

Fényérzékenyítő anyagok sejtmembránba történő beépülésének vizsgálata modellrendszeren

A fotodinamikus reakciók alkalmazása széles körben elterjedt a vérkészítmények sterilizálásától kezdve egyes bőrbetegségek (pl. psoriasis), szembetegségek (pl. macula-degeneráció), valamint malignus daganatok terápiáján át az ateroszklerotikus plakkok kezeléséig. A létrejövő fotoszenzibilizáció szempontjából igen fontos a fényérzékenyítő anyagok sejtekhez történő asszociációjának ismerete, ugyanis a fotodinamikus hatás mértékét ez döntően befolyásolhatja. Munkánk során a sejtmembránban bekövetkező változások tanulmányozásához liposzómákat használtunk modellrendszerként, és arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a csak kismértékben eltérő fényérzékenyítő anyagok hogyan helyezkedhetnek el a lipid kettős-réteg környezetében, illetve, hogy a különböző kölcsönhatások érvényesülése révén milyen lesz a „kötőhelyek” eloszlása.

Legfontosabb módszerünk a nagyfelbontású fluoreszcencia-spektroszkópia volt, amelyet hagyományos abszorpciós és emissziós spektroszkópiával valamint fényszórásméréssel egészítettünk ki. Méréseinkhez kétfajta mezoporfirint (MP–dimetil-észter [MPE] és MP–dihidroklorid [MPCI]), valamint egykomponensű kis unilamelláris vezikulákat használtunk, amelyeket különböző szénatomszámú (14, 16, 18) telített zsírsavláncokat tartalmazó foszfolipidekből állítottunk elő. A liposzómák épségének, valamint méreteloszlásának ellenőrzését az említett kiegészítő módszerekkel végeztük. A nagyfelbontású vagy más néven „site”-szelektív fluoreszcencia-spektroszkópia alkalmazhatóságának elengedhetetlen feltétele az alacsony hőmérséklet (tipikusan 10 K), amely csak eszköz a nagy felbontás eléréséhez és a molekulák termikus mozgásából adódó zavarok csökkentéséhez. Ily módon a szobahőmérsékleten, fiziológiai körülmények között is létező állapotok egy pillanatképehez jutunk, és valójában ezt tanulmányozzuk. A fagyasztás előtt mintáinkhoz glicerint adtunk, amely egyrészt a membránstruktúra védelmét biztosítja, másrészt javítja a minta átlátszóságát. A módszer egyik jelentős előnye az, hogy az optikai jelet közvetlenül a membránhoz asszociálódó fényérzékenyítő adja és nem egy hozzáadott jelző, így elvileg az összes porfirin molekula jele detektálható.

A kellően felbontott spektrumsorozatokból elő tudtuk állítani a „kötőhelyek” jellemzésére használható eloszlásfüggvényeket. Ezek a függvények azt adják meg, hogy a porfirinmolekulák mekkora hányada gerjeszthető az adott frekvenciájú fényvel. Mivel a gerjeszthetőséget a porfirinmolekula és annak molekuláris környezete határozza meg, ezért az így kapott eloszlásfüggvénnyel az asszociáció helyeit, azaz a „site”-okat is jellemezhetjük. A meghatározott eloszlásfüggvények az MPE esetében két, míg az MPCI esetén egy Gauss-görbével illeszthetők. Az illesztett görbék paraméterei alapján az is kiderült, hogy az MPE egyik illesztett Gauss-görbéje megegyezik az MPCI eloszlásfüggvényével.

Mindebből két lehetséges „kötőhelyre” következtethetünk, de az MPCI esetében csak az egyik fordul elő. Az illesztési paraméterek további elemzése oda vezetett, hogy a két különböző „kötőhelyet” molekuláris szinten is azonosítani tudtuk: az egyik kötőhely nagy valószínűséggel a zsírsavláncok mentén, míg a másik a membránt alkotó két lipidmolekula-réteg között helyezkedik el. Ezek a helyek természetesen csak az eloszlásfüggvények várható értékeinek felelnek meg, amelyektől jelentős eltérések is megengedettek. A konvencionális spektroszkópiával meghatározott asszociációs állandók is alátámasztják ezt az elképzelést, ugyanis az MPE nagyobb affinitást mutatott a liposzómákhoz, mint az MPCI, tehát nagyobb eséllyel tud mélyebbre hatolni a két lipidmolekula-réteg közé.

A munka MPE-vel kapcsolatos részéről az első publikáció születőben van (submitted: JPC).
Témavezető: Dr. Herényi Levente

A glikogén szintáz kináz 3 β gén kópiaszám vizsgálata TaqMan próba alkalmazásával

Kérdésfeltevés: A Gsk3 β gén a bipoláris depresszió egyik kandidáns génje, mely a Wnt szignál útvonal kulcskomponense, valamint a lítium-sók célpontja. Egy nemrég megjelent közlemény szerint a gén 3' kódoló vége amplifikálódhat vagy delécióit szenvedhet. A megjelent közlemény alapján az is feltételezhető, hogy a Gsk3 β gén részleges kiesésének/ismétlődésének szerepe van a depresszió kialakulásában illetve a lítium-sókra adott válasz minőségében. Ezt a feltevést kívántuk jelen vizsgálatunkban megerősíteni vagy elvetni.

Alkalmazott módszerek: Jelen munkában TaqMan próbán alapuló real-time PCR módszert alkalmaztunk a Gsk3 β gén kópiaszám vizsgálatára 222 depresszióban szenvedő beteg és 181 egészséges kontroll személy DNS-ét felhasználva. A próbát és a primereket Primer Express programmal terveztük. Kontrollként RNázP amplifikációt végeztünk az ABI által tervezett primer/próba rendszerrel. A kontroll és a Gsk3 β gén amplifikációjának C_t értékeit meghatározva számoltuk a vizsgált gének amplifikációjának relatív hatékonyságát, illetve a két gén relatív arányát. A kontroll génszámot kétszörösére számoltuk a mért gén kópiaszámát.

Eredmények: A tervezett TaqMan rendszer alkalmasnak bizonyult mennyiségi mérésre, mivel a különböző DNS oldatok hígítási fokának függvényében ábrázolt C_t értékek egyenesesinek meredeksége jól közelítette az elméleti optimális értéket (-3,32). Így a kidolgozott TaqMan rendszert felhasználtuk a laboratóriumban rendelkezésre álló 222 depresszióban szenvedő beteg és 181 kontroll személy Gsk3 β gén kópiaszám vizsgálatára. Az eredményeket eset-kontroll asszociációs analízisben kívánjuk felhasználni.

Következtetések:

A kidolgozott TaqMan rendszer alkalmas a Gsk3 β gén amplifikációjának vizsgálatára. A vizsgálati rendszer több szempontból is eltér a szakirodalomban leírt módszertől, amennyiben (1) valóban a Gsk3 β gén amplifikációját vizsgáljuk és (2) a Sybr Green festésnél jóval megbízhatóbb és specifikusabb TaqMan rendszert használjuk fel a Gsk3 β gén kópiaszámának meghatározására.

Publikációk:

A témavezető csoportjában hosszabb ideje foglalkoznak a bipoláris depresszió genetikai rizikófaktorainak kutatásával. Eddig azonban elsősorban SNP-t (1), illetve hosszúságpolimorfizmust (2) vizsgáltak. A jelen munka elsőként foglalkozik munkacsoportunkban a bipoláris depresszió kialakulásában esetlegesen szerepet játszó CNV-vel. A jelen vizsgálatban kidolgozott TaqMan rendszert a munkacsoport felhasználta egy új CNV módszer kidolgozásának validálására is (3).

1. Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 Gene: A dimensional approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Jun 9. [Epub ahead of print]

2. Sarosi A, Gonda X, Balogh G, Domotor E, Szekely A, Hejjas K, Sasvari-Szekely M, Faludi G. Association of the STin2 polymorphism of the serotonin transporter gene with a neurocognitive endophenotype in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 Jul 3. [Epub ahead of print]

3. Szantai E, Elek Zs, Guttman A, Sasvari-Szekely M. (2008) Candidate gene copy number analysis by PCR and multicapillary electrophoresis. *Electrophoresis* (közlésre elfogadva)

Témavezető: Dr. Szantai Eszter és Dr. Sasvári Mária

Protein-protein interakció hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1-es típusa között

A kortizol prereceptorális aktiválásában, s így a metabolikus szindróma patogenezisében a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PDH) és a 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD1) együttműködése alapvető jelentőségű. A H6PDH biztosítja a kofaktor NADPH-t a 11 β -HSD1 számára. A célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, van-e közvetlen fehérje-fehérje interakció a két enzim között, ami szerepet játszik a 11 β -HSD1 enzim aktivitásában.

11 β -HSD1-t és H6PDH-t nem expresszáló HEK-293 sejteket vad és mutáns 11 β -HSD1-gyel, valamint más szteroid dehidrogenáz-reduktáz aktivitású enzimekkel transzfektáltuk és mértük a 11 β -HSD1 enzimaktivitását. Koimmunoprecipitációval, Far-Western módszerrel és fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálattal pedig a fehérje-fehérje interakciókat vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a H6PDH koprecipitálható 11 β -HSD1-vel, míg 11 β -HSD2-vel és 17 β -HSD2-vel nem. Az interakció további vizsgálata céljából a korábban leírt 11 β -HSD1 és 11 β -HSD2 kimérékkel végeztünk vizsgálatokat. Azt tapasztaltuk, hogy a 12F kiméra, mely a 11 β -HSD1 N-terminális 39 aminosavát tartalmazza, koprecipitálódik H6PDH-zal, míg a 21F kiméra, melyben a 11 β -HSD1 C-terminális régiója szerepel, elveszíti koprecipitációs képességét. Far-Western blot kísérleteknél a transzfektált HEK-293 sejtek lizátumait vittük fel SDS-PAGE géltre, majd a nitrocellulóz membránt tisztított myc-tag H6PDH-zal inkubáltuk. A membránhoz kapcsolódott fehérjéket anti-myc antitesttel jelöltük. A Far-Western blot kísérletek is megerősítették, hogy a 12F kiméra megtartotta H6PDH interakciós képességét, míg a 21F kiméra elvesztette azt.

Feltételezésünk szerint a 11 β -HSD1 N-terminális transzmembrán hélixében található tirozinok fontos szerepet töltenek be a NADPH megkötésében. Az enzim további megismerése céljából a fehérje N-terminális négy tirozinját alaninra cseréltük (Y18-21A), majd összehasonlítottuk a vad és mutáns 11 β -HSD1 interakciós és enzimatis tulajdonságait. A mutáns 11 β -HSD1 szignifikánsan erősebb precipitációt és interakciós szignált mutatott, viszont ötször alacsonyabb kortizon redukáló hatásra volt képes, amit a H6PDH jelenléte nem tudott fokozni. Hipotézisünk szerint ezzel a mutációval az enzim azon konformációjának kialakulását gátoltuk, ami kedvez a NADPH kötődésének. Hiába az erősebb interakciós készség, valamint a H6PDH biztosította kofaktorellátottság (NADPH), a mutáns enzim nem tudta fokozni kortizon redukáz aktivitását.

A FRET vizsgálat során két különböző fluoreszcens festékkel jelölt fehérjemolekulát vizsgáltunk. A fluoreszcens festékeket úgy választottuk meg, hogy az egyik emissziós spektruma egybeessen a másik gerjesztési energiájával. Amennyiben a két fehérje egymáshoz közel helyezkedik el, az első gerjesztésére a második kapcsolt fehérje emisszióját tudjuk mérni. Az energiaátadás hatékonyságát befolyásoló legfőbb tényező a két molekula távolsága. A FRET módszer kiválóan alkalmazható molekuláris asszociációk, interakciók kimutatására. Eredményeinkben azt kaptuk, hogy a C-terminálison ECFP-hez fuzionált 11 β -HSD1 illetve N vagy C terminálison EYFP-hez fuzionált H6PDH erős interakciót mutat intakt sejteken.

Összefoglalva elmondhatjuk: koimmunoprecipitációs, Far-Western és FRET módszereket alkalmazva szemléltettük a direkt fehérje-fehérje interakciót a 11 β -HSD1 és a H6PDH között sejthomogénátumban és intakt sejteken is.

Mihalik Ágoston ÁOK IV

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

Stressz hatása az élesztő fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatára

A biológiai rendszerekről rendelkezésre álló adattömeg az elmúlt években rohamos növekedésen ment keresztül. Mivel ezen adatok nagy része gyógyászati jelentőséggel is bír, így kiemelt jelentőségű a megfelelő értelmezésük, hogy a megszerzett tudást a jövőben terápiás cézzal is hasznosíthatni lehessen. A helyes megközelítéshez szükség van olyan átfogó elemző módszerekre, mint amilyen az általunk alkalmazott hálózatelemzés. Vizsgálatunkban azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy képet kapjunk az élesztő (*S. cerevisiae*) fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatának (interaktómjának) különböző stresszhelyzetekben bekövetkező változásairól. A témavezetőm előzetes adatokat közölt arról, hogy az élesztő-interaktóm moduláris szerkezetére milyen általános változások a jellemzőek egy képzetes, általános stressz hatására (Palotai és mtsai, 2008), azonban e munkában sem e változások részletes vizsgálata, sem pedig funkcionális következményeik elemzése nem történt meg. Ilyen eredmények a szakirodalomban sem találhatók.

Az élesztő-interaktóm fehérje csoportjait (moduljait) a témavezetőm munkacsoportjában (www.linkgroup.hu) nemrég kifejlesztett ModuLand eljáráscsaláddal határoztuk meg (Csermely és mtsai, 2006). Az általunk használt nagy megbízhatóságú élesztő-interaktómot (2444 fehérje, 6271 kapcsolat) kezdetben egységnyi súlyokkal vizsgáltuk. Megmutattuk, hogy 13 stressz körülménynek a génexpresszióra gyakorolt átlagolt hatását a fehérje szintekre modellezve a fehérje interaktóm moduljainak száma nő, a modulok átfedése csökken, valamint csupán 1-2 fehérje igen gazdaságos kicserélésével néhány modul funkciója gyökeresen megváltozik. Az elemzésben használt interaktóm korlátainak megismeréséhez eltérő méretű és kapcsolati sűrűségű hálózatokkal (www.string.embl.de) is kiegészítettük a fenti elemzést. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az interaktóm mérete és kapcsolatsűrűsége igen nagy mértékben modulálja a fenti eredményeket (Mihalik és mtsai, 2008). Elemzésünket több adatsorból származó, valós mRNS mennyiségekkel megismételve arra a következtetésre jutottunk, hogy az átlagos stressz alkalmazása elnagyolt, és a hatások nyomon követésére szükség van az egyedi stresszállapot vizsgálatára is. Megfigyeltük, hogy a különböző stresszorok eltérő kinetikájú stressz választ hoznak létre, amelyben mind az időbeni lefutás, mind pedig az mRNS expresszió és lebomlás mértéke fontos szabályozója lehet az interaktóm stresszben bekövetkező funkcionális átalakulásainak. Elemzésünket direkt fehérje-mennyiségi adatok elemzésével is kiegészítettük. Általánosságban elmondható, hogy az élesztő interaktómja stresszben egy sor olyan dinamikus módosulást mutat, amely fontos az egyedi stressz-adaptációban és tartalmaz olyan statikus változásokat is, amelyek a hálózat integritásának, és így a sejt életének a fenntartásáért felelősek. Vizsgálataink igen fontos jelentőséggel bírnak a stressz-válasz és a biológiai adaptáció rendszer-szemléletű megértése szempontjából, és rámutatnak a jelenleg elérhető adatbázisok alkalmazásának buktatóira is.

Csermely, P., Korcsmáros, T., Kovács, I. és Szalay, M. (2006) Method for analyzing the fine structure of networks. WO2007093960 szabadalmi bejelentés.

Mihalik, Á., Palotai, R. és Csermely, P. (2008) Stressz hatása az élesztő fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatának modulszerkezetére. Biokémia 32, 67 (poszter absztrakt).

Palotai, R., Szalay, M. S. és Csermely, P. (2008) Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases. IUBMB Life 60, 10-18.

Témavezető: Prof. Csermely Péter

Nánási Tibor ÁOK V, Rák Ádám PPKE ITK V

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Mol. Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest és Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai Kar, Robotika Labor, Budapest

Caspasia – a kaspáz szubsztrát-rendszer hálózatos elemzése, mint az apoptózis új modellje

A humán sejtek apoptózisa során mintegy 420 különböző fehérjét hasítanak el az aktíválódott kaspáz-proteáz rendszerek. Témavezetőnk korábban már vizsgálta a genetikai regulációs hálózatok károsodásának következményeit, arról azonban, hogy apoptózisban miért kell ennyi fehérjét elhasítani, és miért pont ezeket a fehérjéket célozza meg a programozott sejthalál folyamata, hálózatos elemzés még nem született. Hasonlóan, a poszt-apoptotikus humán proteóm hálózatelméleti elemzését sem végezték még el soha.

Vizsgálatainkban azokra a kérdésekre kerestünk választ, hogy (1) mennyire számítanak a humán fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatban az apoptózis-szubsztrátok kitüntetett elemeknek, (2) kaspáz-hasítás utáni kiesésük esetén a hálózat mennyiben sérül, valamint, hogy (3) kiválasztásuk mennyire tudható be a célzott evolúciós fejlődésnek, és mennyiben véletlenszerű.

Munkánk során a STRING proteomikai adatbázis egy finomított változatát használtuk. Ez 10.847 humán fehérje 204.172 súlyozott kapcsolatát írja le. A humán fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat elemzéséhez egyrészt a témavezetőnk munkacsoportja által kifejlesztett, és a tavalyi diákkörös konferencián bemutatott ModuLand programcsomagot, másrészt egy saját készítésű modularizáló szoftvert használtunk. Ezután egy önoptimalizáló genetikai algoritmus segítségével választottuk ki a hálózatot legjobban szétverő, hasonló elemszámú célpontlistát, hogy megállapítsuk, hogy a természetes folyamat mennyire jól optimalizált a hálózat degradálása szempontjából. Eredményeinket a CytoScape programmal vizualizáltuk.

A két adatbázisban leírt 420 apoptózis-szubsztrát közül mindössze 222-t sikerült egyértelműen azonosítanunk a STRING adatbázisban. Azonban, már ezen elemek vizsgálata során is kiderült, hogy a szubsztrátok jellegzetes hálózati paraméterei (centrality, bridgeness, insidebridgeness, betweenness centrality) 5-7-szeres mértékben haladják meg a STRING-ben szereplő fehérjék hasonló értékeinek átlagát, valamint, ezen paramétereik eloszlása is statisztikailag szignifikánsan különbözik a teljes gráfban látható eloszlástól. Saját modularizáló algoritmusunk szerint az eredeti hálózat 208 moduljából mindössze 83 marad meg a szubsztrátok elvétele után. Ezek a változások, a random kontrollokkal összehasonlítva (159-183 maradék modul), kiemelkedően szignifikánsnak mondhatók. Kontrollcsoportként felhasználtuk még a kemoterápia-rezisztens ráksejtekben megváltozó fehérjék listáját, és más proteáz-csoportok szubsztrátjainak listáját (kalpain szubsztrátok) is. A genetikai algoritmus által kijelölt, „hálózatszétverő” célpontok hálózatból történő elvétele esetén hasonlóan szignifikáns eredményeket kaptunk. A mesterséges célpontok és a természetes szubsztrátok „hálózatszétverő teljesítményének” összehasonlítása a jelenlegi adatok alapján arra enged következtetni, hogy az apoptózis folyamata a proteomikus hálózat degradálására rendkívül magas fokon optimalizált.

Agoston, V., Csermely, P. és Pongor, S. (2005) Multiple, weak hits confuse complex systems: a transcriptional regulatory network as an example. *Phys. Rev. E* 71, 051909

Csermely, P., Korcsmáros, T., Kovács, I. és Szalay, M. (2006) Method for analyzing the fine structure of networks. WO2007093960 szabadalmi bejelentés

Témavezető: Prof. Csermely Péter

A Caskin1 és az Abi2 kapcsolatának vizsgálata

Az elmúlt években világossá vált, hogy a jelátvitelben az enzimaktivitás szabályozásán kívül a specifikus és szabályozott fehérje-fehérje interakcióknak is fontos szerepük van. Ezen interakciók kialakításában különböző funkcionális egységek, domének vesznek részt. A szignáltranszdukcióban fontos állvány- illetve adapter fehérjék számos domént tartalmaznak, segítségével a jelátvitelben fontos multiprotein komplexek jöhetnek létre. Munkacsoportunk kutatásának középpontjában egy ilyen állványfehérje, a Caskin1 áll. A Caskin1 az idegrendszeri szinapszisokban, elsősorban a posztszinaptikus denzitásban kifejeződő fehérje, elsőként a Cask nevű fehérjével való interakciója alapján írták le. Szerkezetét ismerve számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban lehet szerepe, ám eddig csak a Cask-kal írták le interakcióját, a fehérje pontos funkciója pedig mindeddig ismeretlen. Munkacsoportunk célul tűzte ki további kötépartnerek keresését és ezzel összefüggésben a fehérje jelátvitelben betöltött szerepének tisztázását.

Munkacsoportunk korábban élesztő két-hibrid rendszer segítségével kimutatta, hogy a Caskin1 számos fehérje partnerrel alkothat komplexet. Ezen fehérjék közül az Abi2-vel való interakciót tanulmányoztuk részletesen. Az Abi2 (Abl-interactor 2) fehérjét korábban ugyancsak élesztő két-hibrid rendszerben azonosították, mint az Abl és Arg tirozin-kinázok szubsztrátját. Legnagyobb mennyiségben az agyban fejeződik ki és az aktin citoskeleton szabályozásában fontos szerepet játszó fehérjekomplex tagja. Az Abi2 knockout egérben súlyos idegrendszeri mutációk tapasztalhatók.

A Caskin1 fehérje Abi2-vel való kapcsolatát *in vitro* GST precipitációs kísérletekkel vizsgáltuk. Ennek során a teljes hosszúságú Caskin1 fehérjét, valamint különböző doménjeit glutation-S-transzferáz fúziós fehérjeként fejeztük ki, majd a fehérjéket GFP-Abi2-t overexpresszáló Cos7 sejtek kivonatával és patkányagy-kivonattal inkubáltuk. A Western blotot anti-GFP ellenanyaggal hívtuk elő. Tovább szeretnénk volna pontosítani a két fehérje kötődési helyét, ezért az Abi2 SH3-doménjét kötő prolin-gazdag régiót négy részre daraboltuk és az előzőekben ismertetett módszerrel pontosan lokalizáltuk a kötődésért felelős régiót. Következő lépésben bizonyítottuk, hogy az Abi2 SH3-doménje felelős a Caskin1 fehérjével való interakcióért. Ennek során az Abi2 SH3-doménjét fejeztük ki GST-fehérje formájában, patkányagy-kivonattal inkubáltuk, majd a membránt Caskin1-antitesttel hívtuk elő. A Caskin1-Abi2 kapcsolatot *in vivo* is igazoltuk immunprecipitációs módszerrel. A kísérletben V5 címkével jelzett Caskint és GFP-Abi2-t overexpresszáló Cos7 sejt kivonatot használtunk. Kontroll, illetve V5 címke elleni ellenanyaggal immunprecipitáltuk a Caskint a lizátumból, majd a membránt anti-GFP ellenes antitesttel hívtuk elő.

Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az Abi2 SH3-doménjével kötődik a Caskin1 prolingazdag régiójához. Ez a kapcsolat azért is érdekes, mert az Abi2-nek eddig nem ismert az idegrendszerben interakciós partnere. Az interakciót mind *in vitro*, mind *in vivo* módszerekkel igazolni tudtuk. A Caskin1/Abi2 komplex idegrendszerben betöltött funkciója jelenleg még nem ismert, azt munkacsoportunk intenzíven vizsgálja.

Témavezető: Balázs Annamária, Dr. Buday László

Az Nr1i2 (pregnán X receptor) gén kópiaszám vizsgálata

Kérdésfeltevés: Az Nr1i2 gén a harmadik kromoszóma hosszú karján helyezkedik el a glikogén szintáz kináz β (Gsk3 β) gén közvetlen szomszédságában. Irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy az Nr1i2 gén teljes egészében, míg a Gsk3 β gén részben érintett a régió amplifikációjában illetve deléciójában. Egy 2007-es vizsgálatban kimutatták, hogy a glikogén szintáz kináz β (Gsk3 β) gén amplifikációjának, illetve deléciójának szerepe van a depresszió kialakulásában. Az alkalmazott PCR primereket és a teljes genom analízis adatait figyelembe véve azonban felmerült az a lehetőség, hogy az esetleges pszichogenetikai hatás valójában nem a Gsk3 β gén, hanem az Nr1i2 gén amplifikációjának tulajdonítható. Ezért real-time PCR TaqMan rendszer segítségével megvizsgáltuk az Nr1i2 gén kópiaszámát 222 depresszióban szenvedő és 181 kontroll személy DNS mintáiban.

Alkalmazott módszerek: A vizsgált betegek és kontrollok DNS mintái a laboratóriumban rendelkezésre álltak. Az Nr1i2 gén valós idejű PCR amplifikációja a szakirodalomban leírt módszerrel történt, TaqMan próbán alapuló real-time PCR-el. Kontrollként RNázP amplifikációt végeztünk az ABI által tervezett primer/próba rendszerrel. A kontroll és az Nr1i2 gén amplifikációjának C_t értékeinek hányadosából számoltuk a két gén relatív arányát.

Eredmények: A használt TaqMan rendszerek megbízhatóságáról úgy bizonyosodtunk meg, hogy felvettük az amplifikáció C_t értékeinek DNS koncentráció függését azonos DNS mintából kiindulva. Az alkalmazott Taqman rendszerek alkalmasnak bizonyultak kvantitatív mérésre. A vizsgált személyek körében a leggyakrabban a diploid kromoszómáknak megfelelő 2-es érték fordult elő. Találtunk azonban olyan eseteket is, amikor az egyik kromoszómán genduplikáció történt, így a vizsgált gén összesen 3 példányban fordult elő.

Következtetések: A kapott eredményeket két szempont alapján értékeljük ki: (1) személyenként összehasonlítjuk a jelen munkában meghatározott Nr1i2 génszámot az ugyanebből a mintából mért Gsk3 β génszámmal, illetve (2) eset-kontroll analízissel összehasonlítjuk a vizsgált beteg és kontroll mintában előforduló amplifikációk gyakoriságát.

Publikációk: A jelen munka új eleme az, hogy a Gsk3 β génszám variációkat összekapcsolja az Nr1i2 génszám mérésével. A munka szorosan kapcsolódik Kecskeméti András által bemutatott eredményekhez (1), melynek témája a Gsk3 β génszám meghatározása ugyanezen betegeken; továbbá kapcsolódik Elek Zsuzsa által bemutatandó eredményekhez (2,3), amennyiben az Elek Zsuzsa által kidolgozott új módszer validálása a jelen eredmények alapján történt. A bemutatott vizsgálat módszertanilag kapcsolódik a munkacsoport korábbi komplement C4 gén kópiaszám vizsgálataihoz (4), cél génjében azonban eltér.

1. Kecskeméti András, Sándor Ágnes: A glikogén szintáz kináz β gén kópiaszám vizsgálata TaqMan próba alkalmazásával (SOTE TDK 2009)

2. Elek Zsuzsa: Génszám polimorfizmus vizsgálat PCR és kapilláris elektroforézis technikával (SOTE TDK 2009)

3. Szantai E, Elek Zs, Guttman A, Sasvari-Szekely M. (2008) Candidate gene copy number analysis by PCR and multicapillary electrophoresis. Electrophoresis (közlésre elfogadva)

4. Szilagyi A, Blasko B, Szilassy D, Fust G, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes. BMC Genet. 2006 Jan 10;7:1.

Témavezető: Dr. Szantai Eszter és Dr. Sasvári Mária

Foszfoglicerát kináz folding és misfolding energiefelületének összehasonlítása

A fehérjék működőképes térszerkezetének kialakulásához szükséges információ a polimer szekvenciájában van kódolva. A kód „kiolvasását” a fehérje véletlenszerű konformációból aktív struktúrába történő gombolyodása (folding) jelenti. Sok fehérje képes arra, hogy a környezetétől függően egymástól lényegesen eltérő szerkezeteket hozzon létre. A biológiailag inaktív szerkezetek kialakulását hibás gombolyodásnak (misfoldingnak) nevezzük.

A fehérjék gombolyodásának és a misfoldingjának a vizsgálata orvosi szempontból igen fontos. Mintegy húsz olyan betegség ismert (pl. Alzheimer kór, diabetesz II., Creutzfeldt-Jacob szindróma), amelyeknél a probléma az, hogy natív állapotukban vízdékony fehérjék amiloid plakkokban rakódnak le. Az amiloid szerkezetek egy több lépésből álló szerkezetváltozási folyamatlánc végállapotát jelentik, amely a natív állapottal versengve alakul ki. A natív és az amiloid szerkezetek kialakulását irányító intra- és intermolekuláris kölcsönhatások feltárása és a szerkezetváltozásokat leíró termodinamikai modellek megalkotása segíthet az amiloidózissal járó betegségek jobb megértésében és gyógyításában.

A makromolekuláris szerkezetváltozások és kölcsönhatások mechanizmusába mély betekintést nyújtanak az energiefelület modellek. A fehérje minden egyes állapotához hozzárendelhető a fehérje-oldószer rendszer szabad entalpiája, amely a fehérje konformációs tere fölött értelmezett energiefelület rajzol ki. Állandó nyomáson és hőmérsékleten a rendszer a legkisebb szabad entalpiájú állapot felé fog "folyni" az energiefelületen.

Bizonyos körülmények között az élesztő foszfoglicerát kináz (PGK) is hajlamos a natívtól eltérő, magasabb béta sík tartalommal rendelkező szerkezet létrehozására és amiloid fibrillumok kialakítására.

A munkám célja az volt, hogy PGK-t használva modellként, feltárjam és egy energiefelület modellben értelmezsem a fehérjék folding és misfolding folyamatainak termodinamikai különbségeit.

A munka előzménye, hogy témavezetőm elkészített egy olyan energiefelület modellt, amely a PGK foldingját az 1 ms-tól a teljes felgombolyodásig leírja.

Kísérleteim első lépéseként előállítottam és tisztítottam a PGK enzimet. A fehérje natív szerkezetét alacsony ionerősségű savas közegbe dializálva (pH:2.0) destabilizáltam. Az így kigombolyított fehérjében új szerkezet kialakulását indukáltam egy pH és ionerősség változással. A pufferkörülmények gyors ugrását stopped-flow vagy kézi keveréssel hoztuk létre. A fehérje szerkezetváltozását triptofán fluoreszcencia mérésével követtem nyomon 1 ms-tól 5 napig. Semleges pH-n a PGK 15 perc alatt kialakítja a natív szerkezetét. A savas tartományban megfigyelhető misfolding napokat vesz igénybe. Az élesztő foszfoglicerát kináz szerkezetváltozását a pH és az ionerősség változtatásával folytonosan lehetett hangolni a folding és a misfolding között. Ez lehetővé tette, hogy a folding és a misfolding energiefelületének közötti folyamatos átmenetet megfigyeljük, és a két felület közötti különbségeket értelmezzük.

A témavezetőmnek, a munkámhoz kapcsolódó publikációi:

Osváth S, Herényi L, Závodszy P, Fidy J, Köhler G (2006) *Journal of Biological Chemistry* 281, 24375–24380

Osváth S, Jäckel M, Agócs G, Závodszy P, Köhler G, Fidy J (2006) *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* 62, 909-917

Osváth S, Köhler G, Závodszy P, Fidy J (2005) *Protein Science* 14, 1609-1616

Osváth S, Sabelko JJ, Gruebele M (2003) *Journal of Molecular Biology* 333, 187-199

Osváth S, Gruebele M (2003) *Biophysical Journal* 85, 1215-1222

Témavezető: Dr. Osváth Szabolcs

Plazmin aktivitás vizsgálata gél-fluid határfelületen

A gél fázisú fibrin-alvadék feloldása, plazmin általi proteolízise fiziológiai körülmények között folyékony fázis (vérplazma) felől történik. Ebből a fázisból megközelítve a fibrin, a plazmin mind hasításra érzékeny peptid kötésben szereplő lizin oldalláncokhoz, mind a hatására szabaddá váló új C-terminális lizinekhez kötődik. Ezen határfelületen létrejövő enzim-szubstrát kölcsönhatás enzimatikai leírására eddig még nem született elfogadható modell, amely a plazmin hatékonyságot befolyásoló tényezőket adekvát módon jellemezné.

A fibrinogén-fibrin átalakulás (különböző trombin koncentrációk mellett) nyomon követésére, valamint a plazmin általi lízis vizsgálatára turbidimetriás módszert alkalmaztunk. A fibrin szerkezetének részletesebb jellemzésére scannelő elektronmikroszkóppal (SEM) készített képeket használtunk.

A lízis vizsgálata során kiderült, hogy az időben folyamatosan lassul, ám a lassulás mértéke meghaladja azt a rátát, amely az enzim folyamatos hígulása alapján várható volna. Ennek magyarázatára 3 hipotézist állítottunk fel: (1) gátló peptidek felszabadulása a proteolízis során; (2) a hasítás folytán olyan „ineffektív” plazminkötőhelyek (C-terminális lizin) kerülnek felszínre, amelyek elvonják a plazmint, így csökkentve a valóban aktívan hasító enzim-poolt; (3) fraktákinetikai viselkedés: a határfelületi fibrinszálak „irányítják” az enzimet, a plazmin eloszlása a fibrinmátrix mentén inhomogénné válik, amely a K_m -érték látványos időfüggő növekedésében nyilvánul meg. A három hipotézisnek megfelelő enzimkinetikai modelleket állítottunk fel és összevetettük az általuk megjósolt lízis lefolyást a mért lefolyással. Ennek alapján az (1) hipotézis kizárható, (2) és (3) szerinti modell azonban kielégítően írja le a tapasztaltakat. A továbbiakban α -aminokapronsav (lizin-analóg), illetve karboxipeptidáz mellett vizsgáltuk a fibrinolízist, melyek megszüntetik a (2) hipotézisben szereplő kölcsönhatásokat. Hatásukra a fibrin oldása felgyorsul, ami a (2) hipotézis mellett szól.

Mivel a fibrinolízis sebességét a kísérletek során a fibrin kiindulási turbiditása is befolyásolta, amely összefügg a fibrin szerkezetével, ennek jellemezésére különböző trombin koncentrációk mellett létrejött fibrinszálak szerkezeti paramétereit vizsgáltuk SEM-val. Ennek alapján szignifikáns összefüggés mutatkozott az átlagos fibrinszálméret és az alvadáshoz használt trombin koncentráció között, amely valószínűleg befolyásolja a lízis sebességét is.

Összegzésül elmondható, hogy a fibrinolízis időbeli lassulásában a folyamat során hozzáférhetővé váló, a plazmin számára kötőhelyet jelentő C-terminális lizinek szerepe jelentős, bár egyelőre a fraktákinetikai viselkedés sem zárható ki. Az adekvát modell birtokában kvantitatív képet tudunk nyerni a plazmin hatékonyságát befolyásoló tényezőkről: így pl. milyen litikus kövekezményekkel jár a most leírt összefüggés a fibrinszálak átmérője és a fibrin létrehozó trombin koncentrációja között.

Az ismertetett vizsgálatok követik a Hemosztázis munkacsoport kutatásainak, cikkeinek irányvonalát, azonban a fenti eredményekről publikáció mindeddig nem született.

Témavezető: Dr. Kolev Kraszimir

Vereczkei Andrea, SZIE-ÁOTK alkalmazott zoológus V.

Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Mol. Biol. és Pathobiokémiai Int., Budapest

Dopaminerg kandidáns génpolimorfizmusok heroinfüggőségben

Kérdésfelvetés: A súlyos társadalmi problémát jelentő heroinfüggőség a komplex betegségek közé tartozik, hiszen kialakulásában genetikai és környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak. A dopaminerg rendszer az agy jutalmazó központjának része, ezért a neurotransmisszióban szerepet játszó különböző fehérjék génjeit a függőség kandidáns génjeinek tartják. Több tanulmány is foglalkozott már a heroinfüggőségben szerepet játszó kandidáns gének vizsgálatával, de sok ellentmondásos eredmény született, ezért célunk többek között az volt, hogy a magyarországi populáción végzett vizsgálatainkkal állást foglaljunk a témában. Eset-kontroll vizsgálatunkban hét dopamin-, illetve szerotonin-rendszerhez kapcsolható génnek összesen 16 polimorfizmusát vizsgáltuk 300 heroinfüggő és 555 egészséges kontroll személy összehasonlításával.

Alkalmazott módszerek: A DNS-ek elemzését a SE Orvosi Vegytani Intézetében végeztem, ahol a DNS-ek izolálását követően PCR-es amplifikáció után egy emésztéses folyamat következett, s a kívánt DNS genotípusokat gélelektroforézis, illetve eGene (multikapilláris elektroforézis) segítségével határoztam meg. A vizsgált polimorfizmusok a dopamin D4-es receptor gén (DRD4) kódoló régiójának (3-as exon VNTR – változó számú tandem ismétlődések), illetve 5' régiójának (-521CT, -616CG, -615AG SNP-k - egy pontos nukleotid variációk - és a 120 bázispáros duplikáció) polimorfizmusai; a dopamin transzporter (DAT) 3' VNTR és 8-as intron VNTR polimorfizmusai; a szerotonin transzporter (SERT) 5' régiójának (5-HTTLPR) és a 2-es intronjának (STin2) polimorfizmusai; a katekol-O-metiltranszferáz (COMT) Val158Met SNP polimorfizmusa; a monoamino-oxidáz (MAO-A) 5' VNTR polimorfizmusa; a butiril-kolinészteráz (BCHE) gén K-variánsa és az 1914 polimorfizmusa, illetve a dopamin D2-es receptor (DRD2) TaqIA, TaqIB és TaqID polimorfizmusai. Ezen három Taq polimorfizmus állt a kutatásom középpontjában.

Eredmények: Az eredmények szignifikáns kapcsolatot mutattak az általam vizsgált DRD2 TaqIA és TaqIB polimorfizmusai illetve a heroinfüggőség között mind az allél-, mind a genotípus eloszlásukat nézve, s ezen szignifikancia a Bonferroni-korrektúra után is megmaradt. Ezen kívül a kutatócsoport által végzett egyéb génpolimorfizmus vizsgálatok közül a MAO-A esetében mutattak ki szignifikáns különbségek a nők heroinos- és kontrollgenotípus-eloszlásai között.

Következtetések: A magyarországi mintákon végzett kandidáns gén vizsgálatunk eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a dopamin D2-es receptor gén TaqIA és TaqIB polimorfizmusai hozzájárulhatnak a heroinfüggőség kialakulásához.

Publikációk: A kutatócsoportban korábban végzett vizsgálatokhoz képest növeltük a heroinfüggőktől származó minták számát és a korábban még nem vizsgált BCHE génpolimorfizmusokat is bevettük az analízisbe.

1. Csaba Barta, Maria Sasvari-Szekely, Adrien Devai, Erika Kovacs, Maria Staub and Peter Enyedi: Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Mol Gen Metab*, 2001, 74(4): 484-488.
2. Boór K, Gaszner P, Barta C, Kalász H, Sasvári-Székely M. A kábítószerfüggés genetikai hátterének vizsgálati módszerei. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2003, V/3. 143-151.
3. Szilagyi A, Boor K, Szekely A, Gaszner P, Kalasz H, Sasvari-Szekely M, Barta C. Combined effect of promoter polymorphisms in the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter genes in heroin dependence. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2005, VII/1; 28-33.

Témavezető: Dr. Barta Csaba

Aktivált neutrophil granulocyták hatása az érfal trombogénitására

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint magas nyírási sebesség mellett, amikor a vérlemezke-adhézió von Willebrand faktor-dependens, a vérlemezkék elsősorban az érfal adventitia rétegéhez tapadnak, míg a tunica mediahoz kevésbé. Az is bebizonyosodott, hogy az erek szerin-proteázokkal (trombin, plazmin) való kezelését követően a media rétegben is kialakult a vérlemezke-adhézió, nem csak az adventitiában (Komorowicz et al, Thromb Haemost 2002; 88: 827).

Kísérleteinkben a magas nyírási sebességet áramlási kamra segítségével alakítottuk ki, melyben citráttal antikoagulált teljes vért áramoltattunk keresztül a. iliaca-ból fagyasztva metszéssel készült érkeresztmetszetek felett. A kitapadt vérlemezkéket indirekt immunfluoreszcenciával detektáltuk. Az érfal egyes rétegeinek thrombocytával lefedett területaránya jellemzi az adott réteg trombogénitását.

Buffy coat-ból preparált, majd aktivált neutrophil granulocytákból felszabaduló mátrix metalloproteázok (MMP-8 és -9) és szerin-proteázok (katepszin G, elasztáz) a korábbi enzimatis kezelésekhez hasonlóan megnövelik a media réteg trombogénitását. A granulocyták aktivációját, amely magában foglalja az enzim szekréciónak, fMLP-vel (formilmetionin-leucin-phenilalanin, bakteriális kemotaxin) és trombinnal, az érsérülés helyén keletkező proteázzal váltottuk ki. Mindkét esetben növekedett a media réteg trombogénitása. Felmerült a kérdés, hogy a granulocyták által termelt enzimek közül csak a szerin-proteázok rendelkeznek-e trombogénitást fokozó hatással, vagy a mátrix metalloproteázok is. Ennek megfelelően MMP-8 és -9 enzimmel kezeltük a metszeteket, melyek a media réteg trombogénitását szintén növelték. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a neutrophil granulocyták által termelt enzimek úgy változtatják meg az a. iliaca szerkezetét, hogy a vérlemezkék von Willebrand-faktoron keresztül nemcsak a tunica adventitia réteg kollagén rostozatához, hanem a tunica mediahoz is képesek lesznek kikötődni. A. iliaca esetében a tunica adventitia főként hosszanti kollagénrost-kötegekből épül fel, míg a tunica media nagy részét elasztinból felépülő rugalmas szerkezet alkotja, mely proteoglikán tartalmú amorf állapotban ágyazódik be. Feltételezésünk szerint a neutrophil granulocyták aktivációja során felszabaduló proteázok a media réteg proteoglikánjait hasítják úgy, hogy ezzel kötőhelyeket létesítenek a von Willebrand-faktor és a vérlemezkék számára, ezáltal megnövelve a réteg trombogénitását.

A kezelt metszeteken bekövetkező szerkezeti változásokat atomerőmikroszkóp (AFM) és scanning elektronmikroszkóp (SEM) segítségével figyeljük meg. A felvételeken a kezeletlen metszeteken az adventitia köteges hálózatként, a media amorf állományként mutatkozott. Az enzimatis és a granulocytás kezeléseket követően a media egyes részein az amorf állományban repedések, amorfállomány-hiányok keletkeznek, ahol köteges szerkezeti elemek jelennek meg. Ezek a szerkezeti átalakulások magyarázatot szolgáltatnak a megfigyelt trombogénitásfokozásra.

Témavezető: Dr. Wohner Nikolett – Dr. Kolev Kraszimir