

### **Lágylézer és citosztatikumok kölcsönhatása egér mesenchymalis őssejteken**

**Bevezetés:** A lézersugárzás speciális hatásai széles körben kiaknázhatók a mindennapi élet során. Az orvosi lézerek dózisteljesítményük szerint két fő csoportba sorolhatók. A nagy energiájú, ún. sebészi lézerek különféle műtétek során nyernek alkalmazást. A kis energiájú, ún. „lágylézerek” alkalmazási területe és hatásmechanizmusa lényegesen eltér az előzőekétől, hatásuk az alkalmazott fény hullámhosszától, a leadott dózistól, az energia- ill. teljesítménysűrűségtől függően megnyilvánulhat *in vitro* és *in vivo* is a sejtproliferáció serkentésében, vagy gátlásában. Ennek létrejöttében bizonyítottan nem hőhatás játszik szerepet, azonban a pontos hatásmechanizmus és az alkalmazhatóság spektruma még nem tisztázott.

**Célkitűzés és módszerek:** Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a különböző dózisban leadott lézersugárzás képes-e ellensúlyozni, vagy fokozni egyes citosztatikumok által előidézett gátlást. Kísérleteink során piros fényű (660 nm hullámhosszú) lágylézer egér mesenchymalis őssejtkultúra proliferációjára gyakorolt hatását figyeltük meg. A tenyészeteket 96 lyukú lemezekben 2, ill. 10 J/cm<sup>2</sup> dózisú lézersugárral kezeltük, majd különböző koncentrációkban vincristint, carboplatint, cytarabint, paclitaxelt adtunk hozzájuk. A kontroll csoport sem citosztatikumot, sem lézert nem kapott. 48 órán át 37 °C-on történő inkubálás után a sejtszámok változására fotometriás módszerrel (ELISA számlálóval leolvasva) következtettünk. A statisztikai számításokhoz kétmintás t-próbát használtunk.

**Eredmények:** A 2 J/cm<sup>2</sup> dózisú lézer a sejtenyészetek növekedését átlagosan 41%-kal serkentette a kontroll csoporthoz képest, ugyanakkor a 10 J/cm<sup>2</sup> 42%-os gátlást eredményezett. A vincristin 0,5 µg/ml koncentrációban gátolt (43%-os csökkenés), melyet a lézer nem befolyásolt, viszont a 0,1 µg/ml koncentrációjú vincristin hatását semlegesítette. A carboplatin 50 µg/ml koncentráció mellett gátolt (38%), mely gátlást a 2 J/cm<sup>2</sup> dózisú lézer alkalmazása teljes mértékben közömbösítette. A cytarabin 50 és 10 µg/ml koncentrációban gátolt (48% és 37%), melyet az egyidejűleg alkalmazott 2 J/cm<sup>2</sup> lézer nem befolyásolt. A 10 J/cm<sup>2</sup> dózis azonban jelentősen növelte a gátlást a fenti koncentrációkban cytarabinnal együtt adva (73% és 75%). A 0,4 µg/ml koncentrációjú cytarabin önmagában hatástalanak bizonyult, de ezt kombinálva 10 J/cm<sup>2</sup> dózisú lézerrel az együttes hatás 69%-os gátlást idézett elő, mely jelentősebb volt az önmagában alkalmazott 10 J/cm<sup>2</sup> dózisú lézer hatásánál. A paclitaxel 10 µg/ml koncentrációban 37%-os gátlást eredményezett, melyet a 2 J/cm<sup>2</sup> lézer nem tudott közömbösíteni. 0,4 µg/ml koncentráció mellett gátlás már nem jött létre, azonban 10 J/cm<sup>2</sup> –rel sugarazva 69%-os gátlás jelentkezett, mely jelentősebbnek mutatkozott az önmagában alkalmazott ugyanekkora dózisú lézer hatásánál. Ezen eredmények szignifikánsnak bizonyultak, melyeket minden esetben p<0,05 értéknél tekintettünk elfogadhatónak.

**Következtetés:** Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a lágylézer kis dózisban serkentette, nagy dózisban pedig gátolta a sejt kultúra növekedését, valamint hogy a 0,1 µg/ml vincristin és 50 µg/ml carboplatin sejtenyészetre gyakorolt gátló hatását képes kivédeni. Ugyanakkor nagyobb dózisban alkalmazva a lágylézer kiválóan potenciózza egyes gátló koncentrációjú citosztatikumok hatását, sőt némely esetben a hatástalan koncentrációjú citosztatikumokkal együttesen alkalmazva is jelentős gátlás érhető el, mely kifejezettebb az önmagában alkalmazott gátló dózisú lézer hatásánál. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a lágylézerek citosztatikumok hatékonyságát befolyásoló képességét a gyakorlatban is felhasználjuk.

**Témavezető:** Dr. Horvát-Karajz Károly

## Dancsó Balázs, ÁOK. V. évfolyam

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

### A metabolikus és proteotoxikus stresszpályák kapcsolata a resveratrol-indukált élettartam növekedésben

Az élettartamot meghatározó egyik alapvető védekező mechanizmus a hősokk válasz. Ennek során a proteotoxikus stressz hatására denaturálódó fehérjék aktiválják a hősokk transzkripciós faktort (HSF-1). A HSF-1 aktivációját követően képződő hősokk fehérjék biztosítják a fehérjék konformációjának fenntartását és a sejt fehérje hálózatának működését. A hősokk válasz ígéretes terápiás célpont számos korfüggő betegségben.

A resveratrol egy, a vörösborban megtalálható polifenol fitoalexin, életmehosszabbító hatását gerinctelen és gerinces modellrendszerekben számos tanulmány igazolta. A resveratrol a kalóriacsökkentés egyik szenzoraként működő Sir2 (szirtuin) hiszton deacetiláz fehérjén keresztül fejti ki hatását. A resveratrol, a kalória csökkentés és a hősokk válasz indukciójának hatása rendkívül hasonló. Laboratóriumunk korábbi kísérletei igazolták, hogy a resveratrol hősokk választ és termotoleranciát indukál sejteken (1). *C. elegans* modellen kimutattam, hogy a HSF-1 és a SIR-2 egyaránt szükséges a resveratrol élettartam növelő hatásához (2). Kísérleteimben arra kerestem a választ, milyen kapcsolat van a metabolikus stressz-aktivált SIR-2.1 és a HSF-1 között.

Kísérleteimet az emberi öregedést számos tekintetben jól modellező *C. elegans* fonálférgen, *hsf-1* nullmutáns, *sir-2.1* nullmutáns, SIR-2.1 túltermelő és SIR-2.1 túltermelő-*hsf-1* nullmutáns törzsek, valamint *phsp-16.2::gfp* fluoreszcens riporter törzsek felhasználásával végeztem. A törzsekkel hősokk válasz aktivációs, hősokk ellenálló képesség (termotolerancia) és élettartam méréseket végeztem. Resveratrol kezelés az enyhe hősokkal szinergista módon növelte a hősokk riporter *hsp-16.2* promoter aktivációját, valamint a normál és a SIR-2.1 túltermelő törzs élettartamát és termotoleranciáját. A SIR-2.1 túltermelése önmagában növelte a termotoleranciát és az élettartamot, amelyet a *hsf-1* gén funkcióvesztéses mutációja gátolt. A *hsf-1* mutáció episztatikus fenotípusa alapján a resveratrol jelpályájában a SIR-2.1 aktiválja a HSF-1 transzkripciós faktort. A hősokk, a resveratrol és a SIR-2.1 túltermelés szinergista hatása bizonyítja, hogy a SIR-2.1 a fehérje denaturációtól eltérő úton aktiválja a HSF-1-et.

Eredményeim alapján a HSF-1 a resveratrol SIR-2.1-függő hatásának közvetítője, amely felveti a HSF-1 SIR-2.1-függő deacetilációjának lehetőségét, valamint a proteotoxikus stresszválasz szerepét az élettartamot leghatékonyabban megnyújtó környezeti beavatkozás, a kalória csökkentés hatásmechanizmusában.

Irodalom:

1. Putics Á, Végh EM, Csermely P and Söti Cs. (2008) Resveratrol induces the heat shock response and protects human cells from severe heat stress. *Antiox Redox Signaling*, 10: 65-75.
  2. Dancsó B. (2008) A resveratrol fitoalexin és a hősokkfaktor kölcsönhatásának vizsgálata *Caenorhabditis elegans*-ban. Semmelweis Egyetem TDK Konferencia
- Témavezetők: Dr. Tóth Márton, Dr. Söti Csaba

**Elek Zsuzsanna ELTE biológus IV.**

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

### **Génszám polimorfizmus vizsgálat PCR és kapilláris elektroforézis technikával**

**Kérdésfeltevés:** A humán genom egyedi variációinak egy új típusa a gén kópiaszám polimorfizmus (copy number polymorphism, CNV), a DNS szekvencia néhány kilobázistól megabázisig terjedő kiesése vagy amplifikációja. Az általánosan használt CNV vizsgálati eljárások, mint pl. az aCGH (array comparative genomic hybridization), illetve a real-time PCR, meglehetősen költséges technikák, és önmagukban egyik módszer sem teljesen megbízható. Ezért célul tűztük ki olyan új CNV mérési módszer kidolgozását, mely költség-hatékony és rugalmas, azaz a vizsgált kromoszomális terület helye könnyen változtatható. **Alkalmazott módszerek:** Az Nr1i2 (pregnán X receptor) gén, valamint egy kontroll gén (RNáz P) egy részletének felszorzósítása hagyományos PCR technikával történt. A PCR termékek mennyiségi meghatározása egy multikapilláris elektroforézis rendszerrel (Qiaxcel) történt. A CNV értékét az Nr1i2 és az RNáz P génekről készült PCR termék mennyiségének hányadosával határoztuk meg. A PCR termék mennyiségét az elektroferogramok görbe alatti területéből határoztuk meg.

**Eredmények:** Humán DNS minták Nr1i2 génszám meghatározását végeztük a fent leírt módszerekkel. Mivel a kapilláris elektroforézissel történő CNV mérés egy új módszer, az első méréseket olyan mintákkal végeztük, melyeknek Nr1i2 génszámát előzőleg egy független módszerrel meghatároztuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a kidolgozott rendszer alkalmas az átlagos 2 és az amplifikált 3-as Nr1i2 génszám megbízható elkülönítésére. Folyamatban van olyan primer párokkal történő PCR reakciók kidolgozása, mellyel az amplifikálódott régió területe pontosan behatárolható.

#### **Következtetések:**

A kidolgozott multikapilláris rendszer hagyományos PCR technikával kombinálva alkalmas, és költség-hatékony módszernek tűnik a CNV mérésre. A bipoláris depresszió kialakulásában esetlegesen szerepet játszó Nr1i2 génamplifikáció vizsgálata a kidolgozott rendszerrel azonos eredményeket adott a széles körben használatos TaqMan real-time PCR módszerrel. Mindezek alapján a kidolgozott rendszer alkalmasnak tűnik humán DNS minták CNV vizsgálatára.

#### **Publikációk:**

A témavezető csoportjában hosszabb ideje foglalkoznak CNV vizsgálatokkal. Előzetesen a komplement C4 génszám variációk vizsgálatában kaptak jelentősebb eredményeket (1-3). A jelen munka ezt a vizsgálatot terjeszti ki egy új génre (Nr1i2), egy új megközelítési módot (multikapilláris elektroforézis) alkalmazva. A jelen munka eredményeinek publikálása folyamatban van (4).

1. Szilagyi A, Blasko B, Ronai Z, Fust G, Sasvari-Szekely M, Guttman A. Rapid quantification of human complement component C4A and C4B genes by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006 Apr;27(8):1437-43.
2. 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.
3. Blasko B, Szeplaki G, Varga L, Ronai Z, Prohaszka Z, Sasvari-Szekely M, Visy B, Farkas H, Fust G. Relationship between copy number of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angioedema (HAE). *Mol Immunol*. 2007 Apr;44(10):2667-74.

4. 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

**Ella Krisztina, ELTE-TTK, V. évfolyam**

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

### **Imatinib rezisztenciát okozó pontmutációk kimutatása PCR-RFLP módszerrel gasztrointesztinális strómális tumorokban**

A gasztrointesztinális strómális tumor (GIST) egy ritka mesenchymális daganat, mely szövettanilag legtöbbször fibroid, ritkábban epitheloid sejtekből áll. Immunhisztokémiai vizsgálattal a GIST-ek túlnyomó része CD117 (KIT) pozitív, ami fontos differenciál diagnosztikai marker e daganattípus azonosításában. A KIT - egy tirozin-kináz receptor fehérje (TKR) - felhalmozódásának hátterében a c-kit gén mutációja áll. A genetikai eltérés a receptorfehérje ligandfüggetlen aktiválódását, ennek következtében pedig a sejtek fokozott proliferációját eredményezi. A GIST-ek egy kisebb részében a daganat kialakulásának hátterében egy másik TKR, a trombocita eredetű növekedési faktor receptor alfa (PDGFR-A) mutációi állnak. A GIST betegek kezelésére egy szelektív tirozin-kináz gátlót, a Glivec-et (Imatinib mesylate) alkalmazzák, amellyel a GIST betegek mintegy 80%-ánál részleges válasz, vagy a daganat növekedésének gátlása érhető el áttéteket adó GIST esetén is. A különböző mutációkkal rendelkező receptorok Imatinib érzékenysége más és más, több rezisztenciamutációt is ismerünk. Nemzetközi ajánlás szerint a hatékony terápia tervezéséhez a magas rizikócsoportha sorolt GIST-ek esetén a diagnózis felállításakor meg kell határozni az érintett gének mutáció státuszát. A c-kit esetében leggyakrabban a 9-es, 11-es, 13-as és 17-es exonban, a PDGFR-A esetében pedig a 12-es és 18-as exonban találunk mutációkat, melyeket DNS szekvenálással lehet kimutatni. A szekvenálás érzékenysége azonban limitált, a vad típusú allél dominanciája miatt esetenként egy meglévő mutációt nem tudunk kimutatni. A Glivec-rezisztenciát okozó mutációk – melyek elsősorban pontmutációk – kimutatása esetében szükség lehet érzékenyebb vizsgálatokra is. A PDGFR-A 18-as exonjának D842V jelű pontmutációja Imatinib- és más TKR-gátló kezelésre is rezisztenciát okoz. Irodalmi adatok alapján ez a mutáció a KIT negatív GIST-ek 20 %-ában van jelen. Ismeretes, hogy a PCR-RFLP vizsgálatok érzékenysége nagyságrendekkel nagyobb a szekvenálásénál, ezért a D842V pontmutáció detektálására RFLP módszert dolgoztunk ki. A módszer érzékenységének pontos megállapítására mutáns és vad allélt előre beállított arányban tartalmazó DNS mintákat teszteltünk, majd a hasítási termékeket nagy felbontású mikrokapillaris elektroforézis segítségével futtattuk. Az érzékenység összehasonlítása céljából ugyanezeket a mintákat direkt szekvenálással is analizáltuk. A módszer validálásához 32 olyan GIST beteg tumor mintáját vizsgáljuk RFLP módszerrel, akiknél az előzetesen elvégzett szekvenálás alapján ismert a PDGFR-A 18-as exon genotípus.

Eddigi vizsgálatok alapján ez az új – idáig még az irodalomban nem közölt – módszer jóval érzékenyebb, emellett gyorsabb és olcsóbb, mint a szekvenálás, így fontos szerepe lehet a GIST daganatok molekuláris diagnosztikájában.

**Témavezetők:** Dr. Füle Tibor, Dr. Kovalszky Ilona

**Hornyák Krisztina, ÁOK V.**  
SE ÁOK Élettani Intézet, Budapest

### **Fc-receptorok azonosítása a különböző izotípusú immunkomplexek hatására kialakuló neutrofil aktivációban**

A neutrofil granulociták felülethez kötött immunkomplexek (IC) hatására létrejövő aktivációja alapvető jelentőségű az autoimmun betegségek (pl.: glomerulonephritis vagy autoimmun arthritis) patogenezisében. Az említett kórfolyamatokat általában génhányos egértörzseken tanulmányozzák *in vivo* modellrendszerekben. Korábban kimutattuk, hogy az egér neutrofilek IC-vel kiváltott aktivációja vagy az Fc $\gamma$ -receptor III-on (Fc $\gamma$ RIII) vagy az Fc $\gamma$ -receptor IV-en (Fc $\gamma$ RIV) keresztül jön létre. Igazoltuk, hogy az Fc $\gamma$ RIII és az Fc $\gamma$ RIV funkciója egymással átfedő, azaz a receptorok egymást helyettesíthetik az aktiváció során (1). Ezekben a kísérletekben kizárólag poliklonális antitestet használtunk az IC-ek kialakításához. Felvetődött, hogy az Fc $\gamma$ RIII-nak és az Fc $\gamma$ RIV-nek eltérő lehet az izotípus-specifitása. Legújabb kísérleteinkben ezért arra kerestük a választ, hogy különböző izotípusú IC-ek mely Fc $\gamma$ -receptorokon keresztül hozzák létre a neutrofilek aktivációját.

A különböző izotípusú IC felszínének létrehozásához monoklonális antitesteket adtunk a megfelelő antigénekhez (HSA+anti-HSA IgG2a, TNP-BSA+anti-TNP IgG2b, HSA+anti-HSA IgG1). Létrehoztunk továbbá egy olyan IC felszínt, melyben antigénként glükóz-foszfát-izomeráz (GPI), antitestként pedig a K/BxN szérum transzfer arthritis modell során létrehozott arthritises egér anti-GPI-t tartalmazó széruma szerepelt. Az irodalomból ismert, hogy e szérum döntően IgG1 izotípusú antitesteket tartalmaz. Munkánkhoz vad típusú és Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> egerek csontvelőjéből neutrofileket preparáltunk, majd a sejteket Fc $\gamma$ RIV-et blokkoló antitesttel vagy izotípus kontroll antitesttel szuszpenzióban előinkubáltuk. Ezt követően a neutrofileket a különböző izotípusú immobilizált IC felszínen stimuláltuk *in vitro*. Az IC-vel kiváltott neutrofil aktiváció során létrejövő funkcionális válaszok közül a szuperoxid-termelést citokrom c redukciós teszttel határoztuk meg.

Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> neutrofileket IgG2a IC felszínre helyezve a sejtek szuperoxid-termelése a vad típusú neutrofilekhez képest jelentősen csökkent, míg anti-Fc $\gamma$ RIV antitesttel kezelt vad típusú neutrofilek csak kisebb mértékű csökkenést mutattak a válaszban. IgG2b IC felszínt használva az Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> sejtek aktivációja nem csökkent olyan mértékben, mint az Fc $\gamma$ RIV ellenes antitesttel kezelt vad típusú sejteké. IgG1 izotípusú antitestekkel létrehozott IC felszínen az Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> neutrofilek szuperoxid-termelése közel teljes mértékben megszűnt szemben az anti-Fc $\gamma$ RIV antitesttel kezelt vad típusú sejtekkel, melyek ezen IC felszínen hasonló mértékű sejtaktivációt mutattak, mint a nem kezelt vad típusú sejtek. GPI IC-et használva hasonló eredményt kaptunk, mint az IgG1 IC jelenlétében. Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> neutrofilekhez adott anti-Fc $\gamma$ RIV antitest a sejtaktivációt teljes mértékben megszüntette valamennyi monoklonális IC felületünkön.

Eredményeink azt mutatják, hogy az IgG1 IC Fc $\gamma$ RIII-on keresztül aktiválja a neutrofil granulocitákat. Az IgG2a és az IgG2b IC – ugyan eltérő hatékonysággal – mind az Fc $\gamma$ RIII-on, mind az Fc $\gamma$ RIV-en keresztül képes kiváltani sejtaktivációt.

Témavezető: Dr. Jakus Zoltán, Dr. Mócsai Attila

1. Jakus Z. et al.: Critical but Overlapping Role of Fc $\gamma$ RIII and Fc $\gamma$ RIV in Activation of Murine Neutrophils by Immobilized Immune Complexes. *J Immunol.* 2008 Jan 1;180(1):618-29.

## Kis Viktor Biológus V. évfolyam

ELTE-TTK Biológiai Intézet, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

### A nevesincs CG6783 gén szerepe az autofágiában és az endocitózisban

Az autofágia az eukarióta sejtek ősi, erősen konzervált intracelluláris lebontó folyamata. Esszenciális szerepe van az előregedett sejtorganellumok, a szükségtelen vagy káros fehérjék eltávolításában és reciklizációjában, valamint a sejtet ért stresszhatások (pl.: éhezés, oxidatív stressz) és a szervezetbe jutott patogének (vírusok, baktériumok, paraziták) elleni védekezésben. Azzal, hogy a sejt autofágiával lebontja a káros ágenseket, melyek apoptózist indukálnának és a sejt halálát eredményeznék, citoprotektív funkcióval (is) bír, ezzel a sejt túlélését szolgálja. Fejlődő, differenciálódó szervezetben a szükségtelenné vált sejtek tömeges eliminálása is autofágiával megy végbe, ezért a ezt a folyamatot a programozott sejthalál kettes típusának is tekintik. Szerepét számos malignus daganatban, myopáthiában és neurodegenerációs betegségben kimutatták, valamint azt is, hogy az öregedéssel párhuzamosan az autofág kapacitás csökken. Az autofágia kétarcú folyamat, jelenthet túlélést de halált is a sejt számára, ezért mechanizmusának megértése kulcsfontosságú terápiás lehetőségeket rejt magában.

Az autofágia molekuláris mechanizmusa jól tanulmányozható funkcióvesztéses mutációt hordozó *Drosophila* törzsek vizsgálatával. Munkánk során P és EP-elemmel (módosított transzpozonnal) mutagenizált, késői lárvaletalitást mutató törzseket vizsgáltunk, melyekből gyors fénymikroszkópos teszttel kiválogattuk azokat a vonalakat, melyekben a lárvális zsírtestből hiányoztak a fiziológiásan megjelenő, autofágiára és endocitózisra jellemző struktúrák. Az itt azonosított 18 találat közül tanszékünk munkatársai kettőről jelentettek meg publikációt.

(Lippai M, Csikós G, Maróy P, Lukácsovich T, Juhász G, Sass M. *SNF4Agamma, the Drosophila AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy*. *Autophagy*. 2008 May 16;4(4):476-86.

Csikós G, Lippai M, Tamás , Lukácsovich T, Juhász G, Henn L, Erdélyi M, Maróy P and Sass M *A novel role for the Drosophila epsin (lqf): involvement in autophagy* *Autophagy*, 2008, submitted )

Vizsgálataimat az EP(3)3252 törzsön (szintén a 18 találat egyike) végeztem, amiben az EP-elem inzerció a CG6783 gént érintette, amely egy eddig nem jellemzett zsírsavkötő fehérjé kódol. A mutáns törzs fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata egyértelműen igazolta a gén szerepét az autofágiában és az endocitózisban. A gént érintő független EP-s vonalak vizsgálatával és deléciós keresztezéssel ellenőriztük, hogy kizárólag az EP-elem inzerció áll a mutáns fenotípus hátterében. RT-PCR-el és Western-blottokkal igazoltuk, hogy a mutáns törzsben a génről nem képződik mRNS és fehérje.

A CG6783 egy adott exonjára RNAi konstrukciót hordozó transzgén vonalakban a gént a posztembrionális fejlődés végén csendesítve elő tudtuk idézni a mutáns fenotípust. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a géncsendesített állatok képtelenek a lárvális szérum fehérjék endocitotikus felvételére és protein granulomok képzésére, amely igazolja a gén szerepét endocitózisban és az endoszómális kompartmentumok szervezésében.

A gén egy transzkriptumára készített GFP-riporter konstrukcióval a géntermék lokalizációját vizsgáltuk, normál fluoreszcens és lézerkonfokális mikroszkópiával. A fehérje diszkrét granuláris jelölést adott, mely erősen kolokalizált az autofág eredetű struktúrákkal. A fenti vizsgálatok egybehangzóan alátámasztják, hogy a CG6783 gén szerepet játszik az autofágiában és az endocitózisban.

Témavezető: Dr. Csikós György

**Major Gyula ELTE TTK Biológus V**

Semmelweis Egyetem, CellScreen AOKK, Immungenomika Laboratórium, Budapest

### **Az 1-es típusú diabetes mellitus genetikai hátterének vizsgálata; az IL2RA génrégió (10p15.1) genetikai heterogenitása**

Az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásában genetikai és környezeti tényezők játszanak szerepet. Az 1-es típusú diabetesre való szuszeptibilitást több genetikai lókuszt határozza meg. Eddigi vizsgálatok során több mint huszonöt génrégióval hozták összefüggésbe, ebből négy bizonyított lókuszt ismert: a HLA génrégió [1], az inzulin gén, a CTLA4 génrégió [2] és a PTPN22 gén [3]. Az elmúlt években a teljes genomon végzett asszociációs vizsgálatok alapján további génrégiókat azonosítottak, ezek egyike az általunk is vizsgált IL2RA génrégió.

Heterogén etnikai összetételű populáción végzett vizsgálatok során az IL2RA génrégióban több polimorfizmus mutatott asszociációt az 1-es típusú diabétesssel, melyek közül az IL2RA gén 5' nem kódoló régiójában található rs11594656 (T>A) polimorfizmus mutatta a legerősebb asszociációt. Munkánk során mi egy homogén magyar populáción terveztük bizonyítani az IL2RA gén rs11594656 (T>A) polimorfizmusa és a T1D közötti genetikai asszociációt.

Eset-kontroll vizsgálatok keretében 461 db kontroll és 582 db diabéteszes minta genotípusát határoztuk meg Taqman genotipizáló assay felhasználásával, a gyártó javaslatai szerint. A genotipizáláshoz használt genomialis DNS-t EDTA-s vérmintából izoláltuk kisózásos módszerrel. Az eredmények statisztikai analízisét khi négyzet próbával végeztük.

Az elvégzett statisztikai analízis szignifikáns különbséget mutatott a genotípus eloszlásban. A kontroll csoporthoz képest a diabéteszes csoportban az AA homozigóták aránya csökkent, a TT homozigóták aránya pedig növekedett (Khi-négyzet: 17,6 ; P=1,5E-04).

A diabéteszre hajlamosító T allél frekvenciája szignifikánsan magasabb volt a diabéteszesek csoportjában a kontrollokhoz képest: a T allél frekvenciája a kontroll mintákban mért 64,8%-ról a diabétesz mintákban 72,9%-ra nőtt, míg az A allél frekvenciája 35,2%-ról 27,1%-ra csökkent (Khi-négyzet: 16,2; P=5,65E-05), a számolt esélyhányados OR=1,47; melynek konfidenciaintervalluma c.i. 95% 1,22-1,77.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy magyar populációban az IL2RA gén rs11594656 polimorfizmusa asszociált 1-es típusú diabétesssel. A kontroll és T1D minták mind genotípus eloszlásban, mind allélfrekvencia szempontjából szignifikáns különbséget mutattak.

- [1] Hermann, R., et al., *HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland*. Hum Immunol, 2001. **62**(4): 391-398.
- [2] Turpeinen, H., Hermann, R., et al., *A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes*. Eur J Immunogenet, 2003. **30**(4): 289-293.
- [3] Hermann, R., et al., *Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes*. Diabetologia, 2006. **49**(6): 1198-1208.

Témavezető:

Dr. Hermann Róbert tudományos főmunkatárs

Dr. Szatmári Ildikó tudományos munkatárs

**Mészáros Gergő ÁOK IV., Toldi Gergely ÁOK IV.**  
I. Sz. Gyermekklinika

### **Sejtélettani paraméterek valós idejű vizsgálata áramlási citométerrel**

Bevezetés: Az áramlási citométer (FACS) több millió sejt szekvenciális detektálására alkalmas. Fluoreszcens festékek segítségével lehetőség nyílik sejtélettani paraméterek meghatározására az egyes sejtekben.

Célkitűzés: Kinetikus FACS módszerek kidolgozása, amivel több percen keresztül monitorozható a citoplazmatikus kalciumszint, a sejt- és mitokondrium-membrán potenciál, mitokondrium kalciumszint, szabadgyök és nitrogén-monoxid képződés változása, illetve egyes, ezekre a folyamatokra ható szerek hatásának a jellemzése. Jelen kísérleteink célja a módszer kifejlesztése és gyakorlati alkalmazása volt.

Módszer: Humán T sejt limfóma (Jurkat) sejteket a mérendő paraméterre specifikus fluoreszcens festékekkel töltöttük. A paraméterek időbeli változását alapállapotban, specifikus gátlószer (rotenon), vagy aktivátor (fitohemagglutinin, PHA) jelenlétében 10 percen keresztül követtük nyomon. A mérések kiértékelését a laboratóriumunk által kifejlesztett algoritmus segítségével végeztük. A dózis-hatás összefüggést Hettmannsperger-Norton teszttel elemeztük.

Eredmények: Mérési rendszerünkkel rotenon-kezelés esetén dózis-hatás összefüggést mutattunk ki a szabadgyök-képződés (maximum érték:  $p < 0,0001$ , AUC:  $p < 0,0001$ , meredekség az 50 %-os értéknél:  $p < 0,0001$ ) és a mitokondrium kalciumszint esetében (maximum érték  $p < 0,05$ , meredekség az 50%-os értéknél:  $p < 0,10$ ). A PHA átmeneti kalcium-szintnövekedést vált ki, illetve a sejtmembrán és a mitokondrium depolarizációját okozza, valamint növeli a szabadgyök képződést (maximum érték  $p < 0,0001$ ).

Következtetés: Rendszerünk lehetőséget nyújt a különböző sejtélettani folyamatok valós idejű nyomonkövetésére, az ezeket befolyásoló anyagok vizsgálatára FACS-szal.

Témavezető: Dr. Vásárhelyi Barna

A témában megjelent közleményeink:

Mészáros G, Rónai K, Toldi G, Kaposi AS, Vásárhelyi B, Treszl A; Sejtélettani folyamatok jellemzése „real-time” áramlási citometriás módszerrel. Magyar Immunológia 2008.7(1-2)22-29  
Kaposi AS, Veress G, Vásárhelyi B, Macardle P, Bailey S, Tulassay T, Treszl A; Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. Cytometry A. 2008;73(3):246-53



Sági Bernadett, ELTE TTK V.

Országos Vérellátó Szolgálat, Össejt-biológia

### Mesoangioblastok, mesenchymalis össejtek vagy perivasculáris simaizom sejtek

A mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejtek (MSCs - mesenchymal stem/stromal cells) minden szövetünkben megtalálható, viszonylag könnyen izolálható és *in vitro* kultúrában jól tenyésztendő multipotens sejtek. Eredetük és a minden össejt számára nélkülözhetetlen speciális mikrokörnyezetük (niche-ük) pontos anatómiai lokalizációja azonban tisztázatlan. Felvetődött, hogy az MSC-k valójában az erek perivasculáris rétegében elhelyezkedő pericytákkal és/vagy simaizom sejtekkel azonosak. A perivasculáris sejtek ugyanis - az MSC-khez hasonlóan - képesek létrehozni a legtöbb mesodermális eredetű sejtípust, pl. osteoblastot, adipocytát, és simaizom sejtet *in vitro* kultúrában. Néhányan azt feltételezik, hogy a véredényekhez asszociált össejtek a többi szövetben (csontvelő, zsír) található MSC-knél fiatalabb, nagyobb osztódási és differenciálódási képességgel rendelkező sejtek, ún. mesoangioblastok, amelyek akár még vérképző sejtekké is képesek differenciálódni. Jelen munkánkban azt szeretnénk tisztázni, hogy fiatal (14 napos C57Bl/6) egerek különböző szerveiből (aorta, csontvelő, thymus, lép) származó adherens sejtek (i) valóban rendelkeznek-e a pericytákra, illetve perivasculáris simaizom sejtekre jellemző markerekkel; (ii) az aorta falból izolált MSC-k valóban a többi stroma sejténél fiatalabb, esetleg még vérképző sejt irányba is differenciálódni képes sejtek, más néven mesoangioblastok-e; és (iii) az aorta fali MSC-k rendelkeznek-e olyan sajátosságokkal, ami „származási” helyükre (érfal) utal, illetve különösen alkalmassá teheti őket érbetegségek gyógyítására? Megállapítottuk, hogy a csontvelőből, a thymusból és a lépből izolált, Sca-1, CD44, és részben CD73, valamint CD90 pozitív (áramlási citometria) adherens stroma sejtek egy része – a hasonló felszíni markereket hordozó aorta fali MSC-khez hasonlóan - hordoz immunfluoreszcens technikával kimutatható pericyta/ perivasculáris simaizomsejt markereket (□-simaizom aktint és NG2-t). Így valóban elképzelhető, de nem igazolható egyértelműen, hogy ezek a különböző szövetekből/szervekből izolált stroma sejtek egyetlen sejtfejlődési sorba tartoznak. Ugyanakkor a többi (csontvelői, thymus és lép) MSC-khez viszonyítva jóval gyorsabban növekedő aorta fali MSC-k sem képesek vérképző sejt irányába differenciálódni. Lágy gélben nem képeznek hematopoieticus eredetű kolóniákat, Dexter-kultúrában frissen izolált csontvelői sejtekkel 14 napig együtt tenyésztve őket nem differenciálódnak CD45R (B-sejt), CD11b (monocyta/macrophag), vagy Gr-1 (granulocyta) pozitív sejtekké. (Ezt az aorta eredetű MSC-k zöld fluoreszcens fehérjét hordozó lentivírussal történt transzdukcióját követően, áramlási citometria segítségével tudtuk igazolni). D3 vitamin tartalmú tápfolyadékban nem képeznek tartarát-rezisztens savas-foszfátáz enzimet expresszáló osteoclastokat. Csontvelőhalált okozó egésztest besugárzásnak (9Gy) kitett egerek vérképző rendszerét  $10^6$  intravénásan adott aorta eredetű sejt sem képes helyreállítani. A H5V endothelioma sejtek növekedését viszont csontvelői és lép eredetű társaiknál hatékonyabban lassítják, sőt kollagén I gélben létrehozott háromdimenziós kultúrában elindítják az – önmagukban endothel kapillárisok kialakítására nem képes – H5V sejtek rendeződését. Kétségtelen tehát, hogy (i) a különböző MSC-k - legalábbis részben - alkalmazkodtak ahhoz a speciális szöveti környezethez, amelyből izoláltuk őket; (ii) így - legalábbis részben - jogos lehet az aortából származó MSC-eket megkülönböztető névvel mesoangioblastoknak nevezni, annak ellenére, hogy vérképző sejt irányába nem képesek differenciálódni. Mindezek alapján feltételezzük, és később *in vivo* kísérletekben is szeretnénk igazolni, hogy az aorta eredetű MSC-k különösen alkalmasak lehetnek különböző érbetegségek kezelésére, amelyeknek terápiája csontvelő és zsírszövet eredetű MSC-k felhasználásával már – legalábbis a klinikai kipróbálás szintjén - megkezdődött.

Témavezető: Dr. habil. Uher Ferenc

### **A syndecan-1 hatása HT 1080 fibrosarcoma sejtvonalon**

A négytagú syndecan szupercsalád tagjai sejtfelszíni transzmembrán heparánszulfát-proteoglikánok, melyek váz-fehérjéből és az ektodoménjükhöz kovalensen kapcsolódó glikozaminoglikán láncokból épülnek fel.

Sokrétű szerepük van pl.: sejtadhézióban, migrációban, sejtproliferációban, jelátvitelben és differenciációban.

A mulekulák heparánszulfát oldalláncok segítségével növekedési faktorokat kötnék meg. Az ektodomén a sheddingnek nevezett folyamat során levágódhat. A transzmembrán doménjükön keresztül dimerizációra-oligomerizációra képesek, aminek szerepe lehet működésükben. A homodimerek és oligomerek mellett heterodimerek-oligomerek is kialakulhatnak, eltérő affinitással. A syndecan-1 főként hám-, a syndecan-2 pedig mesenchymalis eredetű sejteken található meg. Tumorokban a syndecanok változása nem egységes, bizonyos esetekben a SDC expressziójának megnövekedése a differenciált fenotípus markere, más esetekben viszont malignitásra utal. A HT1080 fibrosarcoma sejtvonalban a syndecan-2 malignitást fokozó hatását írták le.

Ahhoz, hogy a syndecan-1 szerepét a malignus fenotípus kialakításában jobban megértsük a HT1080 fibrosarcoma sejtvonalat transzfektáltuk a molekula különböző csonkolt változatait kódoló expressziós vektorokkal. A stabil sejtvonalak kialakítását követően részben in vitro fenotípus-vizsgálatokat végeztünk (növekedési görbe, Boyden kemotaxis-vizsgálat) részben egérbe oltottuk a sejtvonalainkat. Az állatkísérletekben mértük a tumorok növekedési sebességét és áttétképző képességüket.

Eredményeink azt tanúsították, hogy nem csak a teljes syndecan molekulát tartalmazó konstrukció, hanem az extracelluláris doménben csonkolt is fokozza a tumorsejtek növekedését és áttétképzését. További deléciós mutánsok kialakítása alapján a molekula transzmembrán doménje központi szerepet játszik a sejtek migrációjának fokozódásában.

Fenti megfigyelések molekuláris hátterének tanulmányozására real-time PCR-el, expressziós makroarray-vel immunhisztokémiával és Western-blot-al a daganatprogresszióban ismert szerepet játszó molekulák változásait vizsgáltuk. A sejtciklusban szerepet játszó fehérjék közül a p53, p21 és cdc25A mennyisége nőtt, a sejtfelszíni receptorok közül az integrin alfa4 és béta1 mennyisége csökkent. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a leírt változások milyen módon idézik elő a HT1080 tumorvonal agresszivitásának fokozódását.

Témavezető: Dr. Kovalszky Iлона

**Zsigmond Borbála SE ÁOK IV., Pénzváltó Zsófia ELTE TTK IV.**  
I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

## **Transzfekeció optimalizálása zöld fluoreszcens fehérje felhasználásával MCF7 mellrák sejtvonalon**

### **Háttér**

A transzfekeció során célunk nukleinsavak sejtbe való bejuttatása nem virális úton. Ez szükséges például, ha egy gén expresszióját serkenteni vagy gátolni szeretnénk. Zöld fluoreszcens fehérje (GFP termelését teszi lehetővé. GFP használatával a transzfekeció eredményességét lehet vizualizálni anélkül, hogy kockáztatnánk a sejtek pusztulását.

### **Célkitűzések**

Célunk volt MCF7 sejtekben a legnagyobb hatékonyságú transzfekeciós reagens megtalálása zöld fluoreszcens fehérjét kódoló plazmid bejuttatásával.

### **Módszerek**

Az **MCF7** sejteket antibiotikummal kiegészített L15 médiumban, 5% CO<sub>2</sub>-ban 37C fokon tároltuk és hetente passzáltuk. A transzfekeció kezdetekor a sejteket 24-well platekbe helyeztük (200.000 sejtet platenként). 24 órás inkubáció után a médiumot szérum és antibiotikum mentes médiumra cseréltük, majd zöld fluoreszcens protein bevitelét végeztük el a transzfekeciós reagensekkel. Az általunk használt reagensek: **Lipofectamin 2000, Oligofectamin, Transmessenger, Fugene 6 és a siPORT**. A transzfekeciós reagenstől függően a fehérje 24 vagy 48 óra múlva látható fluoreszcens mikroszkóp alatt UV fényel megvilágítva. A kiértékelést **Olympus IX81** motorizált mikroszkóppal végeztük. **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) festéssel vizualizáltuk az élő sejtmagokat, a transzfekektált és nem transzfekektált sejtek arányát százalékban adtuk meg, melyet wellenként 3 különböző látótérből számoltunk. Minden látóteret számítógéppel fotóztuk le dokumentáció céljából.

### **Eredmények**

A transzfekeció sikeressége százalékban: Fugene 6 28%, SiPORT Neo FX 37%, Lipofectamin 2000 32%, Transmessenger 30%, Oligofectamin 48,7%. Második transzfekecióval a hatékonyság kétszeresére volt növelhető (Fugene: 50%).

### **Kiértékelés**

Eredményeink alapján az Oligofectamin transzfekeciós reagens érte el a legnagyobb hatékonyságot. A transzfekeció sikeressége fordítottan arányos a gyártó által ajánlott konfluencia mértékével 50%-os konfluencia felett. A transzfekeció ismétlésével a hatékonyság növelhető.

Témavezető: Dr. Györffy Balázs

A témavezető korábbi vizsgálatai során RNS interferencia beállításához szükséges transzfekeció-optimalizálással nem foglalkozott. Jelen munkában a TDK hallgató egy olyan önálló munkán dolgozott, amely a témavezető aktuális kutatásait támogatja.

A témavezető témához kapcsolódó elmúlt 5 évben megjelent közleményeinek listája:

1. Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, Jonquieres G, Royer HD, Lage H, Györffy B, Kassack MU. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. **Int J Cancer**. 2008 Nov 1;123(9):2013-9.
2. Abdul-Ghani R, Serra V, Györffy B, Jurchott K, Solf A, Dietel M, Schafer R. The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1. **Oncogene**. 2006 Mar 16;25(12):1743-52.