keresztül összekötöttük a másik N-terminálisával. Az SC ecotin a vad típussal egyenértékűen működőképes. Kétféle burokfehérje és kétféle promóter kombinációiban vizsgáltuk, hogy az SC ecotin milyen hatékonysággal jeleníthető meg M13 bakteriofágban. Igazoltuk, hogy az SC ecotin mindegyik esetben működőképes a fág felületén. Terveztünk egy félszintetikus SC ecotin gént, amelynek egyik felét csendes mutációkkal a lehető legnagyobb mértékben megváltoztattuk annak érdekében, hogy a mutagenézis során az egyes primerek

egyedi helyeken tapadjanak le. Igazoltuk, hogy a félszintetikus gén két fele egymástól függetlenül változtatható. Az általunk létrehozott rendszer lehetővé teszi, hogy feltérképezzük az ecotin széles specifitásának molekuláris hátterét. Segítségével, szűkebb vagy eltérő specifitású ecotin variánsokat is kifejleszthetünk akár olyan enzimek ellen is, amelyeknek jelenleg nincs ismert inhibitoruk.

## P2-17

### A transzglutamináz 2 és az MFG-E8 fehérjék interakciójának vizsgálata

Szakál Z. T.

DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

A transzglutamináz 2 (szöveti transzglutamináz, TG2) multifunkcionális fehérje, amely számos biológiai folyamatban vesz részt, mint a sejtmozgás, sejtadhézió, apoptózis és fagocitózis. A TG2 négy doménből álló összetett protein: N-terminális  $\beta$ -szendvics, katalitikus centrum és két C-terminális  $\beta$ -hordó szerkezetű doménnel rendelkezik. Munkacsoportunk korábbi kutatásai kimutatták, hogy a transzglutamináznak szerepe van egy hatékony fagocitáló kapu kialakításában az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok membránjában. A fagocitózis során a TG2 az integrin  $\beta$ -3 mellett egy makrofágok által szekretált MFG-E8-molekulával (*milk fat globule-epidermal growth factor 8*) alkot komplexet. Az MFG-E8 olyan opszonizáló molekula, amely hidat képez az apoptotikus sejtek felszínén megjelenő foszfatidil-szerin és a makrofágok felszínén lévő integrin  $\beta$ -3 között. Ez a közvetett kapcsolat fokozza az apoptotikus sejtek felvételét. Kísérleteinkben célul tűztük ki a specifikus interakcióért felelős TG2-felszín azonosítását különböző doméndeletált humán TG2-mutánsok BIAcore (felületplazmon-rezonancia) vizsgálatával. Feltételezünk szerint a kötődési hely a molekula felszínének kisebb területére korlátozódik, így a vizsgált mutáns fehérjék az említettek közül 1-1 domént nem tartalmaztak. Az enzim különböző deléciós konstrukcióit pGEX-2TK-plazmidba klónoztuk. Az inzert DNS-méretének, -orientációjának és -szekvenciájának ellenőrzése után *Escherichia coli* BL21-törzsben termeltettük a fehérjéket GST-fúziós formában. Az enzimet gravitációs affinitás-kromatográfiával tisztítottuk és *Western blot* módszerrel azonosítottuk. A TG2 és MFG-E8 molekuláris interakciójának vizsgálatát különböző MFG-E8-koncentrációk mellett BIAcore 3000 készülékkel CM5 chipen végeztük. Továbbiakban tervezzük a doméneken belül a pontos kötőhelyek meghatározását, és ezek mutációjával a kötődés elmaradásának hatásvizsgálatát az apoptotikus sejt felvétel folyamán.

## P2-18

### Az I-es típusú humán immundeficiencia-vírus többszörös kapszidmutánsainak „*in vitro*” vizsgálatai

Tóth F.

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

A HIV-1 kapszid (CA) fehérjéje enyhén savas közegben szubsztrátja a virális proteáznak és a hasítása feltételezhetően hozzájárul a receptor-mediált endocitózis-útvonalon belépő virion dekapzidációjához. A folyamat vizsgálatára a korábbi egyszeres mutánsokon történt kísérleteink alapján olyan többszörös CA mutánsokat állítottunk elő, melyek hasítása fokozott mértékű (A78V/L189F) vagy blokkolt (W23A/A77P/L189P és W23A/A77P/L189I/L190K). A mutációkat helyspecifikus mutagenézissel rekombináns, *N*-terminálisan hisztidineket kódoló CA fehérje bakteriális expressziós konstrukcióban, valamint HIV-1 alapú, harmadik generációs vektor-rendszerben hoztunk létre. A mutáns fehérjéket *Escherichia coli*-sejtekben expresszáltuk, affinitás-kromatográfiával tisztítottuk, majd a korábban a vad típusú kapszidnál

is alkalmazott körülmények között vizsgáltuk a proteolízis hatékonyságát. A hasításokat SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel, illetve MALDI-ToF analízissel ellenőriztük. Módosított harmadik generációs vektorrendszer segítségével 293FT-sejtek transzfekciójával mutáns kapszidfehérjéket hordozó virionokat termeltünk. A vírustartalmú felülúszók koncentrációja és vírus-tartalmának meghatározása után 293FT-sejteket transzdukáltunk, majd a GFP-termelő sejtek számát áramlási citométerrel vizsgáltunk a fertőzőképesség megállapításához. A mutáns fehérjék „*in vitro*” proteázal történt hasításai alapján elmondhatjuk, hogy az A78V/L189F-mutánsnál a proteolízis fokozódását, míg a másik két mutáns esetében annak gátlását figyeltük meg. A fertőzőképességi vizsgálatok alapján elmondható, hogy a mutánsok mindegyike jelentősen csökkent fertőzőképességű. A gátló mutációk estében feltételezzük, hogy a csökkent proteolízis következtében a virionban lévő RNS nem hozzáférhető a reverz transzkripció számára, míg a fokozó mutációnál észlelt csökkent fertőzőképesség valószínűleg a kapszidburok stabilizáló szerepe is szükséges lehet.

## P3 – Bioinformatika, hálózatok

### P3-01

#### Bayes-i módszerek skálázásának vizsgálata teljesgenom-asszociációs elemzésekben

Gézi A.<sup>1</sup>, Antal P.<sup>2</sup>, Hajós G.<sup>2</sup>, Millinghoffer A.<sup>2</sup>, Szalai Cs.<sup>3</sup>, Falus A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>3</sup> MTA-SE, Gyulladásbiológiai és Immunogenomikai Kutatócsoport, Budapest

A humán genom szekvenálása lehetővé tette a több millió egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) olyan informatív részhalmozásának meghatározását, amely alkalmas a teljes genomot lefedő asszociációs vizsgálatok (GWAS) elvégzésére is. Az eddigi kísérletek számos új, replikálható asszociációt tártak fel a gyakori genetikai variánsok és különböző fenotípusos jegyek (pl. komplex betegségek) között, ennek ellenére széles körben elfogadott nézet, hogy a humán genomban található variációk hatása nagy mértékben ismeretlen. A „gyenge” eredményeket több tényező is indokolja: a kísérlettervezésénél nem hasznosítják a rendelkezésre álló biológiai háttér tudást, az értékelésben legtöbbször egyszálós módszereket használnak, illetve figyelmen kívül hagyják a környezeti hatásokat. E problémák kiküszöbölésére terjedőben van az olyan többváltozós módszerek használata, amelyek az egyenként gyenge faktorok együttes hatásának valószínűségi és oksági kapcsolatait próbálják feltérképezni a gén-gén- és a gén-környezet-hatások modellezésével. Korábban javasoltuk Bayes-hálókat használni a génasszociációs vizsgálatok többszin-

tű analízisére (BMLA) [Antal *et al.* (2008) *JMLR Proceeding*, 4: 74-89], a teljesgenom-asszociációs vizsgálatokra jellemző adatmérték ( $10^6$  változó,  $10^4$  számú minta) és az ebből eredő számítási komplexitás azonban nehezíti ezen módszerek használatát. A tanulmányban megvizsgáljuk a bayes-i módszerek skálázhatóságát. Célunk pontosabban egyváltozós módszerekkel előszűrt változók mélyelemzése BMLA módszerrel és a *shotgun* BMLA-elemzés bemutatása, amely egy beágyazott dekomponálási módszernek az elemzési fájlban történő ígéretes alkalmazása, kihasználva a számítástechnikai párhuzamosítási lehetőségeket.

### P3-02

#### A Genagrid bioinformatikai szolgáltatás genetikai asszociációs elemzések támogatására

Antal P.<sup>1</sup>, Hajós G.<sup>1</sup>, Szalai Cs.<sup>2</sup>, Falus A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> MTA-SE, Gyulladásbiológiai és Immunogenomikai Kutatócsoport, Budapest; <sup>3</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

A mérés technika fejlődésével az 1990-es évek közepétől a jelöltgén-asszociációs (CGAS), majd a 2000-es évektől felfutó teljesgenom-asszociációs (GWAS) után mára az újgenerációs szekvenálási módszereken alapuló genomiális asszociációs kísérletek is egyre elterjedtebbek. A statisztikai elemzések ennek megfelelően egyre inkább támaszkodnak a meglévő háttér tudásra, génannotációkra és -ontológiákra, útvonal-adatbázisokra, génszabályozási hálózati ismeretekre vagy fehérje-fehérje inter-

akciókra. Tudásgazdag volta mellett a statisztikai elemzések számítási intenzitása is egyre kifejezettebb, ami az asszociációs elemzéseket kiegészítő, felváltó hálózati elemzési módszerek terjedésének is köszönhető [Antal et al. (2008) *JMLR Proceeding*, 4: 74-89]. Az előzőekre tekintettel fejlesztettük ki a genetikai asszociációs elemzéseket támogató, az interneten keresztül is elérhető Genagrid statisztikai csomagot. A rendszer a következő, egységes funkcionális láncot alkotó modulokból áll: újgenerációs szekvenálási adatok előfeldolgozása, GWAS-adatok előfeldolgozása, haplotípus-rekonstrukció, CGAS-adatok interakciókat és oksági relációkat kezelő hálózati elemzése, asszociációs relációk parametrikus vizsgálata, asszociációs relációk gén és útvonal szintű vizsgálata, metaelemzések és több elemzés tudásgazdag értelmezése, szekvenciális kísérletek tervezése. Bemutatjuk a statisztikai csomag funkcióit, amit különböző felhasználási területekről származó példák segítségével illusztrálunk. (NKTH TECH-08-A1/2-2008-0120 (Genagrid), OTKA PD-76348, MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj – Antal P.)

### **P3-03 Bayes-háló alapú adaptív kísérlettervezés parciális genomszűrésű kísérletekhez**

Hajós G.<sup>1</sup>, Antal P.<sup>1</sup>, Szalai Cs.<sup>2</sup>, Falus A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> MTA-SE, Gyulladásbiológiai és Immunogenomikai Kutatócsoport, Budapest;

<sup>3</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

A genetikai asszociációs kísérletek többlépcsős jellege döntéstámogatási eljárásokat tesz szükségessé a szekvenciális kísérlettervezésben [Chow and Chang (2008) *Orphanet J. Rare Diseases*, 3: 11.1-13]. Bemutatunk egy bayes-i szekvenciális kísérlettervező eszközt, melyet szekvenciális parciális genomszűrésű kísérletekből származó adatokon alkalmaztunk az asztma területén. Segítségével a szekvenciális kísérlet során adaptívan csökkentjük a vizsgált változók számát és akár a szükséges minták számát is, ezzel csökkentve a költségeket. A mintagyűjtés anyagi, orvosi és egyéb költségei miatt az adaptív kísérlettervezés hagyományosan a mintaméret intelligens megválasztásával minimalizálja a költségeket, fix változóhalmazzal és statisztikai tesztet feltételezve. A bayes-i megközelítés olyan lehetőségeket kínál, melyek jól illeszkednek a tudásgazdag orvosi biológiai megközelítéshez, az informatív priorok és hasznosságok segítségével. Az általános bayes-i keretet már sikerrel alkalmazták a mintaméret adaptív megválasztása céljából is klinikai kísérletek tervezése során, amely a jelen munka kisebb változós számú, egyváltozós előzményének tekinthető [Cheng and Shen (2005) *Biometrika*, 92 (3): 633-646]. Az optimális szekvenciális döntéseket végrehajtó eljárást valós adatokon értékeltük ki, más bayes-i többszintű elemzésen (BMLA) alapuló heurisztikával együtt. Az eredmények azt mutatják, hogy az asztma területén, négylépcsős

szekvenciális kísérlet esetén, az optimális szekvenciális lépéseket követve, a mérések fele elegendő a releváns változók és azok interakcióinak felkutatására.

### **P3-04 Sorrendi fúziós algoritmusok alkalmazása klinikai genomikában**

Marx P.<sup>1</sup>, Antal P.<sup>1</sup>, Hullám G.<sup>1</sup>, Millinghoffer A.<sup>1</sup>, Szalai Cs.<sup>2</sup>, Falus A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> MTA-SE, Gyulladásbiológiai és Immunogenomikai Kutatócsoport, Budapest;

<sup>3</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

Bioinformatikai elemzésekben a legtöbb esetben heterogén adatok állnak rendelkezésre. Ez több okra is visszavezethető. Az egyes adatok, változók különböző szinteket képviselnek (pl. genetikai, proteomikai vagy akár lipidomikai változók). Sokszor nem lehet csak egy osztályváltozót meghatározni (klinikai változók esetén nehéz az erős összefüggések miatt csak egy változót célváltozóként kezelni), továbbá az is gyakori, hogy szisztematikusan hiányos adat érkezik, amikor a különböző pácienscsoportok esetén más adatok érhetőek el. Végül a heterogenitásnak a többféle elemzési módszer használata is lehet forrása. A következőkben egy tipikusnak mondható, két heterogén részre tagolódó elemzést vizsgálunk. Ebben egyrészt „omikai” adatok nagy dimenziós, *kernel* módszereket használó elemzése szerepel, melynek során egy pontszám-rangsorolást kapunk. A másik rész pedig útvonalakra vagy genomialis régiókra, génekre fókuszáló adatoknak egy részletesebb elemzése, amely már a változók közötti kölcsönhatásokra fókuszál. Először megvizsgáljuk egy egységes bayes-i elemzés lehetőségét. Másodszor módszereket mutatunk be, melyekkel a heterogén változókat egységes szintre (általában génszintre) lehet leképezni, és integrálni lehet az egyes elemzésekből származó eredményeket, beleértve az eltérő statisztikai megközelítésekéből származó permutációs statisztikákat és *a posteriori* eloszlásokat. Legvégül bemutatjuk a Gene Ontology alapú elemzésnek és a génhalmazok feldúsulásának elemzésének bayes-i kibővítését, melyek ebben a két részre tagolódó problémában alkalmazhatóak. A fent leírt elemzést az asztma genetikai hátterének kutatásához használjuk. (NKTH TECH-08-A1/2-2008-0120 (Genagrid), OTKA PD-76348, MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj – Antal P.)

### **P3-05 Rendezetlen fehérjék jellemzése bioinformatikai eszközökkel**

Dosztányi Zs., Mészáros B., Simon I.  
MTA SzBK, Enzimológiai Intézet, Budapest

A rendezetlen fehérjék natív állapotban sem vesznek fel jól meghatározott, háromdimenziós tér szerkezetet, hanem egy konformációs sokasággal írhatóak le. A rendelkezésre álló genomsekvenciák



analízise rámutatott arra, hogy ezek a fehérjék az ismert proteomokban – különösen eukariótákéban – meglepően nagy számban fordulnak elő. Ezek a rendezetlen fehérjék általában funkcionálisan is fontos szerepet töltenek be, különösen a transzkripcióban, a sejtciklus szabályozásban és a különböző jelátviteli útvonalakban – emiatt egyre hangsúlyosabb szerepet kapnak a legkülönbözőbb biológiai, molekuláris biológiai, patológiai és gyógyszertervezési kutatásokban. Mivel azonban a rendezetlen fehérjék kísérletes tanulmányozása nehéz és kihívásokkal teli feladat, kutatásukban különösen fontos szerepet töltenek be a különböző bioinformatikai módszerek. Jelen munkánkban áttekintjük a rendezetlenségbecslés fő módszereit, s az azokban használt adatbázisokat és alapelveket. Általánosságban a rendezetlen és rendezett részek viszonylag nagy hatékonysággal felismerhetők a szekvenciából már a jelenlegi módszerekkel is, különösen azok kombinálásával. A meglévő módszerek legnagyobb korlátja azonban, hogy a rendezetlenséget egységes jelenséggént kezelik, míg nagyon sok rendezetlen régió, mint például a rendezetlen kötőhelyek, a *molten globula*-szerű fehérjék vagy a *coiled coil* állapotú részek nem sorolható be egyértelműen a rendezetlen-rendezett kategóriákba. Példákon keresztül rámutatunk arra, hogy a rendezetlenség különböző aspektusait leíró predikciós eljárások kimenetének összevetésével finomabb felbontású információt is kinyerhetünk. A rendezetlen fehérjék pontosabb leírásához és megértéséhez azonban elengedhetetlen a fehérje-rendezetlenség heterogenitásának tekintetbe vétele, amihez szükség van specifikusabb tulajdonságokat leíró módszerekre is, melyeknek fejlesztése – a meglévő módszerekkel szemben – újabb szemléletű megközelítéseket igényel.

### P3-06

#### **A bizonytalan genotípusos és *in silico* rekonstruált haplotípusos adatok elemzésének lehetőségei modellátlagolással**

Sárközy P.<sup>1</sup>, Antal P.<sup>1</sup>, Balázs Z.<sup>1</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>2</sup>, Falus A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BME, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>3</sup> SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest

A genotípusos adatok relatív pontossága és diszkrét természete elrejti a mögöttük húzódó képfeldolgozás és klaszterezés komplexitását. Amíg expressziós adatok elemzésénél a zajmodellek használata a felhasználó számára is megszokott a hasonló jellegű normalizálási és jellemző kivonatolási problémák megoldásánál, addig mindez genotipizálási méréseknél, genetikai asszociációs vizsgálatoknál (GAS) a felhasználó elől rejtve marad. Bemutatjuk a probléma egy valószínűségi megközelítését a bizonytalanságok modellezésére, melyben explicit módon jelenítjük meg a minták eldobását valamint egy valószínűségi átlagoló rendszert a bizonytalan adatok kezelésére.

A mérési nehézségek mellett a bizonytalanság a haplotípus rekonstrukcióba is propagálódik, ezért bemutatjuk a PHASE (egy már létező haplotípus-rekonstrukciós eljárás) és a korábbi bayes-i modell alapú adatelemzésünk kétfázisú Monte Carlo integrálását. Az *in silico* haplotípusrekonstrukciót valódi experimentális haplotípusadatok segítségével kiértékeljük. A megvalósított keretrendszer lehetővé teszi a bizonytalanság propagálását a méréstől a haplotípus-rekonstrukción át az adat-elemzésig, ezáltal bővebb információt nyerhetünk a mérések elégségességéről. Továbbá bemutatjuk az esetszintű elemzés többváltozós interakciókat is potenciálisan kezelő haplotípus szintű kiterjesztését, amely magában hordozza a mintaméret megkétszerezésének lehetőségét.

### P3-07

#### **Turbine: programcsomag hálózatok jel és zajterjedésének vizsgálatára**

Szalay K.

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

Biokémiai és molekuláris biológiai tudásunk elemeinek hálózatokba integrálásával számos, az egész sejtre jellemző kérdést megválaszolhatunk. E kérdések egyike az, hogy a sejt mennyire képes a beérkező változásokat (jeleket és zajokat, összességében: zavarokat) disszipálni, azaz a sejten belüli hálózatokban szétterjeszteni és lecsengésüket elősegíteni. A zavarok terjedésének vizsgálata választ ad arra a kérdésre is, hogy a sejt folyamatai mennyire lesznek zajosak akkor, ha több jel érkezik egyszerre a sejthez vagy például az öregedés során. Munkánkban két sejten belüli hálózatot: fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózatot (interaktómot), illetve jelátviteli hálózatot vizsgáltunk. Ehhez matematikai modelleket és egy Turbine nevű programcsomagot dolgoztunk ki, amellyel az interaktómokban történő zavarterjedés, illetve jelátviteli hálózatok aktivációs mintáinak alakulása tetszőleges dinamikus modell szerint modellezhető. Munkánkban *in silico* vizsgáltuk *Saccharomyces cerevisiae* fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózatok, illetve humán jelátviteli hálózatok [Korcsmáros et al, (2010) *Bioinformatics*, in press] dinamikáját. A fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózatokban a legtöbb fehérjétől élesen elkülönül kétféle csomópont, az intermoduláris átkapcsolók (*date-hub*), és a modulkoordinátorok (*party-hub*) csoportja. Eredményeink szerint az előbbiekről induló zavar hatékonyabban disszipálódik, mint utóbbiakról, és mindkét csomóponttól induló zavar jobban lecseng, mint az átlagos fehérjékről induló ugyanolyan zavar. Munkánkban a hálózatok érdekes tanulási és öregedési jellemzőit is ki tudtuk mutatni.

## P4 – Molekuláris genetika – genomika

### P4-01

#### A *Candida albicans* CaPPZ1 gén megszakítása

Ádám Cs.<sup>1</sup>, C. Casado<sup>2</sup>, Petrényi K.<sup>1</sup>, Molnár M.<sup>3</sup>, J. Ariño<sup>2</sup>, Dombrádi V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DE OEC Orvosi Vegytani Intézet; <sup>2</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spanyolország; <sup>3</sup> NYF TTIK, Agrár és Molekuláris Kutató Intézet

A Ser és Thr oldalláncok defoszforilációját katalizáló protein foszfatáz Z csak gombákban fordul elő. *C. albicans* fajban egy protein foszfatáz Z1 (CaPPZ1) gén található, melynek funkcióját a gén megszakításával kívántuk meghatározni. A gén két alléljének megszakítása két homológ rekombináción alapuló lépésben történt. Kísérletünkhöz hisztidin- és leucinauxotróf *C. albicans* SN87-törzset használtunk fel. PCR segítségével olyan integrációs kazettákat állítottunk elő, melyekben a CaPPZ1 gén nem-kódoló régiói közrefogják a His1 (*His1PPZ1*), illetve Leu2 (*Leu2PPZ1*) szelekciós markergéneket. Az egyik allél megszakításához a *His1PPZ1* kazettával transzformáltuk az auxotróf törzset, majd a hisztidinre történő szelekció során kapott törzset használtuk a másik allél megszakításához. Ez utóbbit *Leu2PPZ1* kazettával transzformáltuk, és minimáltáptalajon szelektáltuk a megfelelő transzformánsokat. A gén megszakítását PCR segítségével igazoltuk. A megszakító kazetták nem megfelelő helyre történő integrációját *Southern blot* kísérlettel zártuk ki. Megvizsgáltuk a CaPPZ1-deléciós mutáns törzs sótoleranciáját, ozmotikus stabilitását és a toxikus kationokra adott válaszreakcióját. NaCl jelenlétében a génkiütésnek elhanyagolható hatása volt a sejtek növekedésére. LiCl jelenlétében a mutáns sejtek jobb növekedést mutattak a vad típusú sejteknél, ami a CaPPZ1 sótoleranciában való szerepére utalhat. A mutáns szintén toleráns volt a hygromycin B és spermintoxikus kationokra, ami valószínűleg a sejtek csökkent membránpotenciáljával magyarázható. Mivel a mutáns kisebb mértékű növekedést mutatott a vad típushoz képest KCl, koffein, *calcofluor white* és kongóvörös jelenlétében, a CaPPZ1-nek szerepe lehet a sejtfal integritásának fenntartásában. (OTKA K68765 és TÉT ES-22/2008)

### P4-02

#### Előzetes adatok az alma viaszoltságában szerepet játszó gének expressziójáról

Albert Zs.<sup>1</sup>, Deák Cs.<sup>1</sup>, Miskó A.<sup>1</sup>, Tóth M.<sup>2</sup>, Papp I.<sup>1</sup>

BCE KTK <sup>1</sup> Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék, <sup>2</sup> Gyümölcstermő Növények Tanszék, Budapest

Az alma (*Malus domestica*, Borkh.) hazánk legnagyobb mennyiségben termesztett és fogyasztott gyümölcsfaja. A friss piacokon számos fajtakörrel és fajtával találkozhatunk, melyek számos külső és belső tulajdonságban térnek el egymástól, így nagyfokú eltérések találhatóak a fajták között a ter-

mésviaszoltságban is. Az alma termésének viaszoltsága több élettani folyamatban kulcsszerepet játszik, gátolja a termés vízvesztését és több patogén ellen is védelmet biztosít. Emellett ez a tulajdonság befolyásolja a fogyasztói fogadtatást is. Míg több növényfaj esetében a vonatkozó anyagcsere-folyamatok és bioszintetikus utak jól feltártak, az alma esetében gyakorlatilag alig áll rendelkezésre az ezen folyamatok genetikai hátterére vonatkozó adat. A lúdfű (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynch.) esetében megállapították, hogy a kutikuláris viaszréteg kialakításában szerepet játszó ún. nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (VLCFA) bioszintézisében a 3-ketoacil-CoA-szintáz (KCS) géncsalád tagjai döntő szerepet játszanak. A lúdfűben dokumentált eredmények alapján ezek az enzimek több különböző, gazdaságilag jelentős növényfajban bizonyultak meghatározónak. Vizsgálatunkban a lúdfű KCS gének almabeli analógjait vizsgáljuk, és arra keressük a választ, hogy meghatározható-e ezek alapján, hogy a vizsgáltak közül mely gének játszhatnak döntő szerepet az almatermés viaszoltságának kialakításában. Előzetes eredményeink szerint meghatároztunk kilenc alma-konszenzusszekvenciát, melyek feltehetően KCS géneket kódolnak. Ezek szervespecifikus kifejeződésére vonatkozó kísérleteket kezdtünk.

### P4-03

#### Hisztion-acetiltransferáz-inhibitor II- (HATi II) kezelés hatása az egyes hisztion-lizinoldallancok acetiláltságára

Tóth M., Gyenis Á., Bálint É.  
BZAKKA, BAYGEN, Szeged

A hisztion acetiltransferáz (HAT) enzimek szabályozatlan működése gyakran szerepet játszik számos humán kórkép, pl. a rákos megbetegedések és a neurodegeneratív betegségek kialakulásában. Ezért a HAT-ok és a hisztion deacetylázok (HDAC) terápiás beavatkozások új molekuláris célpontjai. Egyre több HDAC-inhibitor van klinikai kipróbálás fázisában, és hatékonyan indukálnak sejtdifferenciációt, növekedésleállást, illetve sejthalált szelektíven daganatsejtekben. A HAT-inhibitorokat ez ideig kevésbé tanulmányozták, azonban elengedhetetlen, hogy klinikai kipróbálásuk előtt megismerjük egyes génekre specifikus és teljes genomra kiterjedő hatásait. A hisztion-acetiltransferáz-inhibitor II-t [2,6-bisz-(3-bróm-4-hidroxi-benzilidén)-ciklohexanon] a p300 HAT aktivitásának hatékony (IC<sub>50</sub> = 5 µM), szelektív és sejtporózus inhibitoraként azonosították. Csökkentette a hisztion H3-acetilációját HeLa-sejtekben, és kromatinkondenzációt okoz. Csoportunk emlőcarcinoma-sejteken tanulmányozta a HATi II-kezelésnek a sejtek életképességére, sejtciklusprofiljára és a sejthalálra gyakorolt hatását. A HATi II 40 µM feletti koncentrációban befolyásolta az S-fázisban lévő sejtek arányát, és apoptózist indukált. Elemeztük a HATi II egyes hisztion-lizinoldallancok acetilációjára gyakorolt hatását teljes genomra *immun-blot* technikával

és génspecifikusan kromatin-immunprecipitációval (ChIP). HATi II-kezelés a genom szintű acetiláció csökkenését eredményezte az összes vizsgált hiszton-lizinoldallánc esetében MCF7-sejtekben, de nem a gyógyszerrezisztens származtatott sejtvonalban. Azt a meglepő jelenséget tapasztaltuk, hogy egyes lizinoldalláncok acetilációja növekszik HATi II-kezelés hatására a *multidrug resistance 1* gén (*MDR1/ABCB1*) lókuszbán a gyógyszer-rezisztens sejtekben. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy mely HAT-ok kötődnek az *MDR1* promóterhez az érzékeny és a rezisztens sejtvonalban.

#### P4-04

##### **A p53 transzkripciót felügyelő faktorként be-töltött új szerepének vizsgálata**

Borsos B., Huliák I., Boros I.

*SzTE TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tan-szék, Szeged*

A tumorszupresszor p53 szekvensspecifikus transzkripció faktor, melynek a DNS-hibajavítás elősegítésével szerepe van a szomatikus mutációk kivédésében, valamint nagymértékű sejtkárosodás esetén az apoptózis indukciójában. Mindemellett úgy tűnik, hogy a p53 egy lehetséges, eddig részleteiben nem ismert funkciója, hogy transzkripció elongációs faktorként is képes működni azáltal, hogy az RNS polimeráz II enzimhez kötődve felügyeli a transzkripció folyamatát. Élesztő modellorganizmusban számos olyan gént tanulmányoztak, amelyeknek transzkripcióját a p53 közvetlenül nem befolyásolja, mégis hatással van a kifejeződésükre. Csoportunk ezek közül az *act1* és *ctk1* gének humán (*actb* és *cdk12*), valamint *Drosophila* (*act42a* és *CG7597*) homológjain vizsgálta a p53 kötődését kromatin-immunprecipitációval. Kísérleteink másik részében különböző koncentrációkban alkalmazott transzkripciót blokkoló ágenssel (aktinomycin D) kezeltünk humán és *Drosophila* S2-sejteket, majd kromatin-immunprecipitációval vizsgáltuk, hogy az aktinomycin D-kezelés okozta transzkripció gátlás milyen hatást gyakorol a p53 DNS-hez való kötődésére, valamint *Western blot* technikával követ-tük a p53 mennyiségi változását és szubcelluláris lokalizációját. Eredményeink azt mutatják, hogy p53-kötődés figyelhető meg az általunk vizsgált gének különböző szakaszain – így a gének 5' nem transzlálódó és a transzlációs startpont körüli szakaszán, valamint a 3' végén. Számos esetben ez a kötődés együtt jelenik meg az RNS polimeráz II DNS-kötésével, ezek alapján feltételezzük, hogy ezeken a DNS-szakaszokon a p53 együtt halad az elongáló RNS polimeráz II enzimmel. A kísérletesen előidézett transzkripció blokk hatására a géneken addig jelen lévő p53 leválik a DNS-ről, a fehérje stabilizálódik, felhalmozódva kijut a sejtmagból a citoplazmába, és részt vesz az apoptózis indukálásában.

#### P4-05

##### **Egy gombaspecifikus protein foszfatáz, a PPZ funkciójának tanulmányozása**

Dombrádi V.

*DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen*

A jelátviteli folyamatokban alapvető szerepet játszó új típusú protein foszfatázok egyik képviselője, a protein foszfatáz Z (PPZ) csak gombákban fordul elő. A genomadatbázisok és saját kísérleteink szerint a *Candida albicans*, *Emericella nidulans* és *Aspergillus fumigatus* gombafajokban csak egy PPZ gén található. A patogén gombák PPZ génjeinek funkcióját két stratégia segítségével kívántuk felderíteni. Indirekt megközelítésünk lényege az volt, hogy a korábban előállított és jellemzett élesztő (*Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe*) PPZ-mutánsokban kontrollált körülmények között expresszáltattuk az általunk vizsgálni kívánt foszfatázokat, és a mutánsok fenotípusának megváltozásából következtettünk a menekítő enzim szerepére. Fordított genetikai kísérleteinkben molekuláris biológiai módszerekkel célzottan inaktívtuk a *C. albicans* és *E. nidulans* PPZ génjét, majd megvizsgáltuk a deléciós mutánsok tulajdonságait. Mindkét megközelítés arra az eredményre vezetett, hogy a patogén gombákban a PPZ fontos szerepet játszik a sejtfal integritásának biztosításában, de a várakozással ellentétben kevésbé jelentős a sóháztartás szabályozásában. *C. albicans* tanulmányozása során felfigyeltünk *CaPPZ1* gén nagyfokú polimorfizmusára, és azonosítottuk a foszfatáz három új allélját. A gén 3' nem kódoló részén található hipervariábilis régió jellemzésére RFLP módszert dolgoztunk ki. Azt találtuk, hogy a hipervariábilis régió alkalmas lehet a klinikai mintákból izolált *C. albicans* genotipizálására és a gombafertőzés eredetének felderítésére. (OTKA K68765 és Tét ES-22/2008)

#### P4-06

##### **Az NR1I2 és a glikogén szintáz kináz 3β géneket tartalmazó kromoszómális régió ismétlődési egységének vizsgálata humán mintákban**

Elek Zs.<sup>1</sup>, Szántai E.<sup>1</sup>, Kovács-Nagy R.<sup>1</sup>, Faludi G.<sup>2</sup>, Rónai Zs.<sup>1</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>

*SE<sup>1</sup> Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet; <sup>2</sup> Kútvölgyi Klinikai Tömb, Budapest*

A humán genom egyedi variációinak új típusa a kópiaszám-polimorfizmus (CNV), a DNS-szekven-cia néhány kilobázistól megabázisig terjedő kiesése vagy amplifikációja. Irodalmi adatok szerint a *Gsk3β* gén kópiaszám-változásának szerepe lehet a klinikai depresszió genetikai hátterének meghatározásában. Munkánk során célul tűztük ki (1) hatékony eljárás beállítását, mellyel a CNV-k nagyszámú mintán megbízhatóan elemezhetők; (2) a polimorf (amplifikálódó) régió kiterjedése meghatározható; (3) a kidolgozott technikával kívántuk meghatározni, hogy *Gsk3β*-kópiaszám változása hozzájárul-e a klinikai depresszió örökletes hátterének meghatározásához. A CNV-k vizsgálatára két független módszert, egy *TaqMan*-próbák alkalmazásán, illetve valós idejű PCR módszerrel alapuló technikát

valamint egy hagyományos PCR- és multikapilláris elektroforézis rendszer elvén működő rendszert állítottunk be. A vizsgálatban 221 depresszióban szenvedő és 180 egészséges személy DNS-mintáját elemeztük. Megállapítottuk, hogy – megfelelő körülmények között – mindkét rendszer alkalmas a CNV-k elemzésére. A kidolgozott PCR-rendszerek segítségével vizsgáltuk a CNV kiterjedését. A két populációban eset-kontroll-analízissel elemeztük az amplifikáció gyakoriságát: irodalmi adatoknak megfelelően a polimorfizmus előfordulása nagyon ritkának bizonyult, ugyanakkor a gén amplifikációja gyakoribbnak bizonyult a depresszióban szenvedő betegek csoportjában.

#### **P4-07 miRNS-expresszióváltozás kimutatása microarray és nanokapilláris QRT-PCR technikával glioblasztómasejteken**

Faragó N.<sup>1</sup>, Ózsvári B.<sup>2</sup>, Hegedűs B.<sup>3</sup>, Puskás L.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> MTA SzBK, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged; <sup>2</sup> Avidin Kft., Szeged; <sup>3</sup> SE, II.sz. Patológiai Intézet, Budapest

Az utóbbi évek molekuláris biológiai kutatásainak egyik legjelentősebb eredménye a mikro-RNS molekulák (miRNS) felfedezése és jelentőségük felismerése volt. A miRNS-ek több alapvető sejtéletbeni folyamatban (például sejtproliferáció, -differenciáció, apoptózisszabályozás) meghatározó szerepet játszanak. Expressziós mintázatuk a differenciálódás, illetve különböző kórfolyamatok során megváltozhat, valamint irodalmi adatok mutatnak arra is, hogy a miRNS-ek szabályozó szerepet töltenek be a különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában. Vizsgálatainkhoz 8 különböző humán glioblasztóma-sejtvonalat (GBM1, GBM2, GBM3, GBM4, GBM5, GBM6, U87, U373) használtunk. Célunk irodalmi adatok alapján kiválasztott telítetlen zsírsavak (DHA, AA, GLA, TMZ), illetve különböző tumorelles anyagok *mir*-expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálta volt, valamint olyan miRNS-markerek azonosítása, amelyek változása korrelál a kezelésekkel. Ehhez 800 specifikus próbát tartalmazó humán miRNS-*chipeket* valamint *OpenArray*<sup>TM</sup> nanokapilláris kvantitatív valós idejű PCR (BioTrove) technikát alkalmaztunk. A BioTrove-analízishez saját paneleket hoztunk létre, melyek egyenként 112 *TaqMan* alapú miRNS-*assayt* tartalmaztak. A vizsgált sejtvonalak mindegyike humán glioblasztóma-sejtvonal volt, azonban mivel ezekben eltérő biokémiai mechanizmusok működnek, így a kezelésekre adott válasz erőssége is különböző, amely többek közt az eltérő miRNS-mintázattal magyarázható. 24 órás kezelést követően túlexpressziót tapasztaltunk a *miR-20b*, *miR-26a* és a *miR-149* esetében, repressziót pedig a *miR-16*, *miR-17*, *miR-30c* és még néhány általános apoptózismarker esetében.

#### **P4-08 A protein foszfatáz 2A B' regulátor alegységével kölcsönható fehérjék vizsgálata rizsben** Farkas I.<sup>1</sup>, Ábrahám E.<sup>2</sup>, P. Yu<sup>2</sup>, Dombrádi V.<sup>1</sup>,

Dudits D.<sup>2</sup>, Horváth G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen; <sup>2</sup> MTA SzBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged

A protein foszfatáz 2A (PP2A) C katalitikus alegységből (PP2Ac) és A szabályozó alegységből álló dimerjéhez változatos B (B, B', B'') regulátor alegységek egyike kapcsolódhat, ami meghatározza a holoenzim szubsztrátspecificitását és sejten belüli eloszlását. Állatokban a PP2A számos sejt folyamatban vesz részt, többek között a retinoblasztóma (Rb, p107, p130) fehérjét is defoszforilálhatja, és így az Rb/E2F jelátviteli útvonalon keresztül a sejtciklus G1/S-átmenetét szabályozza. Rizsben két retinoblasztóma-szerű fehérje található, az OsRBR1 és az OsRBR2, melyek különböző felhalmozódást mutatnak az osztódó és differenciált szövetekben. Korábban azt tapasztaltuk, hogy a rizs egyik PP2A B'' alegysége (OsPP2A B'') élesztő-kéthibrid rendszerben kölcsönhatásba lépett az osztódó sejtekben nagy mennyiségben jelen lévő OsRBR1 fehérjével. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az egyszikű növényekben a PP2A szerepet játszhat az Rb-szerű fehérjék regulációjában. A OsPP2A B'' szerepének további vizsgálatához rekombináns His6-fúziós rizs PP2A B''-t állítottunk elő, és ez ellen poliklonális antitestet termeltettünk nyúlban. Az ellenanyaggal sikerült ko-immunprecipitálni a rizs PP2Ac-t. A B'' alegységgel együtt kicsapódó PP2Ac izoforma azonosítása további vizsgálatokat igényel. Kimutattuk, hogy az immunprecipitált foszfatáz *in vitro* defoszforilálja az OsRBR1 és az OsRBR2 C-terminális peptideket. Glutathion-S-transzferáz (GST) fúziós OsPP2A B'' felhasználásával, 'pull down' kísérlettel igazoltuk, hogy a B'' alegység nemcsak a PP2Ac-vel hat kölcsön, hanem az OsRBR1-gyel is. Az OsRBR2 kötődését sejtuszpenziós kivonatból specifikus ellenanyag hiányában nem tudtuk ellenőrizni. A fentiekkel összhangban a GST-OsPP2A B'' képes volt megkötni a His6-OsRBR1-t, továbbá a His6-OsRBR2-t is. A B'' alegységhez kapcsolódó fehérjék mennyisége megnőtt Ca<sup>2+</sup> jelenlétében. A kölcsönhatás Ca<sup>2+</sup>-függése összhangban van az OsPP2A B''-ben található két EF-kéz motívummal. (OTKA-NK-69227)

#### **P4-09 Hisztonacetilációs mintázatok vizsgálata génaktiváció során *Drosophila melanogaster*ben** Gáspár R., Zsindely N., Kristó I., Boros I., Bodai L. SzTE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A kromatinszerkezet módosításai jelentős szerepet játszanak az eukarióta génkifejeződés szabályozásában. A nukleoszómális hisztonok acetilációja az egyik legintenzívebben vizsgált kromatinmódosítás. Többféle elmélet született a hisztonacetiláció transzkripció hatásának magyarázatára. A korai elképzelések szerint az acetiláció a DNS-hisztonkölcsönhatás gyengítése által, kumulatív módon hat a transzkripcióra; míg a hisztonkód-hipotézis szerint a specifikus módosítások transz-hatású faktorok kötőhelyeinek befolyásolása által szigorúan meghatározott eredményre vezetnek. Ebben a

kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a génműködés során *in vivo* megfigyelhető acetilációs mintázatok melyik hatásmodell érvényességét támogatják. A hiszton-acetilációs mintázat génaktivációt kísérő változásait vad típusú ecetmuslicákban vizsgáltuk a bábozódást megelőző ekdizonhullám során az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizonfüggő géneken. Meghatároztuk a két gén három promóteréről átirított transzkriptumai mennyiségi változásait a harmadik lárvastádium során, majd az itt kiválasztott, génaktiváció szempontjából érdekes időpontokban kromatin-immunoprecipitációval (ChIP) vizsgáltuk a hiszton-acetiláció változásait. A ChIP kísérletekben mindkét génen megfigyeltük a H3- és H4-hisztonok acetilációját több *N*-terminális aminosav oldalláncon is. Hogy az egyes módosítások szerepéről további információt nyerjünk, az acetiláció mértékét a gének különböző funkciójú területein (promóter, 5' illetve 3' kódoló régió) követtük nyomon. Eredményeink alapján a módosítások három csoportba oszthatóak: I. génaktiváció-függő módon jelennek meg specifikus régiókban; II. génaktivációtól függőek, de régió specifitást nem mutatnak; III. specifitást nem mutató módosítások. Feltételezésünk szerint az I. csoportba tartozó módosítások a hisztonkód-hipotézis feltételezéseinek megfelelő hatást közvetíthetnek; míg a II. és III. csoportba eső módosítások általánosabb, transzkripció kompetenciát kialakító hatással bírhatnak.

#### P4-10

##### **Az RNS-csenedesítés gátlása az Argonaute1 fehérje szintjének szabályozásával vírusfertőzött növényekben**

Várallyay É., Válóczy A., Ágyi Á., Burgyán J., Havelda Z.

*Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Növényi Virologiai és Bioinformatikai Csoport, Gödöllő*

Vírusfertőzés hatására a gazdanövényben indukálódik az RNS-csenedesítés folyamata, mely során kis interferáló (si)RNS-ek képződnek. A siRNS-ek beépülnek az Argonaute1 (AGO1) fehérjébe, amely az RNS-csenedesítés központi végrehajtó molekulája. A siRNS-sel töltött AGO1 a védekezési rendszer részeként a vírus-RNS-ek hasítását eredményezi. A növény AGO1-szintjét több tényező is, köztük egy mikroRNS (miR168) szabályozza. A vírusfertőzési folyamatok tanulmányozása során kimutatható volt az AGO1 mRNS és a *miR168* expressziójának emelkedése. Megállapítottuk, hogy az AGO1 mRNS a gazda védekezési reakciójának következtében nő meg, míg a megemelkedett *miR168*-szint a vírus elmentésének a következménye. A vírusfertőzött növények AGO1 fehérjéjének vizsgálata azonban azt mutatta, hogy a megnövekedett mRNS-szint nem jár együtt az AGO1 fehérje szintjének emelkedésével. Mivel a vírusfertőzés során mi nem találtunk AGO1 eredetű hasítási terméket, mi több az AGO1 mRNS-szint növekedést mutatott, úgy gondoljuk, hogy a vírusfertőzés során megemelkedett *miR168* transzlációsan gátolja az AGO1 mRNS-t. Kísérleteink során különböző stratégiákkal bizonyít-

tottuk, hogy vírusfertőzött növényekben a *miR168* valóban transzlációs gátlással szabályozza az AGO1 mRNS mennyiségét. A növények géncsenedesítés alapú védekező válaszána elkerülésére a vírusok különböző szupresszor molekulákat fejlesztettek ki, melyek ezt a folyamatot más-más szinten képesek gátolni. Modellvírusunk a *Cymbidium gyűrűsfoltosság-vírus* (CymRSV) szupresszora a p19 fehérje, mely géncsenedesítést gátló mechanizmusának alapja az, hogy megköti a 21 nt hosszúságú siRNS-duplexeket, így azok nem tudnak beépülni a végrehajtó rendszerbe. Tranzien rendszerben vizsgáltuk a p19 hatását és kimutattuk, hogy a siRNS-kötő tulajdonságán kívül egy másik általános folyamatban is részt vesz, jelenléte megemeli az endogen *miR168* szintjét és annak hatásán keresztül lecsökkenti a fő végrehajtó molekula, az AGO1 koncentrációját.

#### P4-11

##### **A szerotonintranszporter génasszociáció elemzése gyermekpszichiátriai zavarok körében**

Horváth E. Zs.<sup>1</sup>, Kenézli E.<sup>2</sup>, Tárnok Zs.<sup>2</sup>, Gádos J.<sup>2</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>, Nemoda Zs.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest; <sup>2</sup> Vadaskert Kórház és Szakambulancia, Budapest

A gyermekkorban kialakuló pszichiátriai zavarok jelentős részénél kimutatható a központi idegrendszerben a gátlási funkciók (talamokortikális gátló körök) érése elmaradása: akaratlan mozgások a Tourette-szindrómában (TS), kényszer-cselekvések és -gondolatok az kényszerbetegségnél (*obsessive compulsive disorder*, OCD), valamint impulzivitás figyelhető meg a figyelemhiányos hiperaktív betegség (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) esetén. Ezek a neuropszichiátriai zavarok gyakran fordulnak elő együtt, egy spektrumot alkotva. A monoaminrendszereknek (dopamin, noradrenalin, szerotonin) feltehetően fontos szerepük van mindhárom zavar kialakulásában, mivel a talamokortikális körök működését szabályozzák. Mivel a szerotonin közrejátszik az agy fejlődésében is, kandidáns géneként a szerotonin transzporter génjét (*SLC6A4*) választottuk a kutatásunkhoz az ADHD-TS-OCD spektrumon. Vizsgálatunkban 417 gyerek vett részt (fiúk aránya 82,8%, átlagéletkor 11,68 ± 4,27, fődiagnózis szerinti eloszlás 195 ADHD, 116 TS, 106 OCD). A diagnózisokat a DSM-IV szerint, a kísérő kórképeket a MINI-kid (Mini-International Neuropsychiatric Interview, child version) segítségével állapítottuk meg. Az *SLC6A4* gén promóter régiójában és a 2. intronjában található hosszúságpolimorfizmusok (*5HTTLPR* és *Stin2*) mellett további négy egy pontos nukleotid-polimorfizmust (rs25531, rs25532, rs2020933 és rs16965628) genotipizáltunk. Az ADHD, TS és OCD fődiagnózisok szerinti eset-kontroll-elemzésekhez magyar átlagpopuláció genotípus-frekvencia adatait használtuk. A klinikai csoporton belül a tic, szorongás és kényszertünetek jelenléte-hiánya szerint végeztük az elemzést. Egyik szerotonerg polimorfiz-

mus sem mutatott szignifikáns asszociációt a vizsgált fenotípusokkal. Haplotípus-elemzésünknel sem láttuk kiemelkedő hatást egy allélkombinációnál sem. Következtesül elmondhatjuk, hogy eredményeink nem támasztották alá a gyermekkori szorongásos kórképekben a szerotonin transzporter kandidáns gén szerepét. (OTKA F67784)

#### P4-12

##### **Indukált pluripotens őssejtek (iPS) létrehozása *Sleeping Beauty* transzpozon/transzpozáz alapú rendszerrel**

Kajdi R., Simándi Z., Grabundzija I., Izsvák Zs., Ivics Z., Nagy L.  
*DE OEC, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin*

Az alap kutatás és az őssejtek jövőbeni terápiás célú alkalmazása szempontjából jelentős áttörést hoztak 2006-ban a Yamanaka-munkacsoport által elért eredmények, akik egy terminálisan differenciálódott sejttípusba (felnőtt egérből származó fibroblasztsejtek) négy meghatározott transzkripciós faktor visszajuttatásával (Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc) olyan sejteket hoztak létre, melyeknek embrionális őssejt morfológiájuk volt. Ezek a sejtek epigenetikai, génkifejeződési és funkcionális vizsgálatokkal igazoltan is egyeztek az embrionális őssejtek tulajdonságaival, ezért indukált pluripotens őssejteknek (iPS) nevezték el őket. Azóta számos génbeviteli eljárással sikerült egér és humán iPS-t létrehozni, próbálva csökkenteni a genetikai beavatkozás mértékét, ami elengedhetetlen a későbbi terápiás célú alkalmazásukhoz. Kísérleteimben egy, az erre a célra potenciálisan alkalmas transzpozon alapú rendszert teszteltem és karakterizáltam. Embrionális egérfibroblasztok izolálását követően a *Sleeping Beauty* transzpozonrendszer segítségével, transzfekcióval vittem be a sejtekbe a transzkripciós faktorokat. A transzfekciót követően 5-6 nap után morfológiai szintű változások jöttek létre, majd 10-12 nap múlva embrionális őssejtekhez hasonló morfológiát vettek fel az addigra kialakult kolóniák. Ekkor történt meg a kolóniakiválasztás és -felvétel, majd a dajkasejtrétegre (osztódásában mitomycin C-vel gátolt SNL immortalizált fibroblasztsejtek) helyezés. Karakterizálásuk részeként vizsgáltam a kolóniákat őssejtekre jellemző génekre. Az indukált pluripotens őssejtek mRNS (Nanog, Oct3/4) és fehérje (SSEA-1, Oct3/4, alkalikus foszfatáz aktivitás) szinten is hasonló értékeket mutattak az R1 embrionális egérőssejtvonalban mértekkel. Eredményeink azt mutatják, hogy a transzpozon-szakasz, transzpozáz enzim általi későbbi kivágásával ez a rendszer alkalmas lehet a génmódosítás nélküli őssejtterápiák megalapítására.

#### P4-13

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

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

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

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

A *Drosophila*-genomprogram adatbázisában található CG9238 gén termékének elsődleges szerkezete jelentős hasonlóságot mutat az emlősökben előforduló R5 glikogénkötő alegységhez, amely a protein foszfatáz 1 (PP1) katalitikus alegységéhez kötődve fejti ki hatását. A szerkezeti jóslat ellenőrzésére élesztő-kéthibrid módszerrel bebizonyítottuk, hogy az R5 homológ képes fehérje-fehérje-kölcsönhatást kialakítani az összes *Drosophilá*ban előforduló PP1 katalitikus alegység izoformával, valamint szedimentációs kísérlettel igazoltuk az R5 homológ glikogén-kötését is. A gén szerkezete alapján feltehetőleg két mRNS íródhat át róla. RT-PCR kísérlettel a *Drosophila*embriókban a két lehetséges mRNS közül csak a rövidebb RA mutatható ki. A *Drosophila* egyedfejlődése során ez a mRNS elsősorban az embrió, lárva és kifejlett nőstényben fordul elő. A gén funkciójának meghatározására felhasználtuk a gén 5'-nem kódoló régiójában P-elemet hordozó EY10816 inzerció mutáns. A P-elem jelenléte nem befolyásolta a gén átíródását, ezért transzpozázzal mobilizáltuk a P-elemet. A P-elem kiugrása során véletlenszerűen bekövetkező kivágás eredményeként egy esetben jelentős deléció jött létre a CG9238 génben. A deléció méretét (2kb) PCR segítségével, pontos pozícióját DNS-szekvenálással határoztuk meg. Azt találtuk, hogy a deléció eltávolítja a gén nem kódoló régiójának egy részét, valamint az 1. és 2. exont. RT-PCR segítségével igazoltuk, hogy a 10816/81 jelű homozigóta deléciós mutánsból hiányzik a CG9238 RA mRNS. A deléciós mutáns életképes, de biokémiai vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a vad típusú *Drosophilá*hoz képest kevesebb glikogént raktároz. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy *Drosophilá*ban a CG9238 gén terméke, szerkezetével összhangban, szerepet játszik a glikogén-anyagcsere szabályozásában. Munkánkat az OTKA 060723 számú pályázata támogatta. Kókai Endre Bolyai János Kutatási Ösztöndíjban részesült.

#### P4-14

##### **A transzglutamináz 2 SNP variánsainak tanulmányozása**

Király R.<sup>1</sup>, Kurtán T.<sup>2</sup>, Fésüs L.<sup>1</sup>

*DE OEC, <sup>1</sup> Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, <sup>2</sup> Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen*

A transzglutamináz 2 (TG2) egyedülállóan multifunkcionális enzim, több betegség patomechanizmusában is fontos szerepet játszik. Egy pontos nukleotid-polimorfizmus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) adatbázisokat tanulmányoztunk annak érdekében, hogy jobban megértsük a TG2 deviáns funkcióit és szerepét a humán betegségek kialakulásában. Mindeztidáig nem található TG2 SNP-vel asszociált betegség az adatbázisokban (NCBI, HapMap, Ensemble). A TG2 variánsok betegségekben fehérje szinten betöltött

potenciális szerepének vizsgálatához *misszensz* SNP-eket választottunk ki, és ezeket a variánsokat helyspecifikus mutagenézissel elkészítettük, His-tagos formában expresszáltuk. A TG2-variánsok biokémiai funkcióinak vizsgálata során azt találtuk, hogy fibronektinkötő képességük nem változott, de a transzglutaminázaktivitásuk jelentősen csökkent vagy teljesen elveszett. A variánsok stabilitásának és sejt kultúrában gyakorolt hatásának, valamint a szinonim és nem kódoló SNP-k vizsgálata folyamatban van.

#### P4-15

##### A *CaPPZ1* gén polimorfizmusa

Kovács L.<sup>1</sup>, Farkas I.<sup>1</sup>, Majoros L.<sup>2</sup>, Miskei M.<sup>3</sup>, Pócsi I.<sup>4</sup>, Dombádi V.<sup>1</sup>

DE<sup>1</sup> OEC, Orvosi Vegytani Intézet, <sup>2</sup> OEC, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, <sup>3</sup> ATC, Kertészettudományi Intézet, <sup>4</sup> TTK, Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A patogén gombák által okozott nozokomiális fertőzések száma folyamatosan növekszik a fejlett országokban. A fertőzések nagy részéért a *Candida albicans* felelős, ami kommenzalistaként az emberi flóra tagja. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a *C. albicans* jelátviteli folyamataiban jelentős szerepet játszó protein foszfatáz Z (PPZ) gombaspecifikus, ezért munkánk során a *PPZ* gén jellemzését tűztük ki célul ebben az opportunista patogén gombában. Az adatbázisban lévő információkkal összhangban *Southern blot* kísérlettel igazoltuk, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen *PPZ* gén található, amelyet *CaPPZ1*-nek nevezünk el. Az ATCC 10231 tesztörzsből származó *CaPPZ1* klónozása és szekvenálása közben felismertük a gén polimorfizmusát, illetve a törzs heterozigóta jellegét. Klinikai és referencia-törzseken végzett vizsgálataink alapján a *CaPPZ1* génnek négy különböző allélja van. A gén 3'-nem kódoló régiója különösen nagyfokú variabilitást mutat. További pontmutációkat is detektáltunk, amelyek növelik a patogén gomba genetikai sokféleségét. Kísérleteink során szekvenálással vizsgáltuk a hipervariábilis génszakaszt, és azt tapasztaltuk, hogy a 27 klinikai és referencia-törzsből származó szekvenciák mindegyike besorolható volt a korábban azonosított allélok valamelyikébe. A DNS-szekvenálás eredményeit RFLP-analízissel is alátámasztottuk. Összesen öt *CaPPZ1* allélkombinációt mutattunk ki az általunk vizsgált *C. albicans*-törzsekben. Eredményeink alapján a *CaPPZ1* gén hipervariábilis régiója alkalmas lehet a klinikai *C. albicans*-izolátumok genotipizálására és a gombafertőzés eredetének felderítésére. (OTKA 68765)

#### P4-16

##### A *SNAP25* gén két polimorf miRNS-kötőhelyének haplotípus-elemzése

Kovács-Nagy R.<sup>1</sup>, Nagy G.<sup>2</sup>, J. Hu<sup>1</sup>, Rónai Zs.<sup>1</sup>, Somogyi A.<sup>2</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>

SE<sup>1</sup> Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, <sup>2</sup> II.sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Állatkísérletek tanúsága szerint a *SNAP25* (*synaptosomal associated protein*, 25 kDa) fehérje nemcsak a neurotranszmitterek exocitózisában játszik kulcsszerepet, hanem döntő fontosságú a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek inzulin kiválasztásában is. A gén SNP-i és a *diabetes mellitus* közötti asszociációt ugyanakkor eddig nem elemezték. *In silico* analízis során a *SNAP25* gén 3' nem átíródo szakaszában (3' UTR) két SNP-t azonosítottunk, melyek miRNS-ek kötőhelyeit érintik (miR SNP), s ily módon a képződő fehérje mennyiségére vannak hatással. Ez a két polimorfizmus (rs3746544 T/G és rs1051312 C/T) egymás közelében helyezkedik el, és két miRNS (miR-510 és miR-641) kötőhelyét érinti. Célkitűzések: (1) Valós idejű PCR alapú eljárás kidolgozása az rs3746544 és rs1051312 SNP-k genotípus- és haplotípus-elemzésére, (2) a kidolgozott technika alkalmazása egészséges és 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő személyek elemzésére, s a kapott eredmények fényében (3) annak eldöntése, hogy kimutatható-e asszociáció a kórkép és a génavariánsok között. A két SNP haplotípusának meghatározása a munkánk során kifejlesztett módszerrel történt. Az új technika megbízhatóságát független módszer (PCR-RFLP) alkalmazásával ellenőriztük. A betegség és a *SNAP25* gén polimorfizmusai közötti asszociációt eset-kontroll-vizsgálat keretében  $\chi^2$ -statisztikával elemeztük. A két SNP közötti kapcsoltságot Gold programcsomaggal határoztuk meg. Valós idejű PCR alapú technikát állítottunk be, mely haplotípus-specifikus *TaqMan*-próbák használatán alapult. Az új, hatékony eljárással ezt követően 457 cukorbetegségben szenvedő és 310 egészséges személy geno- és haplotípusát határoztuk meg. Eredményeink alapján a T-C-haplotípus a kettes típusú *diabetes mellitus*-szal szemben védő hatásának bizonyult ( $p < 0,05$ ). A négy variáns közül a C-G-haplotípus egyetlen személyben sem fordult elő, a két SNP között mérsékelt kapcsoltság volt kimutatható ( $\delta = 0,437$ ).

#### P4-17

##### Ekdizonfüggő gének szabályozásában szerepet játszó hiszton-acetiltransferázok azonosítása

Kristó I., Zsindely N., Gáspár R., Boros I., Bodai L. SzTE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged

A nukleoszómális hisztonok poszttranszlációs módosításai jelentős befolyást gyakorolnak az eukarióta génexpresszióra. A hisztonok acetilációját az antagonisztikus hatású acetiltransferáz (HAT) és deacetiláz enzimek végzik. Az acetiltransferáz enzimek öt konzervált fehérjecsaldba, a GNAT (Gcn5 típusú *N*-acetiltransferáz), a MYST (MOZ, Ybf2, Sas2, Tip60), a CBP/p300, az SRC (szteroid-receptor-koaktivátor) valamint a TAF1-családba sorolhatóak, melyek – az SRC-családot leszámítva

– megtalálhatóak *Drosophila melanogaster*ben is. Számos GNAT és MYST típusú HAT gén nullmutációja eredményez letalitást a metamorfózis vagy az azt közvetlenül megelőző fejlődési állapot során, ami arra utal, hogy az általuk katalizált módosítások szerepet játszanak a bábozódást irányító, ekdizon kiváltotta génaktivációs kaskád szabályozásában. Az Eip74EF és Eip75B ekdizon indukálta génekkel kromatin-immunprecipitációs vizsgálatokkal számos, a H3- és H4-hisztonek N-terminális részének különböző pozícióiban elhelyezkedő lizin acetilációját mutattuk ki. A specifikus módosításokat létrehozó HAT enzimek azonosítását irodalmi adatok alapján, valamint az enzimeket kódoló gének mutáns alléljait hordozó lárvákból készített preparátumokon végzett immunblot-analízissel kezdtük meg. Az első így azonosított faktor, a Gcn5 katalitikus alegységgel rendelkező SAGA acetiltransferáz komplex, amely szerepet játszik a H3-hisztonek K9 lizinjének és a H4-hisztonek K8 lizinjének acetilációjában. A SAGA komplex egyik specifikus és működését tekintve kritikus alegysége az Ada2b adapter fehérje. Ada2b homozigóta mutáns lárvákon végzett kromatin-immunprecipitációval a H3-hisztonek K9 lizinjének csökkent acetilációját mutattuk ki az Eip74EF és Eip75B gének különböző funkcionális szerepű pontjain, emellett Ada2b mutánsokban a két gén transzkripció aktivitása is csökkent mértékű késői harmadik stádiumú lárvákban.

#### P4-18

##### **Kismolekula-microarray és konfokális mikroszkópia alkalmazása sejtalkotókra specifikus fluoreszcens markerek azonosítására**

Molnár E.<sup>1</sup>, Medgyesi Á.<sup>1</sup>, A. Ferhan<sup>2</sup>, S. Bhavyashree<sup>2</sup>, C. Pradeep Kumar Reddy<sup>2</sup>, P. Begüm<sup>2</sup>, Fábán G.<sup>1</sup>, Puskás L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Avicor Kft., Szeged; <sup>2</sup>MTA SzBK, Mikroszkópia Sejtanalízis Laboratórium, Szeged; <sup>3</sup>MTA SzBK, Funkcionális Genomikai Laboratórium, Szeged

A különböző intracelluláris fluoreszcens markereket egyre többen és szélesebb körben alkalmazzák fehérjék lokalizációjára, gyógyszerhatóanyagok szűrésére, sejten belüli transzportfolyamatok tanulmányozására. Különösen nagy értékűek azok a specifikus markerek, amelyek nem toxikusak a sejtekre, és amelyek élő sejteken is használhatók. Munkánk során olyan aktív hordozót fejlesztettünk ki (Avi-Link™ technológia), amelyre az eddig ismert hordozókhoz képest nagyobb kémiai diverzitású molekulakönyvtár lehet kikötni. Ezt úgy oldottuk meg, hogy a pórusos üvegfelülethez több, különböző aktivált funkció csoporttal rendelkező *linkert* kötöttünk, ezáltal ugyanahhoz az aktív hordozóhoz többféle molekula kapcsolható. Ezzel a módszerrel a gyógyszer-kismolekulák kb. 85%-a köthető ki, és így több tízezer molekulából álló *microarray* készíthető. A *microarray* nyomtatása után különböző fluoreszcens emisszióra érzékeny lézerszenkeres leolvasással szinte bármilyen kismolekula-könyvtárból detektálhatók az erősen fluoreszkáló vegyületek. Az így azonosított fluoreszcens vegyületeket élő sejtekhez adva, majd azokat fluoreszcens konfokális

mikroszkópiával elemezve sejten belüli, specifikus lokalizációjú, fluoreszcens markerek azonosíthatóak. Ezzel a megközelítéssel több olyan kismolekulát azonosítottunk, amelyek a sejtmembránhoz, ER-hez, Golgi struktúrákhoz, mitokondriumhoz, sejt-maghoz, kromoszómákhoz, sejt-magvacskákhoz kötődnek. A módszer során optimalizáltuk azokat a szilárd hordozókat, amelyek alkalmasak a megfelelő pontstruktúra létrehozására a *microarray*-felszínen (főként az üveg hibrofóbicitását módosítva). A módszer előnye, hogy bármilyen nagyszámú vegyületből gyorsan azonosíthatóak a potenciális fluoreszcens markerek.

#### P4-19

##### **Citotoxikus anyagok tumor sejtekre és azok migrációjára gyakorolt hatásvizsgálata sejt-mikroelektronikai módszerrel**

Nagy L. I., Ózsvári B., Puskás L.  
Avidin Kft., Szeged

Munkánk során citotoxikumok glioblasztóma-, májkarcinóma- és melanómasejtek migrációjára és növekedésére gyakorolt hatását vizsgáltuk, melynek alapja egy nem invazív módszer. A sejtek migrációs képességében és életképességében bekövetkező változást, azok vezetőképességbeli válaszuk alapján mértük RTCA-DP készüléken és xCELLigence (Roche) rendszeren. A RTCA DP készülék sejt-migrációt detektáló rendszer, ami a Boyden-kamra alapelveit hordozza, azonban teljesen új, valós idejű módszer, ahol a sejtek számolása, fixálása vagy egyéb jelölése nélkül zajlik a kísérlet. A felső kamrában 16 reakcióter helyezkedik el, melyek alján 8 µm pórusos membrán található. A membrán alatt elhelyezkedő elektródok, a vezetőképesség változását folyamatosan mérik az inkubáció során. A sejtek migrálása az elektród felszínén keresztül befolyásolja az elektród közelében lévő oldat lokális ionösszetételét, ez pedig a vezetőképesség megváltozásához vezet. Minél több sejt jut át az elektród felületen keresztül az alsó részbe, annál nagyobb mértékben nő a sejtindex (CI). Adott hatásmechanizmus karakterisztikus impedancia-görbével jellemezhető. Az xCELLigence rendszer esetében a tenyésztőedény alján elektródok vannak, melyek a CI-et folyamatosan mérik az inkubáció során. A CI a vezetőképesség relatív változásából származtatott, mértékegység nélküli paraméter. Az egyik legnagyobb előnye az RTCA DP és xCELLigence rendszereknek más módszerekhez képest, hogy itt nem szükséges markeranyagot hozzáadni a sejtekhez, és lehetőségünk van a kisebb változásokat is folyamatosan nyomon követni a sejtválaszban. A migrációs lemezen kapott eredményeket az xCELLigence rendszeren ellenőriztük, mely a sejtek életképességét, számát, és a letapadásuk erősségét detektálhatja. Munkánk során több egyedi és több kombinációs kezelés hatását is megmértük valós időben. E módszerek fentebb vázolt előnyei a gyógyszerfejlesztésben gyors, és hatékony szűrés lehetőségét biztosítanak más, hagyományos technikákkal szemben.



#### P4-20

##### **Purinerg receptor *P2RX7* gén polimorfizmusok és depressziós tünetek asszociáció vizsgálata**

Nemoda Zs.<sup>1</sup>, O. Abdul Rahman<sup>1</sup>, Vereczkei A.<sup>1</sup>, Somogyi A.<sup>2</sup>, Faludi G.<sup>3</sup>, Sasvári-Székely M.<sup>1</sup>

*SE<sup>1</sup> Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, <sup>2</sup> II.sz. Belgyógyászati Klinika, <sup>3</sup> Pszichiátriai Klinikai Csoport, Budapest*

Az elmúlt évek kapcsoltsági vizsgálataira a *P2RX7* (purinreceptor P2X, ligandumvezérelt ioncsatorna, 7) gén szerepére hívták fel a figyelmet major depresszív és bipoláris zavarban (MDD, BPD). Az aminosavcsereét okozó Gln460Arg (rs2230912) polimorfizmus Arg-alléja mutatott asszociációt MDD és BPD kórképekkel. Előzetes eset-kontroll-vizsgálatunkban nem láttunk szignifikáns hatást e rizikóallél tekintetében, azonban dimenzionális elemzésünk összefüggést mutatott az Arg-allél és súlyosabb depresszív tünetek között. Mivel a legújabb nagy esetszámú vizsgálatok nem támasztották alá e funkcionális egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP) szerepét, a génen belüli egyéb SNP-k vizsgálatát tűztük ki célul. Dimenzionális asszociáció elemzésünkben 154 pszichiátriai betegen (96 MDD és 58 BPD, 74,7% nő, 47,9 ± 10,8 átlag életkor) kívül 246 diabéteszes beteg (50,4% nő, 58,2 ± 13,3 átlag életkor) által kitöltött HADS (*hospital anxiety and depression scale*) kérdőív depresszív és szorongásos tüneteiként használtuk. A C-terminális régióban elhelyezkedő egyéb aminosavcsereével járó SNP-eket (Thr348Ala (rs1718119), Thr357Ser (rs2230911), Glu496Ala (rs3751143)) valós idejű PCR alapú technikával határoztuk meg. Ezen kívül a 3' nem kódoló régióban található, feltehetően miRNS-kötőhelyet megváltoztató 2164 A/C SNP-t (rs1653625) genotipizáltuk RFLP technikával. A Haploview program nagy kapcsoltságot mutatott a vizsgált SNP-k között. Genetikai elemzésünk (MANOVA) során mind a depresszív, mind a szorongásos tünetek asszociációt mutattak nem csak a Gln460Arg (rs2230912) SNP-vel, hanem a Thr348Ala (rs1718119) és a 2164 A/C (rs1653625) polimorfizmusokkal. A 3' nem kódoló régió SNP funkcionális vizsgálatát luciferáz riportergén-rendszerben elkezdtük. A 2164 A/C SNP génexpressziót befolyásoló hatása magyarázatul szolgálhat a *P2RX7* gén és a depresszív tünetek közötti összefüggésre. (ETT-07-118/2009)

#### P4-21

##### **Mutáns DTL fehérjék vizsgálata *Drosophila melanogaster* ben**

Páhi Z. G.<sup>1</sup>, Schauer T.<sup>2</sup>, Boros I. M.<sup>1</sup>

*<sup>1</sup> SzTE TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Szeged; <sup>2</sup> EMBL, Ladurner Group, Genome Biology, Heidelberg, Germany*

A telomer a kromoszóma végén található struktúra, amely megvédi a DNS-t a replikáció során bekövetkező rövidüléstől, és megakadályozza a kromoszómavégék összetapadását. A különböző organizmusokban eltérő módon valósul meg a

telomer védelme, de minden jel arra utal, hogy a telomer védelmének mechanizmusa az ecetmullincában és a humán sejtekben hasonló módon megy végbe. *Drosophilában* azonosítottunk egy olyan fehérjét, amely rendkívül fontos a telomer védelemben. Ez a fehérje a DTL (*Drosophila Tat-like*), amely számos specifikus helyhez kötődik a politén kromoszómán, többek közt a kromoszómák végeihez is. A fehérje hiánya a telomervegek összeragadását okozza. A DTL-nek szerkezeti rokona nincs, ezért megpróbáltuk megkeresni azokat az aminosavakat, amelyek fontosak lehetnek a fehérje működése szempontjából. Kísérletünk célja az, hogy a létrehozott pontmutációk által pontosabb képet kapjunk arról, hogy a fehérje szerkezetében melyek lehetnek a funkcionálisan fontos részek. A különböző *Drosophila*-fajokban összehasonlítottuk a DTL aminosavszekvenciáját, hogy megállapítsuk az erősen konzervált régiókat, valamint megnéztük a lehetséges foszforilációs helyeket is. Az előbb leírt megfontolások alapján két fontosnak vélt aminosavat vizsgáltunk meg. Az egyik a 23-as helyen lévő leucin, amely evolúciósan konzervált régióban helyezkedik el. A másik a 97-es tirozin, amely feltételezett foszforilációs hely. Az előbb említett aminosavak helyén mutációkat hoztunk létre. Ehhez PCR alapú mutagenézist használtunk. *Drosophila Gateway* klónozó rendszert alkalmazva olyan konstrukciókat alakítottunk ki, amelyek képesek kifejezni a pontmutációt hordozó fehérjét. P-elem alapú transzformációval transzgenikus *Drosophila*-vonalakat állítottunk elő. Vizsgáltuk, hogy a mutáns fehérjék képesek-e menekíteni a vad típusú DTL hiányában kialakuló fenotípust.

#### P4-22

##### **Vajon a szirtuinaktiváció tényleg meghosszabbítja az életet?**

Somogyvári M., Dancsó B., Szalay K., Csermely P., Söti Cs.

*SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest*

Az élettartam meghatározásában fontos szerepet játszik az anyagcsere-állapot környezeti ingereknek megfelelő szabályozása. A sejt energiaállapotát érzékelő útvonal egyik csomópontja a szirtuin (Sir2) hiszton deacetiláz. Számos kulcsfehérje, így az E2F, a p53, a PPARgamma és a FOXO deacetilációjával szinte az összes celluláris folyamatot szabályozza, a túlélést és a tumorképződést serkenti. A vörösbombában található szirtuinaktivátor resveratrol, illetve a szirtuin genetikai aktivációja gerinctelenekben megnöveli az élettartamot, az emlős SIRT1 hiánya pedig jelentős élettartam-csökkenést okoz egekben. Az utóbbi időben azonban számos közlemény látott napvilágot, melyben a resveratrol és a szirtuin-túltermelés nem hatott *Caenorhabditis elegans*, illetve *Drosophila* modellek élettartamára. Ezért jelen munkánk célja egy nemzetközi együttműködésben a resveratrol és a SIR-2.1-túltermelés élettartamra és hőszokk válaszra kifejtett hatásának szisztematikus vizsgálata *C. elegans* modellrendszeren. Kísérleteink során vad, illetve két különböző kópiaszámú és genetikai háttérű SIR-2.1 túltermel-

ló *C. elegans*-törzssel dolgoztunk. Hogy a genetikai háttér variabilitását és esetleges háttér-mutáció lehetőségét kiküszöböljük, a törzseket hatszoros kikeresztezésnek vetettük alá. Ezek után a törzsekkel és resveratrolkezeléssel termotolerancia-, élettartam-, valamint *Western blot*-méréseket végeztünk. A resveratrolkezelés és a kétfajta SIR-2.1-túltermelés hőszokk-körülmények között megnyúlt túlélést (termotoleranciát) eredményezett, mely a kikeresztezés után is fennmaradt. További, a sir-2.1 RNAi csendesítésével zajló kísérleteink folyamatban vannak. Eredményeink segíthetnek, hogy tisztázzuk, vajon a szirtuin genetikai és farmakológias aktivációja *C. elegans*-ban ténylegesen aktiválja-e a hőszokkválaszt, és megnöveli-e az élettartamot.

#### P4-23

##### **Levélrozsdá-fertőzés kapcsán indukálódó glükánáz és kitináz izoformák azonosítása és génexpressziós vizsgálata közel izogén, rezisztens és fogékony búzavonalakban**

Szikriszt B.<sup>1</sup>, Pos V.<sup>1</sup>, Lukács N.<sup>1</sup>, Manninger K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BCE KTK, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék, Budapest; <sup>2</sup> MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest

A növény kórokozókkal szembeni reakciójának szerves része a patogenezis kapcsán indukálódó fehérjék (PR-proteinek) expressziója. A PR-proteinek 17 családja közül több endokitináz- (PR3, PR4, PR8 és PR11) és béta-1,3-glükánáz- (PR2) aktivitással rendelkezik. Mindkét enzimnek számos izoformája fordul elő az egyes családokon belül, s hogy pontosan mely izoformák indukciója és milyen expressziós dinamikával indul be a fertőzést követően, azt a gazdanövény fertőzésre adott válaszreakciójának típusa határozza meg. Korábbi kísérleteinkben levélrozsdá-fertőzéssel (*Puccinia recondita* f.sp. *tritricina*) asszociáltan erőteljesebb és tartósan magasabb kitináz- és endo-1,3-glükánáz-aktivitást mértünk egy Lr9 rezisztenciagént hordozó búzavonal sejtközötti állományában, mint a vele közel izogén, fogékony genotípusban. Az indukálódó izoenzim (PR3 és PR4 kitinázok, s főképp a PR2 A-alsó család glükánázai) több képviselőjét proteomikailag is igazoltuk. Annak tisztázására, hogy a rezisztens és a szenzitív vonalak drasztikusan eltérő endo-1,3-glükánáz- és kitinázaktivitása egy vagy több izoforma időben és/vagy mennyiségben eltérő expressziójára vezethető-e vissza, génexpressziós analízist végeztünk a PR3-család I/II osztályú kitinázai, a PR2-család lisztharmat- és fuzáriumfertőzés kapcsán leírt TaGlb2a,b,f ága és a korábban sárgarozsdá-fertőzéssel asszociált

DQ078255 béta-1,3-endoglükánáz rokonsági körén. Míg a fertőzés utáni napon mindhárom gén-csoport expressziója hasonló intenzitást mutatott, a 3.-4. napra már jelentős különbséget állapítottunk meg a rezisztens vonal javára. A nem fertőzött mintákból amplifikált izoformák nem egyeztek meg a fertőzött mintákból származóakkal. Feltételezzük, hogy e PR-proteinek eltérő jelátviteli, illetve szabályozó mechanizmusok által eredményezett magasabb és hatékonyabban időzített expressziója érdemben hozzájárul a rezisztens vonal eredményes védekezéséhez.

#### P4-24

##### **A mitokondriális PPR40 fehérje hiányának hatása a Halliwell-Asada-ciklusra**

Zsigmond L.<sup>1</sup>, Szarka A.<sup>2</sup>, Rigó G.<sup>3</sup>, Szabados L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SzTE TTIK, Növénybiológiai Tanszék, Szeged; <sup>2</sup> BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Budapest; <sup>3</sup> MTA SzBK, Növénybiológia Intézet, Szeged

A növényi mitokondriumokhoz szorosan kapcsolódik számos olyan anyagcsere-út, amelyek jelentősek a környezeti változásokhoz való alkalmazkodásában. A növényi mitokondriális elektrontranszport részt vesz a reaktív oxigén-formák (ROS) termelésben különböző biotikus és abiotikus stresszkörülmények között. Az elektron-szállítási láncban az I és III komplex a fő helye a ROS-képződésének sötétben és nem zöld szövetekben. Stressz következtében az optimális körülmények között egyensúlyban levő ROS-képződés és -lebomlás folyamataiban bekövetkező változások hatására különböző reaktív gyökök és egyéb aktív oxigénformák halmozódhatnak fel, melyeket nem enzimatis (pl. aszkorbinsav) és enzimatis antioxidánsok (pl. szuperoxid-dizmutáz) képesek semlegesíteni. T-DNS-inszerciós mutagenesisprogramunk során azonosítottuk egy mutáns transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növényt (ppr40-1), amelynél a mutáció a mitokondriumban lokalizálódó pentatrikopeptid ismétlődő (PPR) doméneket tartalmazó PPR40 fehérjét érintette. A kis növésű ppr40-1 mutáns fokozott stresszérzékenységet, megnövekedett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tartalmat és szuperoxid-dizmutáz-aktivitást mutat a vad típushoz képest. A PPR40 fehérje a mitokondriális légzési lánc III komplexéhez kapcsolódik. A ppr40-1 mutánsban a III komplexen keresztüli elektronáramlás erősen lecsökkent, miközben a IV komplex működése fokozódott. Ezzel párhuzamosan megnövekedett aszkorbát oxidációt is tapasztaltunk a ppr-40-1 mutánsokban a vad típushoz képest. Az aszkorbát korábbi vizsgálataiból

## P5 – Pathobiokémia

#### P5-01

##### **Misfolding proteins compromise the heat shock response**

A. Arslan, Csermely P., Söti Cs.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

Ageing is characterized by a progressive accumulation of cytotoxic and proteotoxic damage and a decreased resistance to environmental stress. Molecular chaperones are ubiquitous, highly conserved proteins responsible for the maintenance of protein

folding homeostasis in cells. The heat shock response (HSR) is regulated by damaged and misfolded proteins at the transcriptional level. While the HSR determines lifespan, it is compromised in ageing. To better understand the role of protein conformation and of molecular chaperones, we have transiently overexpressed several inert protein-misfolding models in COS-7 cells and studied their aggregation properties and the induction of the HSR, cytotoxicity and effect on protein homeostasis. We observe that GFP::degron, a C-terminal fusion of a 16-residue 'degron' peptide to GFP and d9CAT, a C-terminally truncated chloramphenicol acetyl-transferase (CAT), form juxtannuclear aggregates and markedly induce the major heat shock protein Hsp70, while attenuate Hsp70 induction upon heat-shock, suggesting an attractive role for protein misfolding to compromise cellular adaptational responses to heat stress. We further show that degron is degraded by the proteasome and not by autophagy. Curiously, we see that misfolding proteins alone inhibit BrdU incorporation that is transformed to Annexin positivity in the presence of proteasome inhibition suggesting that a proteotoxic stress converts a proliferative stop to cell death. Surprisingly, degron inhibits, while d9CAT promotes luciferase folding, a marker of protein folding capacity. These results raise the possibility that the toxicity and the compromise of HSR induced by these misfolding models is unrelated to protein homeostasis. Our data suggest that protein conformational damage *per se* may contribute to the impairment of protein homeostasis buffer and might help to establish a link between protein misfolding and ageing.

#### P5-02

##### **A hőszok transzkripciós faktor szerepe a kalóriamegvonás élettartam-növelő hatásában *Caenorhabditis elegans* fonálféregben**

Dancsó B.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

A kalóriacsökkentés az élettartamot a leghatékonyabban megnyújtó környezeti beavatkozás, melyben számos megfigyelés igazolta a hőszokkválasz indukcióját. A hőszok transzkripciós faktor (HSF-1) a fehérje-homeosztázis fontos regulátora, *Caenorhabditis elegans* fonálféregben meghatározza az élettartamot. Mindezek felvetik a hőszokkválasz szerepét a kalóriacsökkentés mechanizmusában. Ezzel összhangban egy amerikai kutatócsoport

eredményei szerint a kalóriamegvonás (éheztetés) a kalóriacsökkentés egy új *C. elegans* modelljeként HSF-1-függő élettartam-növekedést indukál. A fenti megfigyeléseket megvizsgálva és kiterjeszve *C. elegans*-ban azt vizsgáltuk, (1) hogyan hat a kalóriamegvonás az élettartamra és a stressz-toleranciára, (2) szükséges-e ehhez a HSF-1, (3) és ha igen, milyen mechanizmusok vezethetnek a HSF-1 aktivációjához. Kísérleteink során vad és mutáns *C. elegans*-törzsekkel termotolerancia-, élettartam- és riportergén-aktivációs méréseket végeztünk. Eredményeink szerint az éheztetés HSF-1-függő élettartam-növekedést indukál. Az élettartam-növekedés és a HSF-1 szerepe az alacsony hőmérsékletű tartományban és hőszokk-körülmények között egyaránt kimutatható, mely felveti a HSF-1 fehérje homeosztázistól független szerepét. A resveratrol és a klasszikus kalória-csökkentés hatását közvetítő SIR-2.1 és AMPK (AMP-függő kináz) gének nem szükségesek a kalóriamegvonás HSF-1-aktiváló/élettartam-növelő hatásához. Jelenlegi kísérleteinkben a kalória-csökkentésben, illetve az öregedésben szerepet játszó egyéb mechanizmusok szerepét vizsgáljuk. Munkánk közelebb vihet a kalóriacsökkentés és a hőszokkválasz kapcsolatának teljesebb körű megértéséhez, mely segítséget nyújthat az egészséges élettartam kiterjesztéséhez és az időskori betegségek megelőzéséhez.

#### P5-03

##### **Gyulladásos citokinek (IL-6, IL-1 $\beta$ ) termelésének tanulmányozása különböző módon elhaló sejtek fagocitózisa során**

Doró Z., Buchan Gy., Mádi A., Fésüs L.

DE OEC, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet, Debrecen

A makrofágok hatékonyan eliminálják az elhaló neutrofil granulocitákat, megelőzve ezzel különböző gyulladásos folyamatok kialakulását. Sok ismeretünk van arról, hogy milyen módon fagocitálják az apoptotikus és nekrotikus sejteket külön-külön, azonban kevésbé ismert, hogyan viselkednek akkor, amikor a különböző módon elhaló sejtek egyszerre vannak jelen a környezetükben. Ez szöveti kötetelékben gyakran előfordulhat, ezért munkánk célja, hogy egérmódelben vizsgáljuk a makrofágok fagocitáló képességét olyankor, amikor egyszerre kell megbirkózniuk apoptotikus és nekrotikus sejtekkel. Csontvelőből *ex vivo* differenciáltatott valamint peritoneális makrofágokat vizsgáltunk. Apoptotikus sejtekként csontvelőből

nyert neutrofil granulocitákat alkalmaztunk, melyek az izolálás után mintegy 24 órával spontán módon elhalnak. Három különböző nekrozismodellt vizsgáltunk. Az eredményeik szerint a legnagyobb hatékonysággal a spontán nekrotikus sejtek felvétele történik meg, ezt követi a nekroptotikus és a hővel indukált sejtek fagocitózisa, míg az apoptotikus sejtek felvétele volt a legkevésbé hatékony. Az eltérő módon elhalt sejtek együttes alkalmazásakor az tapasztalható, hogy azok nincsenek hatással egymás felvételére. Makrofágok gyulladáscitokintermelését mérve különböző módon elhalt nekrotikus sejtek hatására azt tapasztaltuk, hogy a nekrotikus sejtek egyike sem vált ki a makrofágokból gyulladáscitokinek termelődését, ugyanakkor az LPS-kiváltott termelés gátlására is képesek. Jelenleg folyik annak bizonyítása, hogy ez a jelenség elhaló neutrofil sejtekre specifikus-e. További megfigyelés az, hogy az apoptotikus és nekrotikus neutrofilek képesek a makrofágokban inflammaszóma aktiválására is és ennek eredményeként azok IL-1 $\beta$ -t termelnek. A munka jelentősége, hogy ezen folyamatok vizsgálata hozzájárulhat különböző gyulladáscitokintermelés, autoimmun és neurodegeneratív folyamatok jobb megértéséhez.

**P5-04**  
**Epigenetikai változások gasztrointesztinális eredetű tumor-asszociált myofibroblasztokban**

Csontné Kiricsi M.,<sup>1</sup> Huliák I.,<sup>1</sup> Hegyi P.,<sup>2</sup> Boros I.<sup>1</sup>  
*SzTE<sup>1</sup> TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, <sup>2</sup> ÁOK, I. számú Belgyógyászati Klinika, Szeged*

A myofibroblasztok sebgyógyulásban és más fibroproliferatív állapotokban betöltött jótékony szerepe már ismert. Ezek a vékony, orsó alakú sejtek morfológiájukat és funkciójukat tekintve a simaizomsejtekre és a fibroblasztokra hasonlítanak, alfa-simaizomaktint, vimentint és extracelluláris mátrixkomponenseket fejeznek ki. Myofibroblasztok jelennek meg az epiteliális eredetű tumorok környezetében is, ahol az egészséges szövethez képest jóval nagyobb számban fordulnak elő, és megváltozott morfológiai paraméterekkel rendelkeznek. Ezen paraméterek módosulásának részben epigenetikai okai lehetnek, mivel a hisztonfehérjék acetilációja/ metilációja, valamint a DNS-metiláció a gén-expressziós mintázat megváltozását eredményezik. A projekt célja ezen epigenetikai mintázat feltérképezése és öss-

zehasonlítása nyelőcső- és vastagbél-tumorok környezetéből valamint egészséges szövetből izolált myofibroblasztokban. Kísérleteink során vizsgáltuk a hiszton H3- és H4-acetilációs és -metilációs mintázatát immun-hisztokémiai festésekkel és immunblot módszerrel, valamint a hisztonacetilációért felelős egyik hiszton acetiltranszferáz (HAT) komplex alegységeinek expresszióját kvantitatív PCR segítségével. Eredményeink azt mutatják, hogy a hiszton H4 8, 12 és 16 lizinjének acetilációja és a H3 lizin 9 dimetilációja csökkent mértékű a tumorasszociált myofibroblasztokban, elsősorban a nyelőcső eredetű mintában. A vastagbél-tumor-asszociált myofibroblasztok esetében ez a különbség csak kisebb mértékben vagy nem volt kimutatható. A vastagbél eredetű tumoros mintákban viszont a H3-összacetiláció bizonyult jelentősebbnek a kontrollmintához képest. A HAT-alegységek közül mind az Ada2a, Ada2b és Ada3 expressziójában is tapasztaltunk változást, a nyelőcső és a vastagbél eredetű myofibroblasztok esetében egyaránt.

**P5-05**  
**Hipoxia hatása a monoaminerg neurotranszmisszióra humán idegi sejt vonalakon**

Keszler G., Bence M., Sasvári-Székely M.  
*SE, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest*

Az agyi hipoxiás állapotok orvosi jelentősége közismert. Az agyi fejlődés korai szakaszát ugyanakkor fiziológiás hipoxia jellemzi, ami a hipoxia indukálta faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) közvetítésével elősegíti az idegi prekursorsejtek differenciálódását dopamin- és szerotoninerg neuronokká. A dopaminerg fenotípust meghatározó gének hipoxiás körülmények között történő transzkripció szabályzásáról azonban kevés információ áll rendelkezésre. Munkánkban arra kerestük a választ, hogy a monoaminerg neurotranszmisszióban érintett gének expressziója változik-e hipoxiás körülmények között, illetve hiszton-dezacetilázgátlószer trichostatin A (TSA) segítségével lehet-e befolyásolni a szóban forgó kandidáns gének kifejeződését. Kísérleteinkhez a humán eredetű SK-NF-I neuroblasztóma- és a CCF-STTG1 asztrocitóma-sejt vonalakat használtuk. A sejteket normoxiás és hipoxiás (1% O<sub>2</sub>) körülmények között TSA jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk, majd kvantitatív PCR segítségével határoztuk meg a kiválasztott célgének mRNS-szintjét. Az eredmények azt mutatták, hogy a 3-as és 4-es típusú dopaminreceptorok

expressziója a 8-10-szeresére növekszik két-napos hipoxiás kezelést követően, míg a katechol-O-metiltransferáz, a monoamin-oxidáz A és a dopamin-transzporter mRNS-szintje nem változott. Ezzel szemben a TSA-kezelés nem befolyásolta a dopaminreceptorok transzkripcióját, míg a dopamin- és a szerotonin-transzporterek szintje már 3 óras inkubációt követően drámai módon emelkedett, ellenben a COMT és a MAO-A szintje erősen lecsökkent. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy hipoxiás körülmények elősegíthetik a dopaminerg neurotranszmissziót a posztzinaptikus dopaminreceptorok fokozott expressziójával, míg a hiszton-deacetilázok gátlása a preszinaptikus monoaminkészletek feltöltését eredményezheti, a visszavétel fokozódása és a lebontó enzimek átírásának csökkenése révén. (ETT 55105)

#### P5-06

##### **A metabolikus szenzor SIRT1 szirtuin deacetiláz a Hsp90 kliense**

Nguyen M. T., Csermely P., Sőti Cs.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

Az élettartam meghatározásában fontos szerepet játszik az anyagcsere-állapot környezeti ingereknek megfelelő szabályozása. A sejt energiaállapotát érzékelő útvonal egyik csomópontja a szirtuin (Sir2) hiszton deacetiláz. Számos kulcsfehérje, így az E2F, a p53, a PPARgamma és a FOXO deacetilációjával szinte az összes celluláris folyamatot szabályozza, a túlélést és a tumorképződést serkenti. A vörösbőrben található szirtuinaktivátor resveratrol, illetve a szirtuin genetikai aktivációja gerinctelenekben megnöveli az élettartamot, az emlős SIRT1 hiánya pedig jelentős élettartam-csökkenést okoz egerekben. A Hsp90 az eukarióta sejt konzervált, nagy mennyiségben jelen levő, specifikus chaperonja, mely a jelátviteli folyamatokban résztvevő labilis fehérjék szerkezet- és funkciófenntartásában vesz részt. Több száz kliense – többek között transzkripciós faktorok (p53, szteroid receptorok), kinázok (Raf, Akt), polimerázok (telomeráz) – a növekedési jelpályák fontos mediátorai. A Hsp90 gátlása a kliensek proteaszómafüggő degradációjához vezet, ezért a Hsp90 ígéretes kemoterápiás célpont. Mivel a SIRT1 hidrofób NAD-kötőhellyel rendelkező, komplex multidomén fehérje, munkánkban arra a kérdésre kerestük a választ, vajon igényli-e funkciójához a Hsp90 jelenlétét. Eredményeink szerint COS-7 sejtekben a Hsp90-gátló szer geldanamycin (GA) a SIRT1 fehérje szintjét dózis- és időfüggően csök-

kenti. Proteaszómagátló szer és GA együttes hatására a SIRT1 a detergens-inszolubilis üledékbe kerül. Immunprecipitációs kísérletekkel kimutattuk a SIRT1 és a Hsp90 GA-érzékeny komplexét. A nukleáris SIRT1 mind GA, mind PI3-kináz gátló hatására a citoszolba transzlokálódik, mely a Hsp90 direkt vagy Akt-függő hatására enged következtetni. Eredményeink alapján a SIRT1 a Hsp90 kliense, így a Hsp90 elősegítheti a metabolikus szignáltranszmissziót, gátlása pedig a SIRT1-en keresztül is csökkentheti a tumor-növekedést és a stresszrezisztenciát.

#### P5-07

##### **SKN-1 antioxidáns transzkripciós faktor szerepe a patogénrezisztencia kialakításában *Caenorhabditis elegans* fonálféregben**

Papp D., Csermely P., Sőti Cs.

SE, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest

Az öregedés általánosan előforduló jellemzője az oxidatív stressz és a csökkent immunfunkció. Számos modellen végzett vizsgálat irányult az oxidatív stressz és az immunválasz közötti bonyolult kapcsolat tisztázására. Az utóbbi években fedezték fel a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben is, hogy bakteriális fertőzés során oxidatív stressz alakul ki. A reaktív oxigén-származékokat részben a fertőző baktériumok, részben a bélhámsejtek falában levő NADPH oxidázok termelik. A bélhámsejtekben fellépő oxidatív stressz jelenlétét bizonyítja az antioxidáns enzimek fokozott expressziója, amelyet a DAF-16 FOXO transzkripciós faktor indukál. Ezidáig más antioxidáns regulátorok (mint például az NRF2-ortológ SKN-1) szerepét nem vizsgálták a *C. elegans* immunitásával összefüggésben. Az SKN-1 transzkripciós faktor a fonálféreg bélcsövében és ASI neuronjaiban expresszálódik. Mind KO mutáns törzsekkel, mind RNAi-csendesítéssel végzett kísérleteink bizonyították, hogy SKN-1 hiányában a férgek jelentősen megemelkedett érzékenységet mutatnak mind a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa*, mind a Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* baktériumokra. Kimutattuk továbbá az SKN-1 aktiválódását: nukleáris transzlokációját és két célgénjének indukálódását *P. aeruginosa*-fertőzés hatására. Az utóbbi években fedezték fel, hogy az SKN-1 az antioxidáns védekezésen túl részt vesz az élethossz modulálásában is. Ebből adódóan vizsgáltuk meg az SKN-1 szerepét az immunszenescencia kialakulásában. Kísérleteink kimutatták, hogy az életkor növekedésével csökken az SKN-1 célgének indukálhatósága *P. aeruginosa*-fertőzés során.

Összefoglalva eredményeinket megállapíthatjuk, hogy az SKN-1 szükséges a *C. elegans* patogénrezisztenciájának kialakításához, és célgénjei csökkent indukálhatósága hozzájárulhat az immunszenescencia kialakulásához.

#### **P5-08**

##### **A szöveti transzglutamináz hiánya egerekben fokozza a fogzománc mineralizációját**

Sarang Zs.

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

A szöveti transzglutamináz (TG2) multifunkciós fehérje, amely fehérje-keresztalkotó aktivitáson túl GTPáz- és kinázaktivitással is rendelkezik, és mind sejten belül, mind extracellulárisan megtalálható. A sejten kívüli TG2-ről ismert, hogy részt vesz a kondrociták érésében, az extracelluláris mátrix kialakításában és a csontképzésben. Ugyanakkor a TG2 fogfejlődésben betöltött szerepe kevésbé ismert. Kísérleteinkben *in vivo* és *in vitro* vizsgáltuk vad típusú és TG2-hiányos egerek fogait. A fogakat különböző fejlődési stádiumú egerekből izoláltuk: embrionális 14, 15 és 16. nap, fogátörés előtt (születés utáni első napon) és felnőttkorban (2-3 hónapos). A korai fogfejlődés során (fogbimbó-, harang- és sapkastádiumban) nem találtunk morfológiai változást a TG2 hiányában. Szintén nem volt eltérés a felnőtt fogak kalcium/foszfát-arányában, viszont szignifikáns eltérést találtunk a felnőtt fogak zománckeménységében, amely felgyorsult zománckeménységre utal a TG2 hiányában. Továbbá a metszőfogak 3D analízise kissé vastagabb zománckéteget mutatott ki *knock out* egerekben. Eredményeink arra utalnak, hogy a TG2 szabályozó szerepet játszhat zománc mineralizációjában. (OTKA F-67632)

#### **P5-09**

##### **Coeliákia-rizikófaktorral rendelkező endotélsejtek vizsgálata**

Tóth B.<sup>1</sup>, Simon-Vecsei Zs.<sup>1</sup>, Király R.<sup>1</sup>, Fésüs L.<sup>1</sup>, Korponay-Szabó I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DE OEC, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet, Debrecen; <sup>2</sup> Coeliákia Centrum, Heim Pál Gyermekkorház, Budapest

A coeliákia a kalászos gabonafélékben lévő gluten fogyasztásakor kialakuló autoimmun reakció a 2-es típusú transzglutamináz enzim ellen, mely leggyakrabban vékonybélbetegség, malabszorpció formájában jelenik meg. A betegség családi halmozódást mutat, a betegek gyermekei 20-30%-ban érintettek. A coeliákia HLA-asszociált betegség, mely szoros kapcsolatban áll a DQ2- és DQ8-hordozással, mely szükséges, de nem elégséges feltétele a betegség kialakulásának. A magyar populációban DQ2 kb. 25%-ban fordul elő, ezért a HLA mellett más, egyelőre ismeretlen gén(ek) is feltehetően részt vesz(nek) az antigénprezentáció és az immunválasz kialakításában. Vizsgálatainkban coeliakiás családok újszülöttjeinél HLA-DQ-tipizálást végeztünk és köldökzsinórból endotélsejteket (HUVEC) izoláltunk, majd ezeket prospektív módon, az antigéninger előtt vizsgáltuk sejtszintű eltérések keresésére. Különböző extracelluláris molekulákkal fedett felszíneken vizsgáltuk az endotélsejt-adhéziót, -proliferációt, -migrációt és az érzékszervi tulajdonságokat, ezeket a paramétereket összehasonlítottuk kereskedelmi és normál populációból preparált HUVEC-sejtek viselkedésével. A migrációs kísérletekben azonos idő alatt a kereskedelmi HUVEC-sejtekhez képest 89% vándorolt azonos távolságra a normál (általunk preparált, egészséges mintából származó) sejtekből, a magas rizikófaktorú (DQ2-homozigóta) sejtekből 14-52%, az alacsony rizikófaktorú sejtekből pedig 12%. A magas rizikófaktorú sejtek csökkent adhéziót (25-50%) mutattak, valamint kollagénfelszíneken kevésbé képeztek vaszkuláris struktúrákat. Egyes sejtvonalak a vizsgált paraméterekben jelentősen különböztek, mely nem HLA kockázati tényezők jelenlétét támasztja alá. Ezek jelentőségét a továbbiakban a betegség későbbi kialakulása szempontjából vizsgáljuk. Az eredmények további méréseket indokolnak olyan kísérleti rendszerekben, ahol coeliakiás betegekből származó antitestek is jelen vannak.

## P6 – Membráncsatornák és -transzporterek

### P6-01

#### A TRPM2-csatorna közvetlen és közvetett modulátorainak vizsgálata

Tóth B., Csanády L.

*SE, Orvosi Biokémia Intézet, Budapest*

A TRPM2  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilis kationcsatorna, amelynek fontos szerepe van az oxidatív stresszhez kapcsolódó, mind fiziológiás, mind patofiziológiás folyamatokban. A TRPM2-csatornát ADP-ribóz (ADPR) és intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  együttes jelenléte aktiválja, de működését számos intracelluláris faktor is befolyásolja. Egész sejtés mérések során, TRPM2-expresszálo sejtek kezelése hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), intracelluláris dialízise ciklikus ADPR (cADPR) és nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP) reagensek aktiválták, míg AMP dialízise gátolta a csatornát. Emellett intakt sejtekben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cADPR és az NAADP fokozta a TRPM2-csatornák ADPR iránti érzékenységet. Azonban ilyen típusú méréseknél a sejt enzimei és  $\text{Ca}^{2+}$ -rendszerei jelen vannak, így nem dönthető el, hogy ezek a modulátorok a TRPM2-csatornához közvetlenül kötődve, vagy az ADPR-nak és a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionoknak, mint elsőd-

leges ligandumnak lokális koncentrációját befolyásolva, közvetett módon hatnak. Kutatásunk célja az volt, hogy azonosítsuk a TRPM2-csatorna direkt modulátorait. Ehhez hTRPM2 csatornát expresszálo *Xenopus*-petesejtekéből származó *inside-out patch* citoszolikus felszínét közvetlenül perfundáltuk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AMP, cADPR, NAADP és nikotinsav-adenin-dinukleotid (NAAD) reagensekkel, és megvizsgáltuk, befolyásolják-e a TRPM2-csatorna áramát. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) és az enzimatikusan tisztított cADPR (10  $\mu\text{M}$ ) nem aktiválta, míg az AMP (200  $\mu\text{M}$ ) nem gátolta a TRPM2 működését. A NAADP a maximális áramnak csak 50%-át tudta kiváltani, így parciális agonistának, míg a NAAD teljes agonistának bizonyult, de mindkét molekula affinitása nagyon alacsony volt ( $K_{1/2} = 104$  és 35  $\mu\text{M}$ ). Az ADPR hatásának fokozására sem a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sem a cADPR, sem az NAADP nem volt képes. Figyelembe véve ezen molekulák intracelluláris koncentrációit és alacsony affinitásukat, nem valószínű, hogy fiziológiás körülmények között direkt módon befolyásolnák a TRPM2-csatorna működését.

## P7 – További poszterek

### P7-01

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

Garabuczi É., Somlai G., Fésüs L., Szondy Zs.

*DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

A timociták csontvelői őssejtekből származó sejtek. Érésük és differenciálódásuk a tímuszban történik meg, melynek során a timociták több mint 90%-a elhal. Az intézetben folyt korábbi kutatások kimutatták, hogy az apoptózis kiváltásakor pl.: glükokortikoid oltását követően, nagy mennyiségű szöveti transzglutamináz (TG2) termelődik a timocitákban. A timociták elhalását *in vitro* is előidézhajjuk glükokortikoid kezeléssel, de ezzel egyidejűleg a TG2 indukálódását nem tudtuk kimutatni. Kísérleteink során arra keressük a választ, hogy mely anyagok működhetnek közre a timociták *in vivo* apoptózisa során, melyek a timociták szöveti környezetében megtalálhatóak és szükségesek a TG2 *in vivo* termelődéséhez. Laborunk korábbi adatai azt mutatják, hogy a timociták elhalását a tímuszban jelenlévő retinoidok és az apoptotikus sejteket eltakarító makrofágok által termelt transforming-growth-factor-béta (TGF-béta) is befolyásolhatja. Mind retinsav, mind TGF-béta kötőhely létezését leírták a TG2 promóterében. Kísérleteinkben retinoidok és TGF-béta hatását vizsgáljuk a TG2 megjelenésére, a timociták apoptózisa során. Adataink azt mutatják, hogy a TGF-béta és a retinsav, valamint az apoptózist kiváltó glükokortikoid vagy

anti-CD3 antitest együttes hatása szükséges a TG2 mRNS hatásos indukciójához. *In vivo* apoptózis kiváltását követően a retinsav szintéziséért felelős enzimek nagymértékű növekedését tapasztaltuk. Továbbá, a TGF-béta hatás közömbösítése vagy a retinsav szintézis gátlása megakadályozza a TG2 indukcióját az *in vivo* apoptózis során. Mindez arra utal, hogy a retinsav és a TGF-béta is közrejátszik az apoptotikus timocitákban keletkező TG2 indukciójában.

### P7-02

#### MI BEFOLYÁSOLJA A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ KELETKEZÉSÉT AZ ELHALÓ TIMOCITÁKBAN?

Somlai G., Garabuczi É., Szondy Zs.

*DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen*

A timociták csontvelői őssejtekből származó sejtek. Érésük és differenciálódásuk a tímuszban történik meg, melynek során a timociták több mint 90%-a elhal. Az intézetben folyt korábbi kutatások kimutatták, hogy az apoptózis kiváltásakor pl.: glükokortikoid oltását követően, nagy mennyiségű szöveti transzglutamináz (TG2) termelődik a timocitákban. A timociták elhalását *in vitro* is előidézhajjuk glükokortikoid kezeléssel, de ezzel egyidejűleg a TG2 indukálódását nem tudtuk kimutatni. Kísérleteink során arra keressük a választ, hogy mely anyagok működhetnek közre a timociták *in vivo* apoptózisa során, melyek a timociták szöveti környezetében megtalálhatóak és szükségesek a TG2

in vivo termelődéséhez. Laborunk korábbi adatai azt mutatják, hogy a timociták elhalását a tímuszban jelenlévő retinoidok és az apoptotikus sejteket el-takarító makrofágok által termelt transforming-growth -factor-béta (TGF-béta) is befolyásolhatja. Mind retinsav, mind TGF-béta kötőhely létezését le-írták a TG2 promóterében. Kísérleteinkben retinsav és TGF-béta hatását vizsgáljuk a TG2 mRNS-ének megjelenésére, a timociták glükokortikoid kivál-tott in vitro apoptózisa során. Adataink azt mu-

tatják, hogy a TGF-béta és a retinsav, valamint az apoptózist kiváltó glükokortikoid együttes hatása szükséges a TG2 mRNS hatásos indukciójához. In vivo apoptózis indukció során a TGF-béta hatás kö-zömbösítése vagy a retinsav szintézis gátlása meg-akadályozza a TG2 indukcióját. Mindez arra utal, hogy a retinsav és a TGF-béta is közrejátszik az apoptotikus timocitákban keletkező TG2 indukció-jában.

## A kutatóhelyek rövidítésének jegyzéke

ATC:	Agrártudományok Centruma	KTK:	Kertészettudományi Kar
ÁOK:	Általános Orvostudományi Kar	MTA:	Magyar Tudományos Akadémia
BAYGEN:	Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézet	MTK:	Mezőgazdaságtudományi Kar
BCE:	Budapesti Corvinus Egyetem	OEC:	Orvos- és Egészségtudományi Centrum
BZAKKA:	Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány	PTE:	Pécsi Tudományegyetem
DE:	Debreceni Egyetem	SE:	Semmelweis Egyetem
ELTE:	Eötvös Loránd Tudományegyetem	SzBK:	Szegedi Biológiai Központ
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory	SzTE:	Szegedi Tudományegyetem
KKK:	Kémiai Kutatóközpont	TTIK:	Természettudományi és Informatikai Kar
		TTK:	Természettudományi Kar



## Szerző szerinti mutató

<b>A</b>		Buza Á.	E2-05	Falus A.	E3-06, P3-01, P3-02, P3-03, P3-04, P3-06
Abdul Pahman, O.	E4-01, P4-20	<b>C</b>		Faragó N.	P4-07
Albert Zs.	P4-02	Casado C.	P4-01	Farkas I.	P4-08, P4-15
Alexa A.	E1-06	Cinar, R.	E1-02	Farkas V.	E2-03
Ambrus A.	P2-01	Czikora I.	P2-02, P2-04	Fekete Cs. A.	P2-05
Antal P.	E3-06, P3-01, P3-02, P3-03, P3-04, P3-06	Czirják G.	E6-02	Feldman K.	E4-02
Antalffy G.	E6-04	<b>Cs</b>		Ferhan, A.	P4-18
Arányi T.	E5-03	Csala M.	E5-02	Fésüs L.	E1-05, E5-01, P1-06, P4-14, P5-03, P5-09 P7-01
Arino J.	P4-01	Csanády L.	E6-06, P6-01	Fodor K.	E2-10
Arslan, A.	P5-01	Csepányi-Kömi R.	P1-04	Fodor L.	E6-05
<b>Á</b>		Csermely P.	E5-05, P4-22, P5-01, P5-06, P5-07	Friedrich P.	P4-13
Ábrahám E.	P4-08	Csikász-Nagy A.	E3-04	Fülöp K.	E5-03
Ádám Cs.	P4-01	Csomós K.	E5-01, P1-06	Fürst Gy.	E4-04
Ádám G.	P4-13	Csontné Kiricsi M.	P5-04	<b>G</b>	
Ádám V.	P2-01	Csontos Cs.	P2-02, P2-04, P2-08	Gádoros J.	P4-11
Ágyi Á.	P4-10	<b>D</b>		Gál P.	E2-09, E2-10
<b>B</b>		Damas, A. M.	P2-09	Garab Gy.	E2-05
Bacquet, C.	E5-03	Dancsó B.	E5-05, P4-22, P5-02	Garabuczi É	P7-01, P7-02
Bakó É.	P2-11	de Boussac, H.	E5-03	Gáspár R.	P4-09, P4-17
Bakota L.	P1-03	Deák Cs.	P4-02	Gausz J.	P4-13
Balaban, S.	E2-05	Dedinszki D.	P1-05	Geiszt M.	E5-04, P1-04
Balajthy Z.	E5-01, P1-06	Demetrovics Zs.	E5-06	Gergely P.	P2-02, P2-04, P2-08, P2-11
Balázs Z.	P3-06	Dobó J.	E2-09	Gézi A.	P3-01
Bálint É.	P4-03	Doleschall M.	E4-04	Girardin, S. E.	P1-02
Balla A.	E1-03	Dombrádi V.	P4-01, P4-05, P4-08, P4-13, P4-15	Gógl G.	E1-06
Balla T.	E0-01	Domingo-Sananes, M. R.	E3-05	Grabundzja I.	P4-12
Barna T.	P2-05	Doró Z.	P5-03	Gróf P.	P2-03
Barta Cs.	E5-06	Dosztányi Zs.	E3-03, P3-05	Gujdár A.	E5-04
Batta Gy.	P2-05	Dudits D.	P4-08	Gulya K.	P1-03
Bátori R.	P1-01	<b>E</b>		<b>Gy</b>	
Bécsi B.	P2-04, P2-11	Elek R.	P2-05, P4-01	Gyenis Á.	P4-03
Begüm, P.	P4-18	Elek Zs.	P4-06	Gyimesi M.	DE-02, E2-02, P2-06
Bence M.	P5-05	Enyedi Á.	E6-04	<b>H</b>	
Benkő Sz.	P1-02	Enyedi P.	E6-02	Hajós G.	P3-01, P3-02, P3-03
Bhavyashree, S.	P4-18	Erdélyi L.	E1-03	Harmat V.	E2-10, P2-14
Bianco, P.	P2-12	Erdődi F.	P1-01, P1-05, P2-02, P2-04, P2-11	Haroniti, A.	E0-03
Birkás E.	P1-03	<b>F</b>		Havelda Z.	P4-10
Bodai L.	P4-09, P4-17	Fábián G.	P4-18	Hegedűs B.	P4-07
Boratkó A.	P2-02	Faludi G.	P4-06, P4-20	Hegedűs L.	E6-04
Boros I.	E4-05, P4-04, P4-09, P4-17, P4-21, P5-04			Hegyi P.	P5-04
Borsos B.	P4-04			Hein C.	P2-10
Boyle, B.	E4-02			Héja D.	E2-09, P2-07, P2-16
Bozó T.	P2-03			Hetényi Cs.	P2-14
Bögel G.	E5-04				
Brauswetter D.	E4-03				
Buchan Gy.	P5-03				
Buday L.	E5-04				
Burgyán J.	P4-10				

Hodrea J.	E1-05	Kurtán T.	P4-14	<b>O, Ó</b>	
Hollfelder F.	P2-10			Osváth Sz.	E2-04
Horváth E. Zs.	P4-11	<b>L</b>		Ozohanics O.	P2-01
Horváth G.	P4-08	Laine C.	P2-10	Ózsvári B.	P4-07, P4-19
Horváth V. G.	E2-05	Lányi Á.	E5-04		
Hu, J.	P4-16	Lázár E.	P1-04	<b>P</b>	
Huliák I.	P4-04, P5-04	Ligeti E.	P1-04	Padányi R.	E6-04
Hullám G.	P3-04	Likó I.	E4-02	Páhi Z. G.	P4-21
Hunyady L.	E1-03	Lontay B.	P1-01	Pál Cs.	E3-02
<b>I</b>		Lór K.	E6-04	Pál G.	E2-09, P2-07, P2-16
Ivics Z.	P4-12	Lukács N.	P4-23	Panyi Gy.	E6-01
Izsvák Zs.	P4-12	<b>M</b>		Papp B.	E3-02
<b>J</b>		Mádi A.	P5-03	Papp D.	P5-07
Jakus Z.	E1-04	Magalhaes, J.	P1-02	Papp F.	E6-01
Jánosa D. P.	E2-05	Majai Gy.	E1-05	Papp I.	P4-02
Jonas S.	P2-10	Majoros L.	P4-15	Pászty K.	E6-04
Jordan, F.	DE-02, E2-01	Makovitzky J.	E2-05	Patócs A.	E4-02
<b>K</b>		Maksay G.	E6-05	Patócs A.	E4-04
Kajdi R.	P4-12	Manninger K.	P4-23	Patthy L.	E3-01
Kapuy O.	E3-05	Margaritis, T.	E0-03	Penke B.	P2-13
Karsai A.	P2-09	Martinez-Jimenezm C. P.	E0-03	Perczel A.	E2-03
Kása A.	P2-08	Mártonfalvi Zs.	P2-12	Pesti Sz.	P1-07
Katona G.	P2-14	Marx P.	P3-04	Petrényi K.	P4-01
Kékesi A. K.	E2-09	Medgyesi Á.	P4-18	Péter A.	E5-06
Kékesi O.	P1-03	Merényi G.	P2-15	Philpott, D. J.	P1-02
Kellermayer M.S.Z.	DE-02, E2-02, E2-08, P2-03, P2-06, P2-09, P2-12, P2-13	Mészáros B.	E3-03, P3-05	Pires, R. H. J.	DE-02, E2-02, P2-06, P2-09
Kenézlői E.	P4-11	Millinghoffer A.	P3-01, P3-04	Pócsi I.	P4-15
Kerekes É.	P4-13	Miskei M.	P4-15	Pomozi I.	E2-05
Keszler G.	E4-01, P5-05	Miskó A.	P4-02	Pomozi V.	E5-03
Kintses B.	P2-10	Mócsai A.	E1-04	Pop F.	P4-13
Király R.	P4-14, P5-09	Módos K.	DE-02, E2-02, P2-06	Pos V.	P4-23
Kiss A.	P1-05, P2-11	Mohan II, W. S.	E0-03	Pradeep Kumar Reddy, C.	P4-18
Kiss B.	E2-08, P1-10	Molnár E.	P4-18	Prohászka Z.	E4-04
Kiss L.	P2-05	Molnár M.	P4-01	Puskás L.	E4-06, P4-07, P4-18, P4-19
Kocsis A.	E2-09, E2-10	Murvai Cs. I.	P2-13		
Kókai E.	P4-13	Murvai Ü.	P2-03	<b>R</b>	
Kolozsvári B.	P2-11	<b>N</b>		Rác K.	E4-02
Korponay-Szabó I.	P5-09	Nagy G.	E4-03, P4-16	Radnai L.	P2-14
Kouskouti, A.	E0-03	Nagy J.	E1-05	Rapali P.	P2-14
Kovács E.	DE-01	Nagy L.	P4-12	Reményi A.	E1-06
Kovács L.	P4-15	Nagy L. I.	P4-19	Rígó G.	P4-24
Kovács L. G.	P2-03	Német I.	E5-01, P1-06	Róna G.	E2-07
Kovács M.	DE-02, E2-02, P2-06	Németh T.	E1-04	Rónai Zs.	E4-03, P4-06, P4-16
Kovács-Nagy R.	E4-03, P4-06, P4-16	Nemoda Zs.	P4-11, P4-20	Rosta K.	E4-01
Köröskényi K.	P1-09	Nguyen M. T.	P5-06	Rovó P.	E2-03
Kristó I.	P4-09, P4-17	Nikolich K.	E0-02	<b>S</b>	
Kukolya J.	P2-05	Novák B.	E3-05	Sahin-Tóth M.	P2-07
		<b>Ny</b>		Sándor K.	P1-09
		Nyitray L.	P2-14	Saraiva, M. J.	P2-09

Sarang Zs.	P5-08, P1-09, P1-10,	Szabó J. E.	P2-15	Tóth K.	P1-10
Sárközy P.	P3-06	Szabó M.	E2-05	Tóth K. Á.	P1-08
Sarlós K.	DE-02, E2-02, P2-06	Szabó Z.	E5-03	Tóth M.	P4-02, P4-03
Sasvári-Székely M.	E4-01, E4-03, E5-06, P3-06, P4-06, P4-11, P4-16, P4-20, P5-05	Szakács D.	P2-07, P2-16	Törőcsik B.	P2-01
Schauert T.	P4-21	Szakács G.	E6-03	Tretter L.	P2-01
Schemm, R.	E6-05	Szakál Z. T.	P2-17	<b>V</b>	
Simándi Z.	P4-12	Szalai Cs	P3-01, E3-06, P3-02, P3-03, P3-04	Válóczi A.	P4-10
Simon I.	E3-03, P3-05	Szalay K.	P3-07, P4-22	Váradi A.	E5-03
Simon-Vecsei Zs.	P5-09	Szántai E.	P4-06	Várallyay É.	P4-10
Sipeki Sz.	E5-04	Szántó G. T.	E6-01	Varga J.	E1-06
Sirokmány G.	P1-04	Szappanos Á.	E4-02	Várnai P.	E1-01, E1-03
Soltész-Katona E.	E1-03	Szarka A.	P4-24	Vér Á.	E4-01
Somlai G.	P7-01, P7-02	Szász R.	E2-09	Vereczkei A.	E5-06, P4-20
Somogyi A.	E4-03, P4-16, P4-20	Szikriszt B.	P4-23	Vergani, P.	E6-06
Somogyvári M.	E5-05, P4-22	Szilágyi Á.	E4-04	Vértessy B.	P2-15
Soós K.	P2-13	Szilágyi K.	E2-10	Vonderviszt F.	E2-06
Sóti Cs.	E5-05, P4-22, P5-01, P5-06, P5-07	Szondy Zs.	P1-09, P1-10, P7-01, P7-02	<b>W</b>	
Spiró Z.	E5-05	Szöllősi A.	E6-06	Wahlgren, W.	P2-14
Steinbach G.	E2-05	Szűcs M.	E1-02, P1-03	Whyte G.	P2-10
Stráner P.	E2-03	<b>T</b>		Wisniewski É.	P1-04
Strehler, E. E.	E6-04	Talianidis, I	E0-03	<b>Y</b>	
<b>Sz</b>		Tárnok Zs.	P4-11	Yu, P.	P4-08
Szabados L.	P4-24	Tatarakis, A.	E0-03	<b>Z</b>	
Szabó A.	P2-07	Temesi G.	E3-06	Zahuczky G.	E1-05
Szabó J.	P1-04	Tichy-Racs A.	P2-14	Závodszy P.	E2-09, E2-10
		Tora L.	E0-03	Zboray K.	P2-07
		Tóth B.	P5-09, P6-01	Zupcanova, A.	E2-05
		Tóth F.	P2-18	<b>Zs</b>	
		Tóth G.	E2-03	Zsigmond L.	P4-24
		Tóth J.	P2-15	Zsindely N.	P4-09, P4-17



## Nyomdai megoldások

**Névjegykártya, levélpapír, boríték**

**Plakát, poszter nyomtatás fotóminőségben**

**Könyvgyártás ragasztókötött és keménytáblás kivitelben**

**Irkafüzött füzetek, spirálozott jegyzetek, portfóliók**

**Fénykép nyomtatás, laminált, fóliázott nyomatok készítése**

**Kültéri táblák, molinók, matricák néhány nap alatt**

**Grafikai tervezés, szerkesztés, szkennelés, fénymásolás**

**Névre szóló ajándékok: csokoládé, falinaptár, évkönyv**

**Akciós szórólap és névjegy gyártás minden hónapban**

**Exkluzív rendezvény meghívók kreatív alapanyagokon**

**Egyedi pólófeliratok, színes fotók bármely szövött anyagra**

**BELVÁROSI NYOMDA**

**Litofilm Kft.**

**6721 Szeged, Lechner tér 12.**

**+36-62-541-048, -49, +36-30-682-0794**

**[www.litofilm.hu](http://www.litofilm.hu)**

