

Intracelluláris kis G-fehérje aktiválódás vizsgálata angiotenzin hatásmechanizmusában

Az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT_1R) egy hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérjéhez kapcsolt receptor, amely rendkívül széles spektrumú jelátviteli folyamatokat aktivál angiotenzin II kötődését követően. Az AT_1R a heterotrimer G-fehérjéken kívül kis G-fehérjék (pl. Ras, Rho, Rac) aktiválásán keresztül is szabályoz egyes sejtfunciókat, mint pl. a génexpressziót, aktin citoskeletont, vezikuláris transzportot és a mikrotubulus szerveződést. Ezen folyamatok pontosabb megértése alapvető a kardiovaszkuláris remodelling, endothel diszfunkció és egyéb patológiás történések vizsgálatában. Munkahipotézisünk szerint feltételezhető, hogy az AT_1R az agonista stimulus hatására nemcsak a plazmamembránból, hanem az internalizálódott receptor intracelluláris kompartmentekből is képes jelátviteli folyamatokat aktiválni kis G-fehérjéken keresztül. A plazmamembrán mikrodoménjei mellett különböző intracelluláris kompartmenteken (pl. endoszómákon, a transz-Golgin, az endoszómás retikulumon és a mitokondriumok külső membránján) vizsgáltuk a kis G-fehérje aktiválódást agonista stimulus hatására.

A kis G-fehérje aktiválódás kimutatására és jellemzésére olyan intramolekuláris szondákat készítettünk, melyek egy polipeptidláncon belül tartalmazzák az összes szükséges komponens, melyek működését az előző évben mutattuk be. Kísérleteinkhez ezen szondáknak (RasBRET, RhoBRET) a különböző intracelluláris kompartmentekhez irányított verzióit, valamint a különböző szondák intermolekuláris variánsait készítettük el. Ezen szondák felhasználásával vizsgáltunk kis G-fehérje aktiválódást biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) módszeren alapuló vizsgálatokkal, melyek kivitelezéséhez speciálisan nagy érzékenységű Berthold Mithras multilabel readert használtunk. Konfokális mikroszkóppal ellenőriztük, hogy a különböző intracelluláris, illetve plazmamembrán kompartmentekbe irányított szondák lokalizációja megfelelt az előzetesen vártaknak. A plazmidokat HEK293 epitél sejtekben expresszáltuk és működésüket epidermális növekedési faktor vagy angiotenzin II stimulus hatására vizsgáltuk. A kísérleti felállásunkban a BRET-jel növekedése kis G-fehérje aktiválódást jelez. A sejteket 24 órával a vizsgálatok előtt a szondákat tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk 96-lyukú edényekben és élő, adherens sejteken végeztük a BRET mérést 6 óras szérum-megvonást követően.

Ezen szondák segítségével sikerült nemcsak a plazmamembránon, de a sejten belül is szignifikáns kis G-fehérje aktiválódást kimutatnunk a transz-Golgi, endoplazmatikus retikulum, illetve mitokondriumok külső membránján. Különböző $AT_{1A}R$ -ok koexpressziójával (vad típusú; mutáns, mely nem képes internalizálódni; illetve mutáns, mely képtelen heterotrimer G-fehérjét aktiválni) ellenőriztük, hogy a kapott intracelluláris aktiválódás a plazmamembrán eredetű, vagy az internalizálódott receptorok működése hatására jön-e létre. Adataink arra utalnak, hogy a Golgin és endoplazmatikus retikulumon kapott aktiválódás a plazmamembránnal áll kapcsolatban, míg a mitokondriumok esetében az internalizált receptorok okozzák a kis G-fehérje aktiválódást. A BRET méréssel kapott eredményeinket egyedi sejtek képalkotó eljárással történő vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer (FRET) mérésekkel is megerősítettük.

Eredményeink szerint ezen bioszenzorok alkalmasak növekedési faktorok, hormonok szignalizációjának vizsgálatára, valamint a szondák irányításával különböző intracelluláris kompartmentekben vizsgálhatjuk kis G-fehérje jelpályák működését.

Témavezetők: Dr. Balla András, Dr. Hunyady László

TOP2B expresszió, mint biomarker a topoizomeráz inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulásában

Bevezető

A topoizomerázok a cukor-foszfát lánc hasításával a DNS szálban lévő feszültségeket megszüntetik, ezáltal a szorosan feltekeredett DNS kettős spirált a DNS replikációhoz és transzkripcióhoz meglazítják. A topoizomeráz 2 mindkét szálát képes egyidejűleg hasítani, s ezzel negatív szupertekercseket létrehozni. A topoizomerázok kedvelt célpontjai a daganatellenes kemoterápiáknak, gátlásuk által proliferációgátlás érhető el daganatsejtekben. Topoizomeráz-gátlókra rezisztens sejtvonalakon a TOP2B gén expressziója csökken. A gén lehetséges szerepe a kemorezisztencia létrejöttében azonban még tisztázatlan.

Kérdésfelvetés

Kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy a TOP2B gén expressziójának csökkentése létrehozhat-e rezisztenciát egy topoizomeráz-gátló szerrel szemben.

Módszerek

Vizsgálatainkhoz humán **MCF-7** mellrák sejtvonalat használtunk. A sejteket hetente passageoltuk, 37C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük **10% FCS**-el kiegészített **L-15**-ös tápoldatban. A sejtekből RNS-t **Rneasy Mini kit** (Qiagen) segítségével izoláltunk, **Superscript II Reverse Transcriptase** (Invitrogen) segítségével cDNSt szintetizáltunk belőle, melyet PCR-rel detektáltunk **Taq DNA Polimerase** (Invitrogen) felhasználásával. A PCR-rel a TOP2B génen a kötőhelyek a forward primer esetében a 3151., a reverse primer esetében a 3329. nukleotidnál találhatóak. Az siRNS tervezéséhez a **Dharmacon** és **Ambion** szoftvereit használtuk. Az RNAi oligot **SiPORT-NeoFX** (Ambion) transzfekciós reagens segítségével juttatuk a sejtekbe, a tápoldatot 20 óra múlva L-15 médiumra cseréltük az aspecifikus toxikus hatás elkerülése céljából. A sejteket az első napon **doxorubicinnal** kezeltük. Az RNAi aspecifikus letális hatásainak vizsgálatára használt scramble kontroll patkányspecifikus gén kiütésére alkalmas siRNS-t tartalmazott. A sejteket **Casy automata sejtszámlálóval** számoltuk le a transzfekciót követő 4. napon. A háromszori ismétlés eredményei közötti különbség szignifikanciáját t-próbával határoztuk meg.

Eredmények

A tervezett RNAi primerek az 1912. helyre kötnek, hosszuk 22 nukleotid. A génkiütés sikerességét RT-PCR segítségével sikeresen detektáltuk. Eredményeink szerint a doxorubicinnal kezelt ill. nem kezelt sejtek száma közötti arány parentál sejtek esetében 14,69±3,7%, RNAi-vel géncsendesített sejtekben 78,75±11,45%, rezisztens sejtek esetében 82,58±12,02%. A parentál és a géncsendesített sejtek közötti különbség szignifikanciaszintje p<0,001, a géncsendesített sejtek és rezisztens sejtek pedig hasonlóak (különbségükre p=0,58). A scramble kontrollal kezelt sejtekben hasonló hatás nem volt megfigyelhető.

Diszkusszió

Eredményeink alapján a TOP2B expressziójának csökkenése tumoros sejtekben a topoizomeráz inhibitorokkal szembeni rezisztencia egyik oki tényezője lehet. Más topoizomerázok (pld. TOP2A) vizsgálata szükséges, hogy a TOP2B szerepének mértékét meg tudjuk határozni.

Témavezető: Dr. Györffy Balázs

Horváth Kornélia Hédi, ÁOK VI. évf.

Semmelweis Egyetem, CellScreen AOKK, Immungenomika Laboratórium, Budapest

Az 1-es típusú diabetes genetikai hátterének vizsgálata; a *CTLA4* gén genomikus szabályozása és az 1-es típusú diabetes mellitus

Az autoimmun mechanizmusú 1-es típusú diabetes mellitus (T1D) a pancreas β -sejtjeinek pusztulása miatt kialakult inzulinhiány következtében jön létre. A β -sejtek pusztulása genetikailag fogékony személyekben környezeti faktorok hatására beinduló T-sejt mediált immun-folyamat során valósul meg. A betegség fő genetikai hajlamosítója a HLA szuperlókusz [1, 2], minor hajlamosító gének közül az inzulin gén, a *PTPN22* gén, az *IFIH1* gén, az *IL2RA* gén és a *CTLA4* gén ismertek. A citotoxikus T-limfocita antigén 4 (*CTLA4*) a T-sejt aktiváció fontos regulátora [3]. Két izoformája ismert, a teljes hosszúságú és a szolubilis forma. A két izoforma expressziós szintjét a gén 3' régiójában található CT60 génpolimorfizmus különböző populációkban eltérően szabályozza. Korábbi eredményeink igazolták, hogy magyar populációban a *CTLA4*-CT60 polimorfizmus asszociált az 1-es típusú diabetes-szel.

Munkánk során a *CTLA4* gén genomikus regulációját vizsgáltuk magyar populációban, a CT60 génpolimorfizmus expresszióra, illetve alternatív splicingra kifejtett hatását egészséges és 1-es típusú diabeteses mintákon.

Vizsgálatainkhoz 59 egészséges és 38 T1D mintát használtunk. A genotípusok meghatározását Taqman® rs3087243 genotípezáló assay-vel végeztük EDTA-s vérből izolált genomiális DNS-en. A génexpressziós analízishez sűrűséggradiens centrifugálással Histopack-1077 segítségével perifériás vérből mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltunk. RNS izolálás és cDNS írás után a két izoformát SYBR Green módszerrel real-time PCR során kvantitáltuk.

Az AG és GG genotípusok esetén a szolubilis és a teljes hosszúságú izoforma expressziós szintje nem különbözött szignifikánsan betegek és egészségesek között. A protektív AA genotípusú mintákban a szolubilis illetve a teljes hosszúságú forma mRNS szintjeinek aránya szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint a hajlamosító GG genotípusú mintákban mért arány.

Előzetes asszociációs vizsgálatainkra alapozva kimutattuk, hogy magyar populációban a *CTLA4* gén CT60 polimorfizmusa befolyásolja a gén izoformáinak expressziós szintjét PBMC-ben. A mérések során megfigyelt expressziós különbségek rámutatnak, hogy a különböző izoformák fontos szerepet játszhatnak az immunregulációs folyamatokban 1-es típusú diabetesben.

1. Hermann, R., Mijovic C., Soltész Gy, *A HLA DR és DQ gének szerepe az 1-es típusú diabétesz iránti genetikai hajlam kialakításában, a magyar populációban.* Diabetologia Hungarica, 2003. 9: p. 165-175.
2. Hermann, R., et al., *HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland.* Hum Immunol, 2001. 62(4): p. 391-8.
3. 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): p. 289-93.

Témavezetők: Dr. Hermann Róbert
Dr. Szatmári Ildikó

Az antivirális kezelés hatása a hepatitis C vírus genetikai variabilitására

A krónikus hepatitis C vírusfertőzés globális közegészségügyi probléma, világszerte 170 millió fertőzött él, ami a lakosság 2-3%-a. Magyarország a közepesen fertőzött országok sorába tartozik, a fertőzöttek száma 70 ezerre becsülhető. Vakcina nem áll rendelkezésre, és a jelenleg legeredményesebb pegilált interferon-alfa és ribavirin kombinált kezelés is csak a betegek kb. felénél hoz gyógyulást.

A jelen tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy a vírusellenes kezelés milyen hatással van a vírus genom 2 különböző régiójára.

Aktív HCV betegektől két különböző időpontban vettünk mintákat, egyet az interferon kezelés előtt (1.) és egyet utána (2.). A savóból kivontuk a nukleinsavat, majd reverz transzkripció után nested PCR-t végeztünk a 2 különböző régió primereivel. A kapott termékeket szekvenáltuk és az 1. és 2. minta szekvenciáit hasonlítottuk össze.

Az 5'UTR nemkódoló, nagyon konzervatív régiónál nem találtunk változást a betegek kezelés előtti és utáni szekvenciái között.

Az NS5b régiónál, mely a vírus RNS polimerázát kódolja, találtunk nukleotid eltéréseket a betegek kezelés előtti és utáni szekvenciái között, melyek azonban aminosav eltérést nem okoztak. Az eddigi vizsgálataink alapján nem mutatható ki összefüggés a kezelés előtt ill. után vett vérből vizsgált vírusok NS5b régiójánál talált nukleotid különbségek száma és az eltelt idő között.

További vizsgálatok szükségesek a nukleotidváltozások pontos szerepének tisztázására.

Publikációk listája:

1. Pár A., Takács M., Brojnás J., Berencsi Gy., Paál M., Horányi M., Miseta A., Hegedűs G., Mózsik Gy., Hunyadi B. (2004). Co-infections with hepatitis G and TT virus in patients with chronic hepatitis C in Hungary. *Acta Microbiologica and Immunol. Hung* 51, 437-447.
2. Takács M., N. Szomor K., Dencs Á., Kis Z. (2005). Vírusgenom vizsgálatok szerepe a diagnosztikában. *Mikrobiológiai Közlevél* 5/3, 14-17.
3. Farkas B., Dencs Á., Pár A., Takács M. (2006). A hepatitis C vírus RNS változékonyságának nukleotidsorrend vizsgálata vírushordozókban. *Focus Medicinae*, VIII. évf. 2. szám 14-16.
4. N. Szomor K., Dencs Á., G. Tóth G., Kovács M. G., Y. Saleh Ali, Berencsi G., Takács M. (2007). Variability of the PreS1/PreS2/S regions of hepatitis B virus in Hungary. *Arch. Virol* 152, 697-704.
5. N. Szomor K., Dencs Á., Garai E., Rusvai E., Berencsi Gy., Takács M.: (2008) Mutations spectra on surface protein coding region of HBV genome in HBV vaccinated and non-vaccinated individuals in Hungary *Arch. Virol.* 153, 1885-1892

Ez a lista, csak a témához legközelebb álló közleményeket tartalmazza, de konkrétan az előadás témájában közlemény nem jelent.

Témavezető: Dr. Takács Mária

**„Pulsed-field” gélelektroforézis (PFGE) optimalizálása Taguchi-módszerrel
Streptococcus pneumoniae esetében**

Kérdésfelvetés: Az epidemiológiai vizsgálatokban nagy jelentősége van a baktériumok genotipizálásának, azaz rokonsági fokuk megállapításának, aminek segítségével pl. a rezisztens klónok terjedése jól nyomon követhető. A *Streptococcus pneumoniae* esetében a nemzetközileg is használt „gold standard” módszer a „Pulsed-field” gélelektroforézis (PFGE). A PFGE azonban nem működik egyformán jól a különböző törzsek esetében, sokszor többszöri ismétlésre van szükség, ami sok időt és pénzt emészt fel. Hogyan lehetne hatékonyabbá tenni a módszert? Erre a kérdésre kerestük a választ az eljárás lépéseinek, beállításainak optimalizálása során.

Módszerek: Az optimalizáláshoz a hasonlóan bonyolult rendszerekhez (ELISA¹, multiplex PCR²) korábban már sikeresen használt Taguchi-módszert választottuk. Ennek lényege, hogy 6 paraméter különböző értékeit bizonyos statisztikai rendszerben kombinálva, azok független hatása mindössze 18 kísérletből értékelhető. A PFGE lépései az eredeti beállítás szerint a következők: 1. Baktérium szuszpenzió készítés véres agarról, „cell suspension” pufferrel; 2. A baktérium beágyazása agaróz „plug”-okba (plug agaróz készítés EC lízis pufferrel); 3. Lízis-1: sejtfal bontás lizozimmal 37°C-on és RNS-mentesítés, 3 óra; 4. Lízis-2: fehérje-mentesítés, ON („overnight” = 18-20 óra); 5. Mosások; 6. Emésztés restriktációs enzimmal, 4 óra; 7. Futtatás, 21 óra; 8. Gél analízis. A kísérletek során változtatott paraméterek a következők voltak: baktérium szuszpenzió készítése 1 vagy 2 véres agarról, vagy BHI-ből („brain heart infusion” tápleves), illetve eredeti pufferrel, SDS-sel (nátrium-lauril-szulfát), PBS-sel (foszfát puffer), EDTA-val (etilén-diamin-tetra-ecetsav); Plug agaróz készítése: EC lízis puffer-rel, PBS-sel, TBE-vel (TRIS-borát-EDTA), SDS-sel, TE-vel (TRIS-EDTA), TAE-vel (TRIS-acetát-EDTA); Lízis-1: lizozimmal 37°C-, 25°C-, 52°C-on, litikázzal, SDS-sel, EDTA-val különböző ideig; Lízis-2: 1 óra, 3óra, ON; Emésztés: 2óra, 4óra, ON.

Eredmények, következtetések: Baktérium szuszpenzió készítése 1 plate-ről és BHI-ből hasonlóan jó eredményt adott, a szuszpendálásra az eredeti pufferen kívül PBS és EDTA is használható, SDS viszont nem. A plug agaróz EC lízis pufferrel, PBS-sel és TBE-vel is készíthető, SDS viszont erre sem volt alkalmas. A sejtfal feltárása lizozimon kívül litikázzal és SDS-sel is működött, sőt a lizozim nem csak 37°C-on, hanem 25°C-on is aktív volt. Sem a lízis-2 időnek, sem az emésztési időnek nem kell ON-nak lennie, elég 3 illetve 4 óra is, ezáltal a folyamat jelentősen lerövidíthető.

Publikációk: ¹Cs. Jeney, O. Dobay, A. Lengyel, É. Ádám and I. Nász (1999): Taguchi optimisation of ELISA procedures. *Journal of Immunological Methods*, 223:137-146.

²O. Dobay, E. Juhász, Á. Ungvári, Cs. Jeney, S.G.B. Amyes, K. Nagy: Taguchi optimisation of a multiplex pneumococcal serotyping PCR and description of 11 novel serotyping primers (*in press*).

Témavezető: Dr. Dobay Orsolya

Az N-cadherin szerepe a GABAerg sejtek tangenciális migrációjában

Az agykéreg fejlődése összetett folyamat, melynek főbb részei: a progenitor sejtekből való ideg- és gliasejtképződés, ezen sejtek migrációja, a neuronhálózatok kialakulása és a neuronhálózatok aktivitásfüggő változása. Az agykéreg neuronjai két helyről származnak: a palliumban a ventriculáris zónából (VZ) és a subpalliumban a gangliondombok ventrikuláris zónájából. A pallium ventriculáris zónájában proliferálódó sejtek piális irányban vándorolnak (radiális migráció) és serkentő neuronokká, illetve a később osztódó progenitorok utódai gliasejteké differenciálódnak. A gangliondombokból eredő, később gátló interneuronokká differenciálódó progenitorok először tangenciálisan vándorolnak a gangliondomboktól ventrálisan laterális irányban, majd a cortexet elérve annak marginális és intermedier zónájában. Ezután a serkentősejtekhez hasonlóan radiális migrációval érik el a végső helyüket.

A cadherineek Ca^{++} -függő sejtadhéziós molekulák, melyeknek kritikus szerepe van a különböző sejtípusok kapcsolódásában és migrációjában. Az általam vizsgált N-cadherinről (Cdh2) korábban mások megmutatták, hogy inaktiválódása elengedhetetlen a törzsdúcél sejteinek velőcsőből való lefűződéséhez és migrációjához. Munkám során azt vizsgálom, hogy lehet-e hasonló szerepe az N-cadherinnek az interneuronok tangenciális migrációjában.

Kísérleteim során meghatároztam az N-cadherin expressziós mintázatát a felnőtt és a fejlődő egéragyban RNS és fehérje szinten. Ezenkívül megvizsgáltam a CamKII α (glutamaterg sejtek) és a GAD65 (GABAerg sejtek) mRNS-ével való kolokalizációját kettős in situ hibridizációval. Kimutattam, hogy az N-cadherin expresszió a felnőtt, sőt már az újszülött egér agyában is hiányzik a GABA-erg sejtek bizonyos populációiból, valamint azt, hogy a gangliondomb ventrikuláris zónája és a jövőbeni striátum közötti migrációs zónában az N-cadherin expresszió szignifikánsan lecsökken.

Az N-cadherin funkcióját kétféle módon vizsgálom. (1) Transzgénikus egértörzs előállításával, amelyben a gangliondomb-specifikus expressziót irányító dlx1/2 gén közös enhancerének segítségével kifejeztetjük az N-cadherint a migráló interneuron progenitorokban. Itt elvégeztem a klónozási munkákat, amelynek során az enhancert tartalmazó plazmidba (M.Ekker, Ottawa, Canada) klónoztam az N-cadherin myc tag-gel ellátott cDNS-ét (m1/2Ncadmyc). A myc tag-re az általunk bejuttatott és az endogén Cdh2 megkülönböztethetősége miatt volt szükség. A transzgénikus egérvonal alapítóit az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlege állította elő mikroinjektálással. Jelenleg a transzgénikus vonalak létrehozása és vizsgálata folyik, amelynek keretében a genotipizálást és a keresztezéseket szintén én végzem. A funkció vizsgálatához a legerősebb expressziót mutató vonalat a szintén a laboratóriumunkban korábban előállított GAD65-GFP vonalhoz keresztezve az N-cadherin GABAerg sejtek migrációjára gyakorolt hatását könnyebben nyomon tudom követni.

(2) Továbbá egy szomatikus géntranszfer eljárást is meghonosítottam a laborban: az in utero elektroporációt. Az elektroporált sejtek azonosításához előállítottam az m1/2eGFP plazmidot. Az m1/2Ncadmyc és az m1/2eGFP plazmidot együtt, illetve csak az m1/2eGFP-t külön injektálom E13.5 napos feltárt, de in utero egérembriók telencephalikus agykamrájába, majd az injektálást követően elektroporálással (egyenáramú elektromos impulzusok: 60V, 5 pulzus, $t=50$ msec, 1Hz) juttatom a plazmidokat a gangliondomb sejtjeibe. Az embriókat tartalmazó méhet az anyába visszahelyezem és a sebet lezárva 3 napig hagyom őket fejlődni. Ekkor az embriók agyát kipreparálom és vibratómmal lemetszem, majd az ektopikus N-cadherin expresszióknak a migrációra gyakorolt hatását analízálom statisztikai módszerekkel.

Témavezető: Dr. Lele Zsolt, Csoportvezető: Dr. Szabó Gábor

PSMB7 szerepe a doxorubicinnal szembeni rezisztencia létrejöttében

Háttér. A doxorubicin colon és emlődaganat kemoterápiájában kulcsfontosságú gyógyszer, a vele szemben kialakuló kemorezisztencia a terápia hatékonyságának csökkenését eredményezi. A kemorezisztencia előrejelzésére idáig több markert javasoltak, melyek közül a PSMB7 gént több korábbi microarray kutatásban azonosították. A PSMB7 gén terméke a proteoszóma β alegységét alkotja, eddigi szerepét a doxorubicin rezisztenciában még nem vizsgálták. A gén doxorubicin rezisztens sejtvonalakban szignifikánsan felül expresszáldott, ezért felvetődik az oki szerepének lehetősége a rezisztencia létrejöttében.

Kutatásaink célja megvizsgálni, vajon a PSMB7 gén RNAi-vel való csendesítésének van-e hatása doxorubicin-rezisztens sejtvonalak kemorezisztenciájára.

Felhasznált módszerek. A vizsgálat során MCF-7-RAdr sejtvonalon dolgoztunk. A sejteket 0.01 mg/ml doxorubicint tartalmazó L15-ben, 37C-on, 5% CO₂-t tartalmazó környezetben tenyésztettük. Az RNS-t Qiagen RNeasy kittel izoláltuk, a gén expresszióját RT-PCR-el mértük. RNAi oligokat a Dharmacon szoftvereivel terveztük, és Ambion siRNA construction kit-el szintetizáltuk. A transzfecciót siPort Neofx transzfecció reagenssel végeztük. Seeding után 1h-val történt RNS interferencia, 24h-val később gyógyszeres kezelés. Leolvasás 72 órával később történt Casy automata sejtszámlálóval, háromszori beméréssel. A vitális sejtek arányának lemérése az összes sejt arányában ugyancsak Casyval történt. A kísérlet háromszori ismétlése alapján statisztikai számítások elvégzése t-próbával történt.

Eredmények. AZ RNAi oligo az 548-adik nukleotidnál köt be a 5. exonon. A rezisztens sejtvonalak a doxorubicin kezelés hatására 30,60%±31,2%-ban maradnak meg. A PSMB7 siRNA-val kezelt rezisztens sejtvonalak doxorubicin kezelés hatására 5,87%±10,2% -ban maradnak meg, ami t-próbával $p=0,034661$ értékű szignifikanciával tér el az RNAi-vel nem kezelt sejtektől. A doxorubicin szenzitív sejtvonalak 9,67%±14,5%-ban maradtak életben a doxorubicin kezelés hatására, ami a PSMB7 siRNA kezelt rezisztens sejtek doxorubicines kezelésű sejtvonalainak vitalitásától nem tért el szignifikánsan ($p=0,42$).

Diskusszió. Eredményeink alapján a PSMB7 felül expressziójának géncsendesítéssel történő megszüntetése a rezisztens sejtekben a rezisztenciát csökkenti. A gén expresszióját rezisztens betegekből nyert tumormintákon kellene vizsgálni ahhoz, hogy klinikai szignifikanciát lehessen becsülni.

Témavezető: Dr. Gyórfy Balázs

Sándor Ágnes Petra, ÁOK, V. évf.
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

Új szereplők a cirkadián ritmus szabályozásában: a RAS és a ROS

A cirkadián ritmus lehetővé teszi, hogy szervezetünk előre felkészüljön a külső tényezők periódikus változásaira és így életműködéseink ritmusa összhangba kerüljön környezetünk napszaki változásaival. Klinikai és kísérletes megfigyelések sora utal arra, hogy ennek az adaptációs képességnek a zavara csökkenti a környezeti stressz-hatások iránti toleranciát, és ez számos betegség (pl. egyes rosszindulatú daganatok, a metabolikus szindróma és a bipoláris betegség) kialakulására hajlamosít.

A cirkadián ritmus létrehozásáért egy sejt szinten működő molekuláris oszcillátor felelős. Az oszcillátor alapjául szolgáló szabályozási kör minden eukariótában hasonló törvényszerűségek szerint épül fel, ezért célszerű működését egyszerű modellorganizmusokban vizsgálni. Az általunk alkalmazott modellorganizmus a *Neurospora crassa* nevű gomba. Az oszcillátor működésének alapja egy transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurok. *Neurospora*-ban a visszacsatolási hurok serkentő (pozitív) eleme a White Collar-1 (WC-1) és White Collar-2 fehérjékből álló komplex (WCC), a negatív visszacsatolásért felelős eleme pedig a Frequency (FRQ) fehérje. A WCC egyben a *Neurospora* primer fényreceptora és ezáltal a cirkadián óra fénybemeneti komponense is.

Neurospora-ban a cirkadián óra egyik fő kimenete és egyben az óraműködés indikátora a ritmusos spóráképzés. Ez a ritmicitás vad típusú törzsben csak reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) jelenlétében válik kifejezetté. A ROS-hoz hasonlóan kifejezetté teszi ezt a ritmust a Ras-1 kis G-fehérje aktivitását fokozó mutáció jelenléte is.

Kísérleteinkben e két, a cirkadián óra kimenetét alapvetően meghatározó faktor szerepét, illetve azok egymásra hatását vizsgáltuk. Jellemeztük a konidizáció ROS-függését állandó körülmények mellett, illetve a természetes körülményeket modellező fény-sötétség ciklusok során. Vizsgáltuk egy olyan törzs cirkadián órájának viselkedését, amelyben egy *Rasgef* (guanine nucleotide exchange factor) homológ gén hiányzik. Amennyiben e gén terméke a konidizáció ritmusának szabályozásában szerepet játszó Ras aktivitását növeli, hiányában a ritmus gyengülése várható.

A cirkadián fenotípus jellemzésére a *Neurospora*-t szilárd táptalajon növesztettük, és a spóráképzés ritmusát denzitometriásan elemeztük. Western blot technikával vizsgáltuk a fehérjeexpressziót és -foszforilációt. A génexpresszió követéséhez RNS-t preparáltunk, cDNS-sé írtuk át és real time PCR mérést végeztünk.

Megállapítottuk, hogy fény-sötétség ciklusokkal ROS hiányában is előhívható a konidizációs ritmus, ugyanakkor a ROS koncentráció-függő módon befolyásolja a folyamat fázisát, azaz megjelenésének időpontját. Alacsony ROS koncentrációk mellett a *Rasgef* génhányos törzsben spóráképzési ritmus nem volt detektálható. Ugyanakkor a molekuláris óra működése a génhányos törzsben is kimutatható volt. Két, fényre indukálódó gén expressziójának mintázata pedig arra utalt, hogy a WCC fényreceptor funkcióját a mutáció nem befolyásolta.

Kísérleteink során a cirkadián óra egy új kimeneti komponensének, egy RasGEF -nek a szerepét azonosítottuk. Eredményeink szerint, a *Neurospora* órájának ROS iránti érzékenységét alapvetően meghatározza ezen RasGEF működése.

Az előadásban elhangzó eredmények újak, a munkacsoport korábbi közleményei azokat nem tartalmazzák.

Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, Gyöngyösi Norbert

Spiró Zoltán TTK, IV. biológus

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

**Az oxidatív stressz gátolja a hősokk válasz indukcióját és a stresszadaptációt -
az RNS metabolizmus potenciális szerepe**

Az öregedés az adaptációs képesség progresszív csökkenéseként is felfogható. A stressz adaptáció az életkor előrehaladtával romlik, ennek egyik példája a hősokk válasz indukálhatóságának időskori visszaesése. A hősokk válasz biztosítja a fehérjék natív konformációjának fenntartását és a fehérje kölcsönhatási hálózatok működését. Kulcsszerepet játszik az akut stresszt követő túlélésben, valamint a maximális élettartam meghatározásában. Az öregedés talán legfőbb kóroki tényezője az oxidatív stressz, azonban a hősokk válaszra kifejtett hatása kevésbé vizsgált.

Munkám során arra a kérdésre keresem a választ, vajon hogyan befolyásolja az oxidatív stressz a hősokk-rendszer indukálhatóságát. A kérdés megválaszolásához két modellrendszert alkalmaztam. COS-7 sejteken a hősokk válasz marker Hsp70 fehérje szintjét áramlási citometriával és Western blottal vizsgáltam, *Caenorhabditis elegans*-on pedig hőstressz utáni túlélést (termotoleranciát) mértem. A hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezelés jelentősen és koncentrációfüggően gátolta a Hsp70 fehérje expresszióját COS-7 sejtvonalon, ugyanakkor nem volt hatása a fehérje lebomlására (turnoverére). A hősokkfehérje szint csökkenésével összhangban *C. elegans* fonálférgek előzetes oxidatív kezelése csökkentette az állatok magas hőmérsékleten való túlélését, a Hsp 16.2 hősokkfehérje promóterének aktiválódását azonban nem gátolta. Eredményeim arra utalnak, hogy a gátlás nem transzkripcionális, és nem poszttranszlációs szinten valósul meg. Felmerül az RNS metabolizmus (pl. az RNS interferencia) szerepe, amellyel kapcsolatos kísérleteim sejteken és *C. elegans*-on folyamatban vannak.

Eredményeim alapján a fokozottan oxidatív környezet gátolja a stresszadaptációt, így az oxidatív stressz és a szabadgyökök eddig még nem ismert, öregítő mechanizmusát tártuk fel.

Témavezető: Dr. Tóth Márton, Dr. Söti Csaba

A Nox4 NADPH-oxidáz működésének vizsgálata fibroblaszt sejtekben

A NADPH-oxidázok a molekuláris oxigént szuperoxid gyökké redukálják, miközben az általuk kötött NADPH molekula oxidálódik. Az így keletkezett szuperoxid gyök enzimátikus és nem enzimátikus úton alakulhat át hidrogén-peroxiddá, melynek továbbalakulása során további változatos reaktív oxigénszármazékok (ROS) keletkezhetnek, mint például HO₂SCN, HOCl vagy OH[•]. A máig azonosított hét NADPH-oxidáz izoforma (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, illetve Duox1, Duox2) igen sokféle élettani folyamatban vesz részt. Többek között szerepet kapnak a fagociták oxigén dependens ölü mechanizmusában (Nox2), a belsőfül embrionális fejlődésében (Nox3), vagy a pajzsmirigy hormonok szintézisében (Duox2). Az enzimes család több tagjának, így az általunk vizsgált Nox4-nek a funkciója sem ismert még pontosan.

A NADPH-oxidázok közül több csak más fehérjével komplexet alkotva képes ROS termelésre. A Nox2 és Nox3 molekulák aktivitása például p22^{phox} dependens, sőt a Nox2 szerkezeti stabilitásához is igényli a p22^{phox} membránproteinnel való molekuláris kölcsönhatást. A valószínűleg konstitutívan működő Nox4 fehérje esetében is alátámasztja szakirodalombeli adat azt a feltevést, hogy aktivitása p22^{phox}-függő. Ezt azonban eddig csak heterológ expressziós rendszereken vizsgálták. Kísérleteinkkel arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Nox4 fehérje aktivitása olyan sejtekben is p22^{phox}-függő-e, melyekben a Nox4 protein endogén módon fejeződik ki.

Irodalmi adatokból ismert volt, hogy a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás során Nox4 dependens módon termelődik H₂O₂. Ezt vizsgáltuk humán aorta fibroblaszt sejteken, melyek myofibroblasztá alakulását TGF-β1 kezeléssel indukáltuk. Az indukció hatására az Amplex red assay-vel mért H₂O₂ mennyiség és a reverz transzkriptáz-PCR technikával detektált mRNS mennyiség párhuzamos változást mutatott: az irodalmi adatoknak megfelelően az indukciót követő 24 órában folyamatosan nőtt. Azt, hogy az általunk detektált H₂O₂ valóban Nox4 által katalizált reakcióból származik, siRNS-sel végzett kísérlettel vizsgáltuk. A sejtek Nox4 ellenes siRNS-sel való transzfektálását követően az aorta fibroblasztok H₂O₂ termelése nem indukálódott TGF-β1 kezelés hatására. Laborunknak rendelkezésére álltak Nox4 knock-out egerek is, s ezért a kapott eredmények további megerősítésére ezek farok fibroblasztjaiból származó primer sejttenyészetben is megmértük a H₂O₂ termelést. A termelt H₂O₂ mennyisége ebben az esetben sem nőtt TGF-β1 indukcióra annak ellenére, hogy a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás megtörtént.

Miután beállítottuk a fenti fibroblaszt-myofibroblaszt sejt kultúra modellt, vizsgálni kezdtük, hogy a Nox4 aktivitásához szükség van-e p22^{phox} fehérje jelenlétére. A fibroblaszt sejtekből származó teljes sejt lizátummal végzett Western blot eljárással a p22^{phox} fehérjét nem tudtuk detektálni. Ezért ezt követően mRNS szintjén vizsgáltuk a p22^{phox} jelenlétét a fibroblaszt sejtekben. RT-PCR technikával kimutatható volt a p22^{phox} fehérjét kódoló mRNS, azonban mennyisége TGF-β1 indukció hatására nem nőtt. A fibroblaszt sejtek p22^{phox} ellenes siRNS-sel történő kezelése a p22^{phox} fehérjét kódoló mRNS mennyiségét jelentősen csökkentette (~5%-ra), viszont a TGF-β1 indukcióra bekövetkező H₂O₂-termelés-növekedést nem befolyásolta. Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a korábbi feltevésekkel ellentétben a Nox4 ROS termelése nem p22^{phox}-függő.

Az előadás témájában a témavezetőm által megjelentetett publikáció:

Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney; Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 5;97(14):8010-4.

Témavezetők: Dr. Péterfi Zsolt, Dr. Geiszt Miklós

Tóthpál Adrienn ELTE TTK biológus V.
Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet

***Streptococcus pneumoniae* hordozás felmérése óvodások között**

Célkitűzés: A *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) esetében különösen nagy jelentősége van a baktérium tünetmentes hordozásának, a hordozók jelentik a fertőzés elsődleges forrását. Élete során mindenki valamikor pneumococcus hordozóvá válik. Felnőtt korban a hordozás aránya 5-10%, míg a kisgyerekek között ez akár 50-100% is lehet. A konjugált pneumococcus vakcina (*Prevenar*) idén októberben vált a 2 év alatti gyerekek számára ingyenessé, ami azt jelenti, hogy várhatóan ugrásszerűen megnő a beoltottak száma. Ez az oltás bizonyítottan hatással van a hordozásra is. Ezért különösen fontos, hogy képet kapjunk az óvodáskorú gyerekek pneumococcus hordozásáról még az oltás elterjedése előtt, annál is inkább, mert hasonló vizsgálat Magyarországon korábban még nem történt.

Módszerek: Harmincnégy szegedi óvoda orrából izolált pneumococcus felmérését végeztük el. A törzseket először a fajra jellemző autolizin enzim kimutatására szolgáló *lytA* PCR-rel ellenőriztük. A szerotipizálás összetett rendszerben történt, ötvözve a hagyományos (szerológiai) és modern (PCR-es) módszert. Első lépésként egy multiplex PCR-rel a törzseket 6 csoportba osztottuk, ezeken belül specifikus savóval határoztuk meg a szerotípusokat, végül ezt típus-specifikus primerekkel konfirmáltuk. A törzsek genetikai összetartozásának (klonalitásának) vizsgálatához az ún. „pulsed-field” gél elektroforézist alkalmaztuk. Az antibiotikum érzékenységet E-teszt segítségével határozzuk meg (ez még folyamatban van).

Eredmények és következtetések: A 34 törzsből 25-nek a szerotípusát sikerült meghatározni (=73.5%). A 14-es és 6A szerotípus dominált a csoportban (6-6 izolátum), 3 darab 3-as szerotípusú törzset találtunk, 2-2 izolátummal képviseltette magát a 13-as, 18C és 9(L,N) típus, valamint 1-1 izolátum tartozott a 9V, 19A, 19F és 15A típusokba. A *Prevenar* vakcina mindössze 7 szerotípust tartalmaz, ezek a következők: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F és 23F. Ezek közül a 6B és a 9V védeltséget ad a 6A és 9(L,N) típusok ellen is, míg ez nem mondható el a 19F-ről. Ezeket figyelembe véve az általunk vizsgált 34 izolátumból 18-at fedne le a *Prevenar* (18/34=52.9%). Érdekes, hogy a hordozásban az irodalom szerint gyakran megjelenő 23F szerotípus egyáltalán nem fordult elő ebben a csoportban, és a 19A és 19F típus is csak 1-1 izolátumnál. Ugyanakkor 2 törzs is 13-as szerotípusú volt, ami kifejezetten ritkának számít. A törzsek genetikailag meglehetősen nagy diverzitást mutattak, bár egy-egy kisebb 6A illetve 14-es klón jelenléte megfigyelhető.

Jelen munka folytatásaként nagyobb számú óvoda orrából leszűrt hordozott pneumococcusok vizsgálatát tervezzük, összehasonlítva az oltott és oltatlan populációt. Etikai engedély kérése már folyamatban van.

Témavezető: Dr. Dobay Orsolya