



A Fehérjetudományi Kiválósági Együtműködési Program (MedInProt) egyedülálló és hiánypótló kezdeményezés Magyarországon, melynek célja:

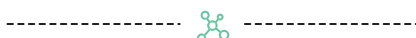
- a különböző fehérjetudományi szakterületek összekapcsolása,
- hálózatba szervezése és megerősítése,
- a versengő együttműködés gyakorlatának meghonosítása,
- a szakterületi szinergizmus katalizálása, valamint
- a már elismert kutatók együttműködésének segítése.



A 2014. májusában indított programot a Magyar Tudományos Akadémia támogatja, és jelenleg az Eötvös Loránd Tudományegyetem, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, a Semmelweis Egyetem és a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont együttműködésével valósul meg.

A program első ütemében (2014-2015) a fehérjetudományok területére eső kimagasló kutatásokat támogattunk, több fehérjekutatót kisebb eszközök és berendezések megvásárlásához jutattuk hozzá, valamint nagyértékű műszereken gépidő-támogatást valósítottunk meg.

A MedInProt Program támogatni kívánja szakkonferenciák, előadás-sorozatok, szakmacsoport-gyűlések szervezését, valamint angol nyelvű Msc. fehérjetudományi program beindítását. Távlabbi célunk egy fehérjetudományi troubleshooting és hotline kiépítése, szakkönyvek beszerzése, írása és fordítása.



Kuratórium elnöke: Perczel András

Tagok:

Keserű György Miklós

Ligeti Erzsébet

Málnási-Csizmadia András

Molnár Mária Judit

Pongor Sándor

Salgó András

Tompa Péter

Tartalom

Szinergia I. 02

Szinergia II. 16

Szinergia III. 36

Gépidő 40

Kis eszköztámogatás 54

Szabályozó fehérjék szerepe az öregedésben

C. elegans-ban az öregedési folyamatot szabályozó HSF1 (heat shock factor 1) transzkripció faktor közvetlenül hat az endoplazmás retikulumban (ER) működő UPR (unfolded protein response) útvonal 4 génjének aktivitására.

A hősokk emlős sejtekben ER stressz indukciójához vezet, ugyanakkor a Hsf1 csendesítése nem csökkenti az ER stressz markerek szintjét, ami azt sugallja, hogy más, indirekt kapcsolatnak is szerepe lehet a szabályozásban.

A *C. elegans* DAF-21/Hsp90 hősokkfehérje szükséges a stressz-aktivált DAF-16/FOXO funkciójához és élettartamnövelő hatásához.

Role of regulatory proteins in the aging process

The heat shock transcription factor HSF1 directly regulates the activity of four UPR (unfolded protein response) genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Heat shock provokes endoplasmic reticulum stress in mammalian cells; however, silencing of Hsf1 did not decrease the level of stress markers, indicating other indirect connections in the control network. The DAF-21/Hsp90 heat shock protein is required for the function and life-span extending effect of the stress-inducible DAF-16/FOXO transcription factor in *C. elegans*.

Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamatban

Dr. Vellai Tibor (ELTE Genetikai Tanszék)



A környezeti és molekuláris stressz-faktorok alapvetően befolyásolják a sejtek működését és túlélését, így ezen keresztül az élőlények élettartamát. Az eukarióta sejtek magas hőmérsékletre adott stressz-válaszának fő koordinátora a HSF1 (Heat Shock Factor 1) transzkripció faktor, amely a Hsp (heat shock protein, also called molecular chaperone) gének aktiválásán keresztül eredményezi a citoplazma fehérjékének konformációs stabilitását, ezáltal fenntartva a sejtes homeosztázist változó körülmények között. A HSF1 és HSP fehérjéknek kitüntetett szerepük van az élettartam meghatározásában számos élő szervezetben. A korábban bioinformatikai úton meghatározott potenciális HSF1 célgének (melyek szabályozó vagy kódoló régiója konzervált HSF1 kötőhelyet tartalmaz) között számos nem Hsp gént találtunk. E gének szerepét játszunk például az endoplazmatikus stresszválasz útvonalban, az autofágiában (sejtes önmészés) és az apoptotikus sejtpusztulásban. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a HSF1 nemcsak a hőstressz-válaszban, hanem más stressz-válasz folyamatban is kitüntetett szerepet játszik. Potenciálisan tehát a HSF1 „mester” koordinátora az öregedési folyamatra ható sejtes stressz-válasz folyamatoknak.

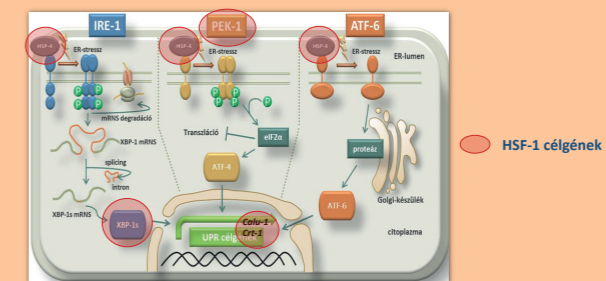
Jelen kutatási kérdéseink:

egy általános modell felállítására vonatkozóan mobilis genetikai elemek (amelyek pl. a humán genom közel felét alkotják) öregedési folyamatban betöltött szerepének vizsgálata a genetikai modellszervezet *Caenorhabditis elegans* fonalféreg fajban az endoplazmatikus retikulumhoz köthető UPR-ben (unfolded protein response) szerepet játszó HSF1 célgének jellemzése *C. elegans*-ban a *C. elegans* élettartamának szex-specifikus szabályozása mögött rejlő mechanizmusok feltárása az agy öregedési folyamatának tanulmányozása a gyümölcslégy *Drosophila melanogaster*-ben

Eredményeink:

megalkottuk az öregedési folyamat mechanizmusának új modelljét, amely szerint a genom instabilitást okozó mobilis genetikai elemek aktivitása (inzerációs mutagenézis) eredményezi elsődlegesen a szoma öregedését és az öregkori degeneratív betegségek kialakulását (kézirát revízió alatt) mobilis genetikai elemek csendesítésével és inaktiválásával jelentős élettartam növekedést tapasztaltunk *C. elegans*-ban. *C. elegans*-ban kimutattuk, hogy négy UPR gén közvetlen HSF1 szabályozás alatt áll (kézirát elkészíté) kimutattuk, hogy az inzulin/IGF-1 (insulin-like growth factor 1) jelátviteli rendszer transzkripció faktorát kódoló *daf-16/FoxO* gén aktivitása közvetlenül a szex-determinációs génszakad szabályozása alatt áll; a hermafrodita („nőstény”) állatokban a *daf-16* aktívabb, és ez megmagyarázza a hermafroditák hosszabb élettartamát (kézirát beküldve) igazoltuk, hogy a *Drosophila* agytörzsben az autofág folyamat kapacitása az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken (és ezzel párhuzamosan a káros fehérje aggregátumok mennyisége nő), és találtunk egy olyan fehérjét, amely életkor-függő módon gátolja az autofágiát az agytörzsben

Szinergia I. programunk legfőbb eredményei



- A HSF1 UPR útvonal szabályozásában betöltött szerepét igazoltuk *C. elegans*-ban (Vellai – Söti)
- A HSF1 – UPR célgének kapcsolatát humán sejtekben is felderítettük (Vellai – Bánhegyi)
- Folyamatban: mobilis genetikai elemek inzerációját kívánjuk kimutatni idős (*C. elegans* és *Drosophila*) állatokban hősokk- és UPR- génekben (Bánhegyi – Söti – Vellai)

Dr. Söti Csaba (SE OVI Stressz Csoport)

<http://stresszgroup.semmelweis.hu>



A fehérje konformációs homeosztázist védő hősokkválaszt a hősokk transzkripció faktor (HSF1) által koordinált chaperonok biztosítják, a fehérjék konformációjának fenntartása, renaturációja, valamint a javíthatatlan fehérjék proteasomális és autofág degradációra történő irányítása révén. A HSF1-et a Hsp90 regulálja, amely többszáz intrinzik instabilitással rendelkező jelátviteli fehérje szerkezetét és működését stabilizálja. Eddigi (közötte saját) megfigyelések igazolják, hogy a hősokkválasz kapacitása az életkor előrehaladtával, valamint oxidatív stressz hatására hanyatlak. A Hsp90 szerepe az öregedésben egyelőre ismeretlen.

Céltűzéseink:

Vizsgáljuk a *C. elegans* hősokkválasz öregedés során történő expressziós változásait felderítjük a Hsp90 *C. elegans* élettartama és UPR-re kifejtett hatását

Fontosabb eredményeink:

1. Meglepetésünkre a főbb *C. elegans* hősokkfehérjék (Hsp70, Hsp16.2, Hsp90) mRNS-einek hősokk-indukált expressziója az öregedés során nem csökken, hanem szignifikánsan nő.
2. Kimutattuk, hogy a *C. elegans* Hsp90 szükséges a stressz-aktivált és az inzulin jelpályá hatásához közvetítő DAF-16/FOXO transzkripció faktor funkciójához és élettartamnövelő hatásához.
3. Megegyeztetettük, hogy a *C. elegans* HSF1 részt vesz az UPR aktíválásában, azonban a Hsp90 illetén hatását nem tapasztaltuk.

Dr. Bánhegyi Gábor (SE OVI ER Redox Csoport)

<http://erredox.semmelweis.hu>



Az endoplazmás retikulum (ER) lumenének redox homeosztázisa alapvető a transzlációban képződő fehérjék konformációjának kialakításában és fenntartásában. A redox egyensúly megbillenése ER stresszt vált ki, melyet adaptációs mechanizmusok próbálnak kivédeni, melyek közül az UPR (unfolded protein response) a legismertebb. Az UPR jelpályá aktiválódása egyrészt fokozza a lumenális chaperonok expresszióját, másrészt az autofágia és/vagy az apoptózis beindulásához vezethet.

Céltűzéseink:

A hősokkválasz és az UPR kölcsönhatásainak vizsgálata; Az autofágia és az apoptózis közötti átkapcsolás mechanizmusának experimentális vizsgálata és modellezése.

Fontosabb eredményeink:

Kimutattuk, hogy hősokk ER stressz indukciójához vezet, ugyanakkor a Hsf1 csendesítése nem csökkenti az ER stressz markerek szintjét, ami azt sugallja, hogy más, indirekt kapcsolatnak is szerepe lehet a szabályozásban. Humán sejtvonalakon különböző ER stresszorok használatával kimutattuk, hogy ER stressz esetén a túlélésben az autofágia kulcsszerepet játszik. Mindezt megerősítettük autofágia aktivátorokkal és gátlószerekkel is.

Az áttétképzést és gyulladást fokozó S100A4 fehérje működése és gátlása

A szinergia program során az elmúlt hónapokban célul tűztük ki a miozin filamentumok szétesését okozó lehetséges hatások molekuláris szintű vizsgálatát. NMR, CD, MS-MS módszerek segítségével jellemeztük az aggregációt, a különböző hosszúságú foszforilált és nem-foszforilált miozin szakaszok szerkezeti, dinamikai tulajdonságait. Bioinformatikai eszközökkel szignifikáns és konzervált különbséget találtunk az egyes nem-izom miozin II láncok C-terminális rendezetlen szakaszának fizikai/kémiai tulajdonságában. Irányított fehérjeevolúción alapuló stratégiát követve a természetből ismert legerősebb S100A4-kötő peptidnél 200-szor hatékonyabb, pikomoláris affinitású antagonistá peptidet hoztunk létre, amely ráadásul még tovább fejleszhető.

Function and inhibition of the metastasis and inflammation promoting protein, S100A4

During the last months we focused on molecular level elucidation of myosin filament disruption caused mainly by phosphorylation. A combination of NMR, CD, MS-MS techniques helped in the description of structural and dynamical properties, as well as aggregation behavior of varying lengths phosphorylated and non-phosphorylated myosin fragments. We found significant and conserved differences between the physical/chemical properties in the disordered C-terminal tail of non-muscle myosin II isoforms using bioinformatics analysis. Using directed protein evolution we produced antagonist peptides that bind S100A4 with picomolar dissociation constant and can be further improved.

Bodor Andrea

ELTE TTK Kémiai Intézet
Szerkezeti Kémia és
Biológia Laboratórium

Az NMR spektroszkópia tárházát felhasználva és fejlesztve a fehérjék szerkezeti és dinamikai sajátságait kutatom. A projektben a szabad formában rendezetlen NM2A és p53 kötőrégiók, illetve az S100A4 fehérjével alkotott komplexek jellemzése a célom.

Nyitrai László

ELTE TTK Biológiai Intézet Biokémiai Tanszék

A kalcium-kötő S100 család fehérje-fehérje kölcsönhatásait kutatom a szerkezeti biokémia eszközeivel. A projektben az S100A4 és a nem-izom miozin II (NM2A) izoformák szelektív kölcsönhatásának jellemzése valamint az S100A4-p53 komplex szerkezeti hátterének feltárása van a fókuszban.

Pál Gábor

Azt vizsgálom, hogy milyen alapvető törvényszerűségek szabják meg a fehérjék közötti kölcsönhatások affinitását, specifitását. Ehhez részben irányított fehérjeevolúciót használok, amellyel egyben új kölcsönhatásokat is fejlesztek. A projektben az S100A4 kötőhelyének jellemzése és gátlása a fő célom.

Kalmár Lajos

MTA TTK Enzimológiai Intézet
Rendezetlen fehérje
Kutatócsoport

A bioinformatika eszközeit felhasználva kutatom a rendezetlen fehérjék evolúcióját, funkcióját és szerkezeti sajátságait. A projektben a rendezetlen és coiled-coil szakaszok evolúciós vizsgálatát és a komplex kialakulásának modellezését célozom.

Az áttétképzést és gyulladást fokozó S100A4 fehérje működése és gátlása
 Nem-izom miozin 2 (NM2) szerkezeti vizsgálata, az S100A4 kötőhely optimalizálása, NM2 izoformák bioinformatikai összehasonlítása

Az NM2A Ser1943 foszforilációjának hatása a C-terminális régió szerkezetére

A monomer M67 fragmentum rendezetlen szerkezetű, de kiterjedt régiókban nagszencs helicitást mutat. A coiled-coil dimer M111 fragmentum középső szakasza a kísérleti körülmények között láthatatlan, N-terminális szakasza pedig inherecs helicitást mutat.

A Ca²⁺-aktiválta S100A4 fehérje fiziológias kötőpartnerei

A NM2 izoformák C-terminális (S100A4-kötő) régiójának konzerváltság-analízise

A rendezetlen C-terminális (a coiled-coil domén és a rendezetlen régió határát háromszög jelzi) nagy variabilitást mutat az izoformák között, melynek szekvenciája kevésbé, fizikai/kémiai karakterisztikája jobban konzervált.

Nagyaffinitású S100A4-kötő peptidok 2-lépcsős evolúciója

1. Kombinatorikus alamin párosítás azonosítja az energetikailag legfontosabb, póros kettes „forró” pozíciókat
2. A S100A4-et leggyakrabban kötő peptid evolúciójához a „forró” területek megengedjük mind a 20-éle aminocsoport elfordulását

Páratlanul erősen kötődő, evolált S100A4-kötő, antagonistá peptidok

Kompetitív fluoreszcencia polarizációs mérések alapján az E238 mutáció (G, a E23Y mutáció 200x növeli a vad típusú miozin peptid S100A4-kötő affinitását)

Fluo-MPT (Kd = 100 pM) = MPT²
 $K_d = 15.9 \pm 4.5 \mu\text{M}$
 $K_d = 0.5 \pm 0.09 \mu\text{M}$

A MEDinPROT támogatást megköszönő publikációk

1. Biri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Köhidal L, Fésüs L, and Nyitrai L. *Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2*. Biochem J, Oct 20, 2015, ; DOI: 10.1042/BJ20150843
2. Gógl G, Alexa A, Kiss B, Katona K, Kovács M, Reményi A, Nyitrai L. *Structural basis of RSK1 inhibition by S100B: modulation of the ERK signaling cascade in a calcium-dependent way*. J. Biol. Chem., in press
3. Kiss B, Kalmár J, Nyitrai L, Pál G. *Isoform-selectivity of S100A4-induced non-muscle myosin II filament disassembly is synergistically determined by structural elements in the tail region*. J. Mol. Biol. Under review
4. Pály Gy, Kiss B, Nyitrai L, Bodor A. *Changes in the dynamics of S100A4 upon a non-muscle myosin binding*. Chemistry, before submission

„Szakterületeink részletes bemutatása” teadélutánok

- Bodor Andrea: NMR alkalmazhatósága biológiai mintákon
- Kalmár Lajos: A rendezetlen fehérjék funkcionális evolúciója
- Bóta Attila: A kisszögű röntgenszórás rejtelmei
- Harmat Veronika: Fehérjekristallográfia: lehetőségek és kihívások
- Nyitrai László: Hogyan kerülnek a rekombináns fehérjék a laborasztalra

Előadásenként átlagosan 30-40 hallgató vett részt

Fehérjéket tartalmazó gyógyszerkészítmények

Polimerszál-hordozós fehérjekészítmények és biomimetikus vezikuláris rendszerek fejlesztését és széleskörű jellemzését végeztük. A modern biotechnológia alkalmazására a fehérje hatóanyag termeltetésétől a végső kiszerelési formáig sor került. Alapvető vizsgálatokat végeztünk a technológia kritikus lépéseinek feltárása céljából, az atomi mérettől a mikrométeres dimenziókig terjedő szerkezeti és morfológiai sajátosságokra koncentrálnak.

Pharmaceutical products containing protein

Development and complex characterization of protein pharmaceuticals on fibrous polymer carriers and biomimetic vesicle nano-vehicles were carried out. State of art biotechnology was involved from protein production until product formulation. Critical details of technology were investigated with physico-chemical methods focusing on the structural and morphological features covering the range from the atomic scale up to the dimension of micrometers.

Fehérjéket tartalmazó gyógyszerkészítmények

Ballagi András, Bóta Attila, Marosi György

Richter Gedeon Nyrt Biotechnológiai Laboratórium
MTA TTK Biológiai Nanokémia Kutatócsoport
BME SzKT SafecoPharmTech laboratórium

A biogén gyógyszerek a gyógyszeripar leghatékonyabb és legnagyobb hasznot hozó, de ugyanakkor legnagyobb technológiai kihívást jelentő készítményei. A kontrollált gyártás és a stabil gyógyszerforma megvalósítása technológiai és analitikai fejlesztéseket igényel.

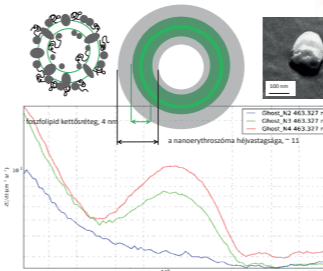


**MTA-TTK
Bio-NanoChem**

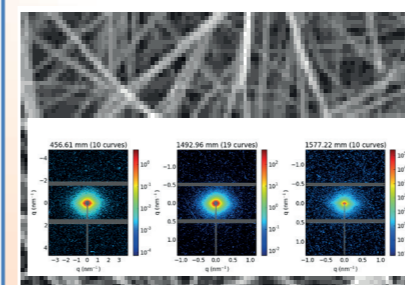
Komplex szerkezeti és morfológiai vizsgálatok
Röntgenszórás és diffrakció széles mérettartományban (0.2 nm-től 300 nm-ig)



Biokompatibilis Fehérje – Lipid rendszerek: Nanoerythrocytes



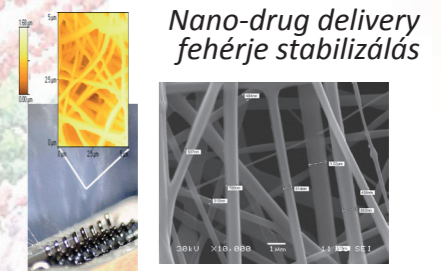
Szálak szerkezetű Fehérje – Polimer rendszerek:



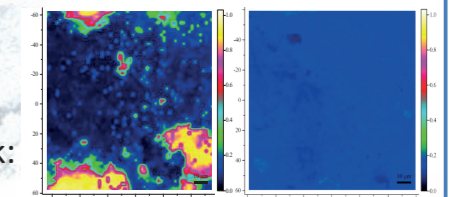
Cél: A technológia és a szerkezet összefüggéseinek jobb megértése, az ellenőrzési, és a szabályozási lehetőségek bővítése.

**BME
SafecoPharmTech**

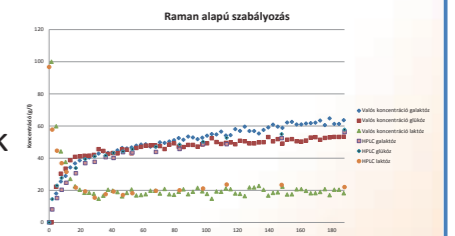
Pharmatech Model Lab. folyamatos technológia



Immobilizált enzimek, organo-katalizátorok, Raman térképezés



Kontrollált biotechnológia, PAT + kemometria



Szinergia

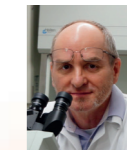
Peptid/fehérje nanostruktúrák előállítása liposzómák alkalmazásával és anélkül
Morfológiai és szerkezetvizsgálatok: orientációs hatások vizsgálata

Kombinált Raman – SAXS analízisek és a szerkezet modellezése

A kooperáció kiterjesztése daganatellenes gyógyszerek, őssejtek formulálására, exoszómák kutatására

Richter-Biotech Laboratórium

Rekombináns fehérje emlős sejtekkel történő gyártástechnológiáinak kutatása és fejlesztése
Modern biotechnológia által nyújtott mérnöki lehetőségek felhasználása a gyógyszeriparban



Egy újonnan felfedezett gyulladáskeltő folyamat nyomában

Előállítottunk nagy tisztaságú, sejtenyészési körülmények között használható rekombináns MASP-1 fragmentumot, és ennek irányított fehérjeevolúcióval kifejlesztett inhibitorát, az SGMI-1 fehérjét. Ezek segítségével *in vitro* modellrendszerben kimutattuk, hogy a MASP-1 indukálja az endotélsejtek E-szelektin adhézios molekuláját mind mRNS, mind fehérje szinten, ami a komplementrendszer-endotélium-leukocita együttműködésen alapuló gyulladásszabályozás új, eddig ismeretlen mechanizmusa. Az SGMI-1 dózisfüggően gátolja a MASP-1 hatására bekövetkező Ca-mobilizációt, és még a hatékony dózisonál jóval magasabb koncentrációban sem toxikus az endotélsejtekre.

Assessing a newly discovered inflammatory pathway

We prepared a stock of recombinant MASP-1 fragment and its inhibitor SGMI-1, developed by directed protein evolution, which were sufficiently pure to be applied to cell culture. Using these recombinant proteins in an *in vitro* model system, we discovered that MASP-1 is able to induce E-selectin adhesion molecule in endothelial cells, at the levels of both mRNA and protein, which is a hitherto unknown mechanism of inflammatory regulation driven by the cooperation of complement, endothelium and leukocytes. SGMI-1 blocks MASP-1 induced Ca-mobilization in a dose-dependent manner, and SGMI-1 does not produce any sign of toxic effects in endothelial cells even at concentrations much higher than the effective dose.

Egy újonnan felfedezett gyulladáskeltő folyamat nyomában

Gál Péter, Cervenak László, Pál Gábor



Gál Péter
MTA TTK Enzimológiai Intézet



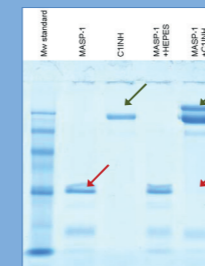
Cervenak László
Simmelweis Egyetem,
III. Sz. Belgyógyászati Klinika



Pál Gábor
ELTE TTK Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék

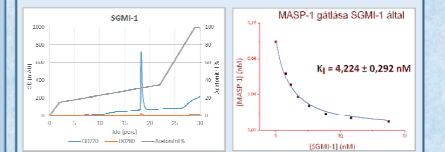


Bakteriális expressziós rendszerben nagy mennyiségű rekombináns (r)MASP-1 molekulát (CCP1/CCP2/SP fragmentumok) termeltünk, amelyről korábban bizonyítottuk, hogy az endotélsejtek egy natív, komplexben lévő MASP-1-hoz hasonlóan képes aktiválni. A rMASP-1-et renaturáltuk, több kromatográfiai lépésben tisztítottuk, majd ellenőriztük tisztaságát. A preparátum min. 95% rMASP-1-et tartalmazott. A sejtes tesztekben nem kívánatos bakteriális DNS szennyeződést nem tudtunk kimutatni a preparátumban. A minta aktivitását fluoreszcens szubsztrát hasítási tesztben ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy a rMASP-1 molekulák több mint 95%-a enzimátikusan aktív. Az aktivitást C1-inhibitor hozzáadásával is ellenőriztük, ugyanis csak az aktív rMASP-1 képes kovalens komplexet képezni ezzel a szerpin típusú, széles specifikitási szerin proteáz inhibitorral (ábra).



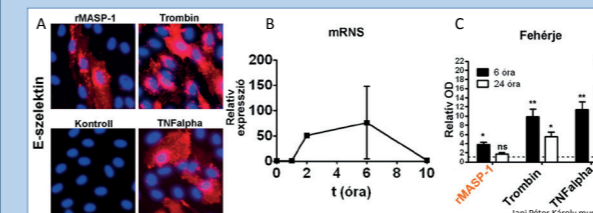
A Gál Péter munkacsoportja által előállított rMASP-1 preparátumot endotélsejt kultúrában teszteltük, és megállapítottuk, hogy minden paraméterében hasonlóan működik, mint a korábbi kooperációban használt minta. A rMASP-1 kiváltotta az intracelluláris Ca-mobilizációt és a CREB foszforilációt. Kimutattuk, hogy a rMASP-1 az E-szelektin kifejeződését szignifikánsan fokozta, míg az ICAM-2 molekulát gátolta. Ennek eredményeképpen a rMASP-1 kezelt endotélsejtekhez jobban kaptak a neutrofil granulociták, ami összegezve a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti új kapcsolattrendszert jelent. Kimutattuk, hogy a Pál Gábor munkacsoportja által kifejlesztett specifikus MASP-1 gátlószerek közül az egyik (SGMI-1) hatékonyan gátolta a rMASP-1 kiváltotta Ca-mobilizációt, az endotélsejtek megnövekedett permeabilitását és a citoskeleton átrendeződését. Ezeknek az eredményeknek a jelentőségét emeli, hogy az SGMI-1 nem toxikus az endotélsejtekre nézve, még a hatásos dózisonál jóval magasabb koncentrációban sem, ami előrevetítheti az *in vivo* alkalmazás lehetőségét.

Az általunk kifejlesztett monospecifikus MASP-1 inhibitor, a csupán 35 aminosavas, kompakt térszerkezetű SGMI-1 fehérjét rekombináns fúziós fehérjeként, bakteriális, citoplazmás expressziós rendszerben termeltük. A hisztidin címkét is tartalmazó fúziós fehérjét Ni-NTA oszlopon tisztítottuk. Ezután hisztidin címkét hordozó TEV proteáz általi limitált emésztéssel felszabadítottuk a fúziós fehérjéből az SGMI-1 egységet. Ezt követően a leválasztott, hisztidin címkés fúziós partnert, valamint a hisztidin címkés TEV proteáz egy újabb Ni-NTA oszlopon lépéssel távolítottuk el. Az ekkor már szinte csak SGMI-1 fehérjét tartalmazó mintát végül HPLC-n tisztítottuk homogén állapotúra. Az így kapott minta kémiai identitását tömegspektrometriával ellenőriztük. Az SGMI-1 funkcionális minőségét a MASP-1 enzim mérte egyensúlyi disszociációs állandó meghatározásán keresztül ellenőriztük fluoreszcens szubsztrát alapuló enzimgátlási esszében (ábra). A MASP-1 inhibitor mind tisztaság, mind gátlóképeség tekintetében tökéletesnek találtuk a sejtes esszében való felhasználásra.



Konklúzió

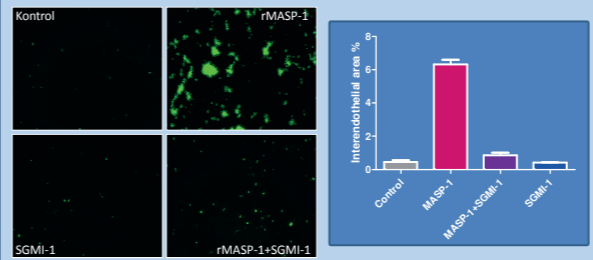
A MASP-1 olyan módon változtatja meg az endotélsejteken kifejeződő adhézios molekulák mintázatát, hogy az kedvez a leukociták (és ezen belül a neutrofil granulociták) kikapadásának. A komplementrendszer és a neutrofil granulociták ilyen módon történő összehangolt működése egy új gyulladásszabályozási mechanizmust jelent, amely résztvevője lehet a hatékony korai antimikrobiális védekezésnek. Ugyanakkor, a specifikus gátlószereink *in vitro* rendszerekben képesek gátolni a MASP-1 endotélsejtekre gyakorolt hatását, így amennyiben ez a gyulladási mechanizmus kórosan magas aktivitást mutat, akkor esélyes lehet az általunk kifejlesztett inhibitorral vagy ennek egy majdani, továbbfejlesztett változatával célzottan beavatkozni a folyamatba, ami potenciálisan egy új támadáspontú gyulladásgátló gyógyszerjelölt kifejlesztéséhez vezethet.



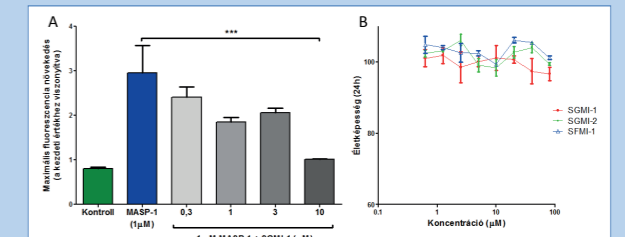
A MASP-1 a trombinhoz és a TNF α -hoz hasonlóan megnöveli az E-szelektin expresszióját humán köldökzsinór véna endotélsejteken (A, C). mRNS szinten a maximális hatás 2-6 óra között van (B).

Adhézios-molekula	mRNS	Fehérje	Hatás
P-szelektin	nr	-	-
E-szelektin	↑	↑	Fokozott gördülés
ICAM-1	-	-	-
ICAM-2	↓	↓	Adhézio gátlás csökkenése
VCAM-1	↑	-	Más aktivátorok hatását fokozza

A MASP-1 hatása az endotélsejtek adhéziosmolekula expressziójára.



A MASP-1 megnöveli az endotélsejtek permeabilitását, amelyet a zöld fluoreszcens festék (Streptavidin-Alexa488) biotinilált lemezhez való kötődése mutat. A hatást az SGMI-1 teljes mértékben visszاسzorította.



Az SGMI-1 hatékonyan gátolja a MASP-1 Ca-mobilizáló hatását endotélsejteken (A), de még az effektív dózis többszörösénél sem mutat citotoxikus reakciót (B).

Immunkomplexek által elindított gyulladásos folyamatok követésére alkalmas mikrofluidikai rendszer fejlesztése

A kooperáció lényege egy olyan komplex autonóm mikrofluidikai eszköz és immunológiai módszer kidolgozása, amely a gyulladásban központi szerepet játszó neutrofil granulociták aktivációjának mérésére alkalmas. A kooperáció a mérnöki, anyagmegmunkálási folyamatokat egyesíti a biológiai ismeretekkel: az MTA-TTK munkacsoportja a mikrotechnológiai tudást, az MTA-ELTE munkacsoport az immunológiai szakértelmet biztosítja az együttműködésben. A mikro- és biotechnológia eszközparkját innovatívan használva és fejlesztve, a hagyományos anyagszerkezetek köréből kilépve olyan komplex Lab-on-a-Chip rendszereket hozunk létre, amelyek integrálva alkalmazzák az érzékelő és mintapreparációs lehetőségeket.

Development of microfluidic system for tracking immune complex initiated inflammation

The specific aim of cooperation is the development of a complex autonomous microfluidic device and implementation of an immunological process that can be suitable for the measurement and activation of neutrophil granulocytes playing central role in inflammation. The proposed teamwork combines engineering and material processing with biological knowledge: the workgroup of HAS – Research Center for Natural Sciences provides the micromachining and microfluidic background, while the MTA-ELTE Immunology Research Group contributes the immunological expertise in the cooperation. Innovative application and development of micro and biotechnology devices, emerging from conventional material structures we develop such a complex Lab-on-a-chip system, which integrates the sensing and sample preparation possibilities.

Immunkomplexek által elindított gyulladásos folyamatok követésére alkalmas mikrofluidikai rendszer fejlesztése

Papp Krisztián¹ és Fürjes Péter²



Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program



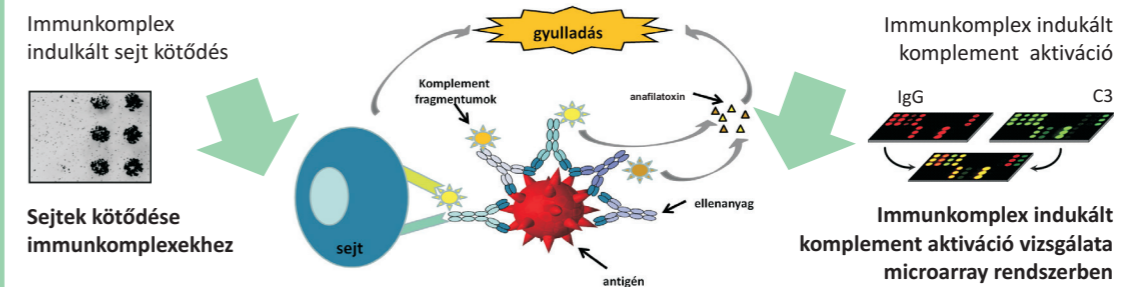
¹MTA-ELTE Immunológia Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Immunológia Tanszék
H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C.
immunologia.elte.hu, pkrisz5@gmail.com



²MTA Energetatudományi Kutatóközpont
Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet -
MEMS Laboratórium
H-1121 Budapest, Konkoly-Thege Miklós út 29-33.
www.mems.hu, furjes@mfa.kfki.hu

A vérben található antigén specifikus ellenanyagok mennyiségi és minőségi kimutatása

Antigén-ellenanyag kötődés által indukált effektor funkciók vizsgálata multiplex microarray rendszerekben



MTA-ELTE IKCS



Lab-on-a-Chip

A mikrofluidikai rendszer 2. verziójának layout terve, és az elkészített PDMS chip

IMMUNOLÓGIA

Dihydrorhodamine kezelt neutrofil granulocita kötődése immunkomplexhez

POZITÍV RA szérums minta - Peptid specifikus ellenanyagok

IgG1 IgG2 IgG3 IgG4 HCP2 VCP2

NEGATÍV RA szérums minta - Nincs benne peptid specifikus ellenanyag

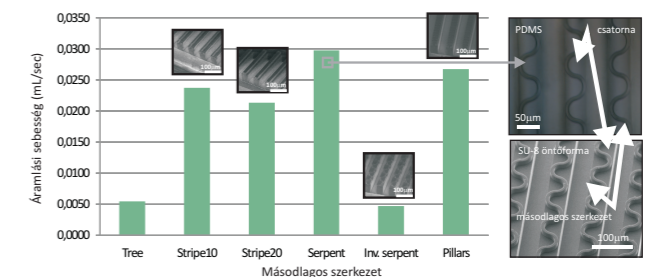
Kinyomtatott RA specifikus peptid antigének

SZINERGIA



Polimer (PDMS) alapú autonóm transzport-mikrofluidika

- bioinspirált kapilláris szerkezetek
- kontrollált vízszállítási sebesség és kapacitás mikrofluidikai rendszerekben, megfelelő felületmódosítás (pl. PDMS-b-PEO) és mikrostrukturálás kombinálásával



MTA EK MFA




Extracelluláris vezikulák és a komplementrendszer


A sejtek által nagy mennyiségben folyamatosan, illetve különböző stimulus hatására változó mennyiségben és összetételben termelt extracelluláris vezikulák (exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek) a sejten kívüli térbe kerülve kölcsönhatásba kerülnek a testszerte jelen lévő komplex fehérje hálózattal, a komplementrendszerrel. A projekt az extracelluláris vezikulák komplementet aktiváló képességének és a vezikulák felszínén megjelenő komplementet aktiváló és gátló molekulák vizsgálatával foglalkozik.

Extracellular vesicles and the complement system

Extracellular vesicles (exosomes, microvesicles and apoptotic bodies) are produced by cells constantly and in various amounts and composition upon diverse stimuli. When entering the extracellular space, extracellular vesicles come into contact with the complement system, a complex protein network that is present in body fluids. The project aims to study the capacity of extracellular vesicles to activate the complement system and to investigate the presence of complement activating and inhibiting molecules on the vesicles.





Extracelluláris vezikulák és a komplementrendszer



Dr. Józsi Mihály


Eötvös Loránd Tudományegyetem
Immunológiai Tanszék
MTA-ELTE „Lendület”
Komplement Kutatócsoport



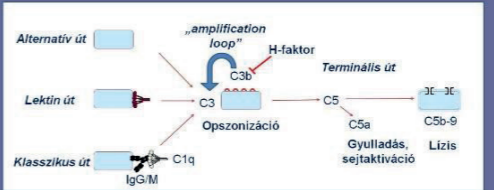


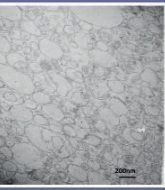
Dr. Buzás Edit

Semmelweis Egyetem
Genetikai, Sejt- és Immunológiai Intézet
Extracelluláris Vezikula Csoport

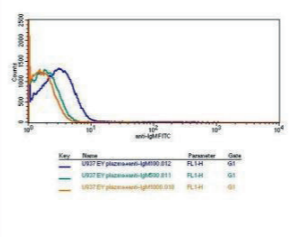


A sejtek által nagy mennyiségben folyamatosan, illetve különböző stimulus hatására változó mennyiségben és összetételben termelt extracelluláris vezikulák (exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek) a sejten kívüli térbe kerülve kölcsönhatásba kerülnek a testszerte jelen lévő komplex fehérje hálózattal, a komplementrendszerrel. A projekt az extracelluláris vezikulák komplementet aktiváló képességének és a vezikulák felszínén megjelenő komplementet aktiváló és gátló molekulák vizsgálatával foglalkozik.

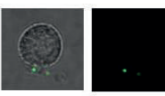
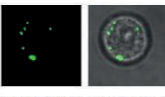




Komplementrendszert aktiváló immunglobulinok kimutatása mikrovezikulákon



Mikrovezikulák kötődése U937 monocitoid sejtekhez

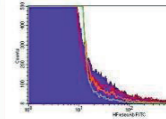
szérum kezelés nélkül

30-min szérum kezelés után

Zöld fluoreszcens festékkel jelölt mikrovezikulák kötődése U937 sejtekhez. A szérumkezelés következtében lerakódó faktorok fokozzák a mikrovezikulák sejtekhez való kötődését mikroszkópos és áramlási citometriás mérések eredménye szerint.

A komplement aktivációt szabályozó H-faktor kötődése U937-eredetű mikrovezikulákhoz

H-faktor kötődése szérumból az U937-eredetű mikrovezikulákhoz



Lila histogram: H-faktor kötődése a vezikulákhoz

Piros histogram: Triton X-100 lizálja a mikrovezikulákat, ami a vezikulákhoz való H-faktor kötődés specifikusságát igazolja

Narancssárga histogram: a detektáló ellenanyag kötődése

Világoskék histogram: a detektáló ellenanyag kötődése Triton X-100 kezelés után

A H-faktor kötődése az U937 sejtvonal eredetű mikrovezikulákhoz humán szérumból.

Tisztított H-faktor kötődése az U937-eredetű mikrovezikulákhoz

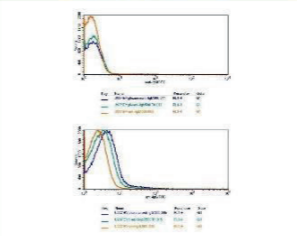
Triton X-100 nélkül

Tritonos lízis után


10 µg/ml H-faktor

2 µg/ml H-faktor

Szérum IgM kötődése



Szérum IgG kötődése



Összefoglalás

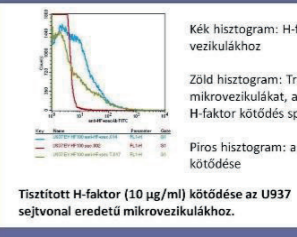
Eddigi eredményeink szerint a komplement rendszert aktiválni képes, tisztított IgM és IgG ellenanyagok képesek kötődni az extracelluláris vezikulák felületére.

Normál humán szérumból elsősorban IgG típusú ellenanyagok kötődése igazolható az extracelluláris vezikulák felületéhez.

Az extracelluláris vezikulákat kibocsátó U937 sejtek által expresszált CD59 és CD46 komplement szabályozó molekulák nem mutatkoztak ki az extracelluláris vezikulák felületén.

A szérumból igen kis mennyiségű H-faktor kötődik az extracelluláris vezikulák felületéhez. Ugyanakkor tisztított H-faktor esetében az extracelluláris vezikulák felületéhez való jelentős kötődés egyértelműen igazolható.

Tisztított H-faktor (10 µg/ml) kötődése az U937 sejtvonal eredetű mikrovezikulákhoz



Kék histogram: H-faktor kötődése a vezikulákhoz

Zöld histogram: Triton X-100 lizálja a mikrovezikulákat, ami a vezikulákhoz való H-faktor kötődés specifikusságát igazolja

Piros histogram: a detektáló ellenanyag kötődése

Fehérjekomplexek szerepe jelátviteli és karcinogenezis folyamatokban

A hazai fehérjetudomány kutatóinak széleskörű összefogásával elnyertük az első magyar BAG (Block Allocation Group) pályázatot, amely szinkrotron hozzáférést és kielégítő adatgyűjtési lehetőséget biztosít a hazai szerkezeti biológiai közösség számára (koordinátor Harmat Veronika, tudományos vezető Vértessy Beáta). A MediProt program támogatásával a jelátvitelben és karcinogenezisben fontos fehérjék szerkezeti és funkcionális szerepét vizsgálva felderítettük a foszforiláció mechanizmusát több komplex esetén. Sikeres kristályosítási és kristallográfiai kísérleteket folytattunk, számos új szerkezetet határoztunk meg (>10 új PDB depozit) és 12 folyóirat-cikkben közzé tettük meg a Program támogatását.

Protein complexes in signal transduction and carcinogenesis

Relying on a wide network of protein scientists within Hungary, we have submitted and have been awarded the first Hungarian BAG project grant for synchrotron access – this will provide us with ample possibilities for data collection during 2015 (coordinator: Veronika Harmat, lead scientist: Beáta G. Vértessy). As part of our MediProt program we have analyzed structural and functional characteristics of several protein complexes with key roles in signal transduction and carcinogenesis, and we have shed light on the mechanism of phosphorylation-driven regulations. We performed successful crystallization and crystallography experiments, have deposited >10 3D protein structure in the PDB, and have published twelve in silico articles acknowledging MediProt support.

Fehérjekomplexek szerepe jelátviteli és karcinogenezis folyamatokban

Buday László MTA TTK, Nyitrai László, ELTE TTK, Vértessy Beáta, BME VBK

Vértessy Beáta és munkacsoportja
Tudományterület: genom metabolizmus
Urucil a DNS-ben: élettani szerep, molekuláris mechanizmusok

A genomi integritásban fontos dNTPázok általános működési elvei

A reakciómechanizmust a nukleofil támadás pontos helye határozza meg.
Feltártuk ezen mechanizmus szerkezeti alapjait és evolúciós konzerváltságát.

Staphylococcus patogénitási sziget terjedésének mechanizmusa

A genomi integritástól függő új mechanizmust írtunk le, ami hasonlóságot mutat a HIV vírus terjedési mechanizmusával.
Lényeg: Csak az ep genommal rendelkező patogén elem adódik át

MediProt támogatás megköszönő cikkek

1. Bócsa G, Bócsa M, Fülöp B, Mihálkó M, Csizmadia M, Szegedi Z, Medvegyi M, Tóth I, Bányai Z, Buday L, Madarasi E, Budai M, Balczó B, Vértessy BG. Dynamics of re-orientation of the human nuclear proteome after cell division is regulated by Ndc80-associated phosphorylation. Cell Cycle. 2014;13(2):355-64. doi: 10.4161/cc.26142
2. Balczó B, Bócsa M, Balczó R, Vértessy BG. Factors influencing nucleocytoplasmic trafficking: which matter? Response to Aida & Bani' comment on Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dNTPase: structural and mechanistic insights. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014 Oct;10(10):2777-8. doi: 10.1107/S1399750114026203. Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25286863.
3. Nagy GN, Marton I, Coriart A, Oroszán O, Andrássy LM, Balczó R, Vértessy BG, Várhelyi FD, Völgyi M, Coriart R, Vértessy BG. Composite aromatic bases for enzymatic discrimination of exogenous cytosine substrates. Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Sep 15;53(37):10475-8. doi: 10.1002/ange.201408248. Epub 2014 Oct 5. PubMed PMID: 25287395.
4. Balczó B, Pálfi Z, Bócsa M, Horváth A, Scherl I, Benedek A, Nagy GN, Zupán L, Vértessy BG. Ndc80 copy number variation governs efficiency of nuclear import: case study on dNTPase. FEBS J. 2014 Dec;281(24):4643-58. doi: 10.1111/febs.13086. Epub 2014 Oct 25. PubMed PMID: 25283546.
5. Szabó R, Mihálkó M, Nagy GN, Várhelyi FD, Várhelyi A, Benedek A, Zupán L, Balczó B, Pálfi Z, Várhelyi M, Benedek R, Oroszán O, Várhelyi M, Balczó B, Vértessy BG. Highly potent dNTPase inhibition by a bacterial effector protein reveals a novel mechanism for gene expression control. Nucleic Acids Res. 2014 Oct 12;42(18):5912-20. doi: 10.1093/nar/nku282. Epub 2014 Oct 13. PubMed PMID: 25274751. PubMed Central PMCID: PMC4243751.
6. Nagy GN, Lovász L, Vértessy BG. Presynaptic DNA repair by controlling the cellular dNTPase/kinase ratio. FEBS J. 2014 Sep;281(18):4207-23. doi: 10.1111/febs.12941. Epub 2014 Aug 18. Review. PubMed PMID: 25020217.
7. Mihálkó M, Szabó R, Nagy GN, Törősi S, Dobosits P, Tóth I, Vértessy BG. Cross-specific inhibition of dNTPase via the Staphylococcus St protein perturbs dNTP pool and colony formation in Mycobacterium. DNA Repair (Amst). 2015 Jun;30:21-7. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.03.005.
8. Marton I, Nagy GN, Csizmadia M, Lőrincz A, Kőrösi A, Oroszán O, Várhelyi M, Vértessy BG. Structural mechanism for the Protein Kinase Phosphorylation of CHO dNTPase C-terminal histidine phosphorylation. PLoS One. 2015 Jun 17;10(6):e0129662. doi: 10.1371/journal.pone.0129662.
9. Horváth A, Balczó B, Mihálkó M, Lovász L, Vértessy BG. dNTPase regulation correlates with cell division potential in *Drosophila melanogaster*. FEBS J. 2015 May;282(10):1998-2013. doi: 10.1111/febs.13255.

BAG pályázat

- Első magyar ilyen pályázat – széleskörű összefogás (MTA TTK, ELTE, BME, Debrecen, Szeged (SZBK és SZE), Harmat Veronika)
- A házi forrástól a szinkrotronig
- Nyitrai László: első sikeres adatgyűjtések

Biostruct Laboratórium
www.biostruct.org
Kristályosítás és röntgenkristallográfia
Hő- és makromolekulák/komplexelek

BME CH épület
Biostruct Laboratórium
Budapest, 1135 Szt. Gellért tér 4
E-mail: vertessy@enzim.hu, leveles@enzim.hu

Nyitrai László és munkacsoportja
Tudományterület: biokémia / szerkezeti biológia
S100 Ca²⁺-kötő fehérjecsald PPI-k szerkezeti jellemzése

SZINERGIA

- Közös molekuláris érdeklődés
- Komplementer szakértelem
- Röntgenkristallográfia
- Közös BAG pályázat
- Sejt szintű vizsgálatok

Buday László és munkacsoportja
Tudományterület: jelátvitel

SH3 domének tirozin foszforilációján keresztüli megvalósuló regulációjának vizsgálata

- Fehérje-fehérje interakciók
- Lineáris kódomotívumok: «+»PxxP vagy «PxxP»
- Foszforiláció konzervált tirozin-oldalakon (Thomán, dB)

ANXA2 Tyr foszforiláció hatása az S100A4 kötődésre
EGYÜTTMŰKÖDÉS: Buday László és Vértessy Beáta

• S100A4-annexin A2 interakció → plazminogén aktiváció → sejtinvázió

• Szabályozás?

RSK1: a Ras-MAPK és a Ca²⁺-szignalizáció találkozási pontja?
EGYÜTTMŰKÖDÉS: Reményi Attila és Vértessy Beáta

- RSK1 egy MAPKAPK, azaz MAPK- (ERK1/2) aktivált kináz
- S100B Ca²⁺-kötő fehérje az RSK1 interakciós partnere
- S100B túltermelő melanoma sejtekben és *in vitro* az RSK1 foszforiláció gátlójaként

Ras-MAPK szignalizáció: ERK2 aktivál

Ca²⁺-szignál → S100B-kötés → ERK2 gátlás és RSK1 aktiválás (?)

ERK2-RSK1-komplex: Alexa, Gögl et al Reményi (2015) PNAS, PDB: 4NIF

S100B-RSK1 peptid komplex: Gögl, Alexa, Reményi, Nyitrai

MediProt támogatás megköszönő cikkek

1. Biri B, Kiss R, Kóczy R, Schöszner G, Láng D, Köhdel L, Földes L, and Nyitrai L. Metastasis-associated S100A4 is a specific amino donor and an activity-independent binding partner of phosphatidase-2. Biochem J. Oct 20, 2015. DOI: 10.1042/BJO20150843
2. Gögl G, Alexa A, Kiss R, Kóczy R, Kovács M, Reményi A, Nyitrai L. Structural basis of RSK1 inhibition by S100B: modulation of the ERK signaling cascade in a calcium-dependent way. J. Biol. Chem., in press

Céltitűzés: A tirozin-foszforiláció SH3 doménekre gyakorolt hatásainak jellemzése

Rekombináns fehérje expresszió

SH3 domének:	Kináz domének:
• EphB1	• EphB1
• Src	• EGFR
• Abl1	• FOSFR
• Abl2	• Abl1
• Adapter fehérjék:	• Hck
• Grb2	• Grb2
• Shc	• Shc
• Aktívfehérjék:	• Csk1

Életpéldák: *in vitro* foszforiláció

Foszforilációs helyek azonosítása (Tömegspektrometria)

Azonosított foszforilációs helyek (EphB1 kináz)

Abl1_SH3 és 2p-Abl1_SH3 titrálása 3BP1 peptiddel (Triptofán-fluoreszcencia)

EGYÜTTMŰKÖDÉSEK:

- Nyitrai László - ANXA2 Tyr foszforiláció EphB1 kinázzal
- Vértessy Beáta - Fehérje kristallográfia és Röntgen-diffrakció

MediProt támogatás megköszönő cikkek:

Csiba A, Fekete A, Bögl G, Horváth Z, Szele A, Csiki L, Lőrincz K, Pesti S, Geiszt M, Buday G. Accumulation of the Pademan mutant Frank ter Haar syndrome protein T34 in aggregates. Cell Commun and Signaling. 2015. 13:33

Kalmodulin és az ér-reaktivásban fontos eNOS és MLCK enzimek kölcsönhatásának szabályozása szfingolipid mediátorokkal

Előzetes eredményeink szerint a szfingozin gátolja az erek tónusának és permeabilitásának szabályozásában kiemelt jelentőségű endotheliális nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) enzim aktivitását, mégpedig azért, hogy a kalmodulinhoz (CaM) kötődve gátolja a két fehérje interakcióját, ami az eNOS aktiválódásának alapfeltétele. Munkahipotézisünk szerint a szfingozin és más szfingolipid mediátorok gyulladásozó folyamatokban kiváltott érhataásainak egy része a Ca²⁺-CaM által szabályozott enzimek aktivitásának közvetlen befolyásolásával jön létre. Ezen enzimek közül az eNOS és az érsimaizom kontrakcióját vezérlő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) működésének szfingolipidek (szfingozin, szfinganin, C2-ceramid és C16-ceramid) által történő szabályozásának molekuláris mechanizmusait vizsgáltuk a MedInProt projekt keretében. Megmutattuk, hogy a szfingozin ex vivo aorta-szegmenseken is gátolja az eNOS aktivitását, illetve a szfingozin és analógjai gátolják az MLCK enzimet, míg a vizsgált ceramidok hatástalanok.

The regulation of interactions between calmodulin and the important vasomodulator enzymes eNOS and MLCK via sphingolipid mediators

In preliminary experiments we found that sphingosine inhibits endothelial nitric oxide synthetase (eNOS), a key enzyme regulating the tone and permeability of vasculature, due to its binding to calmodulin (CaM), thereby preventing the interaction of the two proteins, which is the basis for the activation of eNOS. We hypothesize that a portion of the vascular effects of sphingosine and related sphingolipid mediators in inflammation is due to their direct influence on the activity of Ca²⁺-CaM-dependent enzymes. In the MedInProt project, we have investigated the molecular mechanisms of regulations elicited by the sphingolipids sphingosine, sphinganine, C2-ceramide, and C16-ceramide on two of such enzymes, eNOS and myosin light-chain kinase (MLCK), which controls the contraction of vascular smooth muscle cells. We showed that sphingosine also inhibits eNOS activity in ex vivo aortic segments, as well as sphingosine and its analogs inhibit MLCK, while the examined ceramides are without effects.

Kalmodulin és az ér-reaktivásban fontos eNOS és MLCK enzimek kölcsönhatásának szabályozása szfingolipid mediátorokkal



Benyó Zoltán
Semmelweis Egyetem
Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet



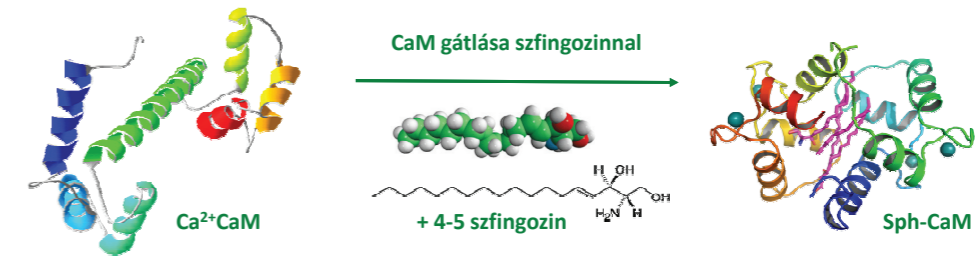
MEDINPROT



Liliom Károly
MTA Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet

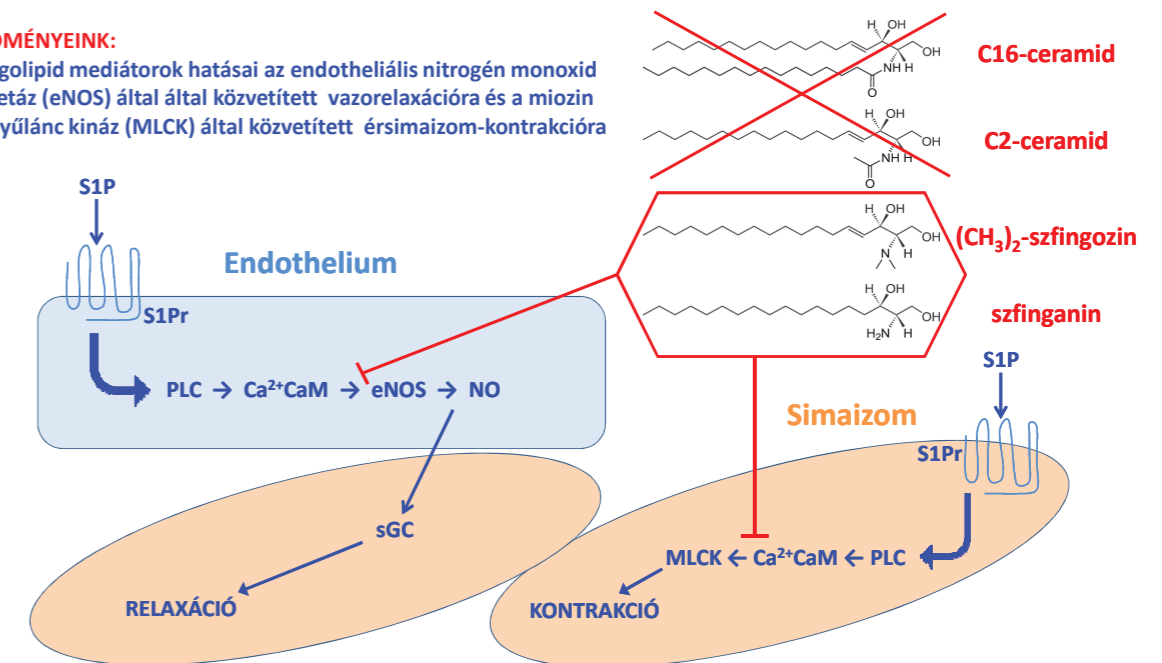
Munkacsoportunk elsősorban a vérkeringési rendszer élettani folyamatait és azoknak kórállapotokban történő elváltozásait kutatja. Transzgenikus egérmodellek segítségével törekszünk az erek jelátviteli folyamataiban szerepet játszó molekulák élettani és kóreltani funkcióit azonosítani. Egyik kiemelt kutatási irányunk a lizofoszfolipid mediátorok érhataásainak, azok molekuláris mechanizmusainak tisztázása. Új kutatási projektünk a „Szfingolipid mediátorok érhataásai”, mely szorosan kapcsolódik a jelen pályázat tematikájához, azzal a különbséggel, hogy míg az OTKA projekt elsősorban a szfingozin-1-foszfát sejt felszíni receptorain keresztül kifejtett érhataásokat vizsgálja, addig a MedInProt pályázatban az intracelluláris támadáspontú szfingolipid mediátorok vizsgálatát végezzük.

Fő kutatási területünk a korábban elsődleges hívívóként számon tartott lizofoszfolipid mediátorok (lizofoszfátid, ceramid, szfingozin (Sph), szfingozin-1-foszfát (S1P) és szfingozil-foszforil-kolin (SPC)) intracelluláris hatáásainak azonosítása. Az S1P és az SPC által kiváltott receptor-független intracelluláris kalcium jelek vizsgálata során azonosítottuk az SPC-t, mint a kalmodulin (CaM) endogén gátlószert – eddig fiziológiai körülmények között ható intracelluláris gátló molekula nem volt ismert. Megmutattuk, hogy a szfingozin is képes a kalmodulinhoz kötődni és gátolni annak aktivitását. *in vitro* CD- és fluoreszcencia spektroszkópiai, izotermális titrációs kalorimetriai és kvarckristály-mikromérleg kötődési kísérleteken túl sikeresen meghatároztuk Sph-CaM a komplex kristályszerkezetét.



EREDMÉNYEINK:

Szfingolipid mediátorok hatáásai az endotheliális nitrogén monoxid szintetáz (eNOS) által közvetített vazorelaxációra és a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) által közvetített érsimaizom-kontrakcióra



A kutatócsoportok tematikai és metodikai szinergizmusa segítségével analizáltuk a CaM szfingozin-általi *in vitro* felismert gátlásának *in vivo* relevanciáját és vizsgáljuk az élettanilag jelentős rokon szfingolipid vegyületek hatáását az értónus szabályozására. A MedInProt pályázatunk keretében megmutattuk, hogy a szfingozin *ex vivo* aorta-szegmenseken is gátolja az eNOS kalmodulin-függő aktivitását. *In vitro* kísérleteinkben a szfingozin, szfinganin és dimetil-szfingozin gátolta az MLCK aktivitását, míg a C2-, C8- és C16-ceramid hatástalannak mutatkozott. További kísérleteinkben a szfinganin és dimetil-szfingozin érhataásait fogjuk vizsgálni.

Jelátviteli fehérjék szerepe daganatos sejtek mozgásában

Előállítottunk olyan sejtklónokat a HCA7 vastagbélrák sejtvonalból, amely a KRAS fehérje vad típusú illetve G12V allélspecifikus mutáns változatát expresszálják. A sejtek mozgását nagysűrűségű tenyészetekben tanulmányoztuk. Előzetes adataink arra utalnak, hogy a mutáns KRAS megváltoztatja a sejtek adhéziós tulajdonságait, ami hozzájárulhat a klinikailag megfigyelt KRAS-mutációhoz köthető szervspecifikus áttétképzési különbségekhez.

How do signal transduction proteins modulate the motility of tumor cells?

We established 3 clones from the HCA7 colon cancer cell line that express either the wild-type or one specific mutant version (G12V) of the KRAS oncogene. The collective motility of these clones were studied using high density cell cultures. Our preliminary data indicate that KRAS mutant cells have a distinct cell adhesion phenotype which may contribute to the clinically observed KRAS-mutation related differences during the organ-specific metastasis formation.

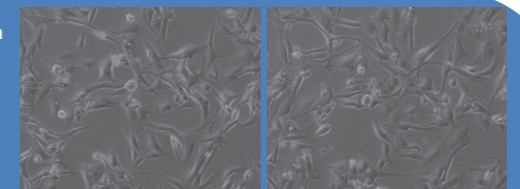
JELÁTVITELI FEHÉRJÉK SZEREPE DAGANATOS MEGBETEGEDÉSEKBE

Lakatos Dóra, Hegedűs Balázs, László Viktória, Garay Tamás, Döme Balázs, Timár József, Czírók András



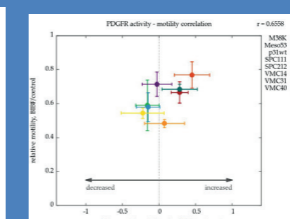
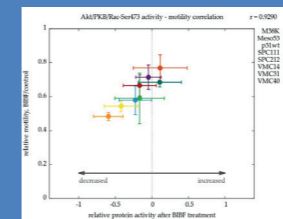
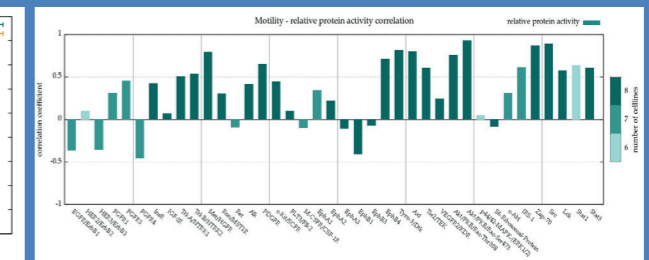
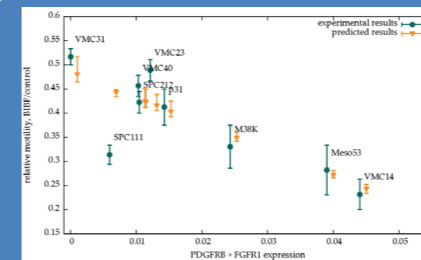
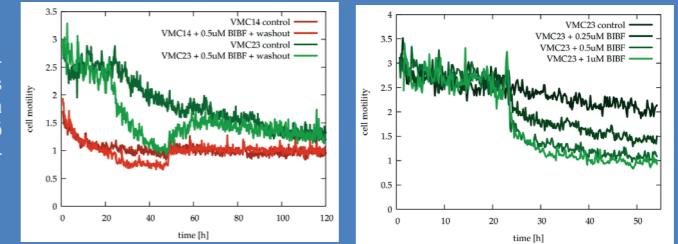
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Fizika Tanszék
Czírók András
aczirok@gmail.com

A MedinProt pályázatban érintett kutatási terület: videomikroszkópos felvételek elemzése során a sejtmozgások térbeli és időbeli korrelációinak vizsgálata valamint a sejtmozgás számítógépes modellezése.



Számos, humán műtéti anyagból izolált mesothelióma sejtvonalon rögzítettük a sejtekre jellemző (kezeletlen, balra) és Nintedanib (BIBF, jobbra) kezelés hatására kialakuló sejtmozgási aktivitást.

A mikroszkópos felvételek analízise egy sejtvonal-specifikus, dóziszfüggő, reverzibilis hatásra utal, ami jól látható a sejtek átlagsebességét az idő függvényében ábrázoló grafikonokon.

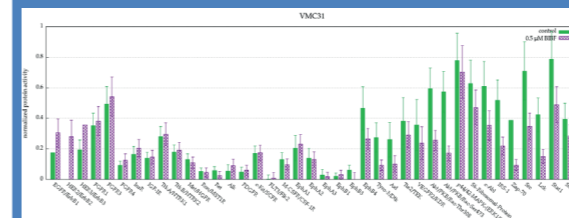


A sejtmozgás változását a kináz expresszió és aktivitás adataival összevetve megállapíthatjuk, hogy a Nintedanib sejtmozgásra gyakorolt hatása kisebb az FGFRB és FGFR1 receptorokat kifejező sejtvonalakban. A Nintedanib kezelés hatására bekövetkező immobilizáció mértéke jelentős mértékű korrelációt mutat számos kináz aktivitásában bekövetkezett változással. Ezeket a statisztikai elemzéseket ki fogjuk egészíteni a jelátviteli útvonalak sztochasztikus modellezésével, amitől a Nintedanib hatásmechanizmusának jobb megértését várjuk.

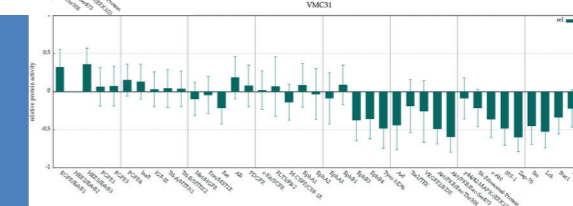


Semmelweis Egyetem
II. Sz. Patológiai Intézet
Timár József
jtimar@korb2.sote.hu

A MedinProt pályázatban érintett kutatási terület: Egy új hatóanyag, a Nintedanib hatására bekövetkezett kinázaktivitás változás meghatározása.



Számos, humán műtéti anyagból izolált mesothelióma sejtvonalon meghatároztuk a sejtekre jellemző (kezeletlen) és Nintedanib (BIBF) kezelés hatására kialakuló kinázaktivitási mintázatot. Az ábrák egy, a kezelésre jól válaszoló sejtvonalban megfigyelhető változásokat mutatják.



TP53 mutációk és az energiaháztartás összekapcsolása emlőtumorban

A rosszindulatú tumorok újabb jellemzői között a kromoszómális instabilitást, az immunválaszt, a gyulladást és az energiaháztartás változásait írták le. Ezek közül az energiaháztartás olyan molekuláris változásokat tartalmaz, amelyek a sejteket az aerob glikolízis irányába tolják el. Kutatásaink során a tumorokban legtöbb mutációt tartalmazó TP53 tumorszuppresszor gén és a metabolizmus kapcsolatát vizsgáltuk. In silico számításokkal és in vitro kísérletekkel bemutattuk, hogy a TP53 mutációja az energiaháztartást több szinten is befolyásolhatja. Eredményeink kiemelik, hogy az egyes kulcsgének mutációs változásához különböző jellemzők szinergisztikus aktiválódása kapcsolódik.

Linking TP53 mutation to energy metabolism in breast cancer

Promising new hallmarks of cancer include chromosomal instability, immune response, inflammation and alteration of energy metabolism. Of these, energy metabolism involves molecular mechanisms shifting cancer cells to aerobic glycolysis. Our goal was to evaluate the correlation between mutations of TP53, the most commonly mutated tumor suppressor gene and metabolism. By using in silico and in vitro experiments, we show that TP53 mutation influences energy metabolism at multiple levels. Our results underpin the synergistic activation of multiple hallmarks linking to these the mutation status of key driver genes.

TP53 mutációk és az energiaháztartás összekapcsolása emlő tumorban



Harami-Papp Hajnalka¹, Horvath Gergő², M. Nagy Ádám², Ambrus Attila², Hauser Péter³, Tretter Laszló², Györfly Balázs¹

¹ MTA TTK Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Budapest, ² Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, Budapest, ³ Semmelweis Egyetem, II. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest



Bevezetés

Tumor progressziót segítő jellemzők: 1. Genom instabilitás 2. Immunválasz elkerülése 3. Gyulladás 4. Megváltozott anyagcsere

Warburg effektus: tumor sejtekben megnő az aerob glikolízis aránya

Daganatok >50%-ra jellemző a tumorszuppresszor TP53 gén mutációja, mely bizonyítottan szerepet játszik a tumor progresszióban.

VIZSGÁLAT CÉLJA: TP53 mutáns és vad típusú emlő tumor sejtvonalak metabolikus összehasonlítása. Olyan, a sejt energiaháztartásában szerepet játszó gének azonosítása, melyekre hatással van a TP53 gén mutációja.

Módszerek

In silico elemzés:
1. TCGA (The Cancer Genome Atlas) adatbázisból emlő tumoros betegek gén expressziós mintázatait, és újgenerációs szekvenálás adatainak feldolgozása. (Kép 1.)

2. Normál TP53 (wtTP53) és mutáns TP53 (mutTP53) közötti gén expressziós mintázatbeli különbséget ROC analízissel állapítottuk meg. Szignifikancia küszöb: 0,7<AUC és 0,05<p.

In vitro vizsgálatok:
1. TP53 mutáció validálása három emlő tumor sejtvonalon PCR-rel és Sanger szekvenálással
2. wtTP53 és mutTP53 sejtvonalak mitokondriális és glikolitikus aktivitásának mérését mikrofluoriméterrel, metabolikus inhibitorok jelenlétében.

Eredmények

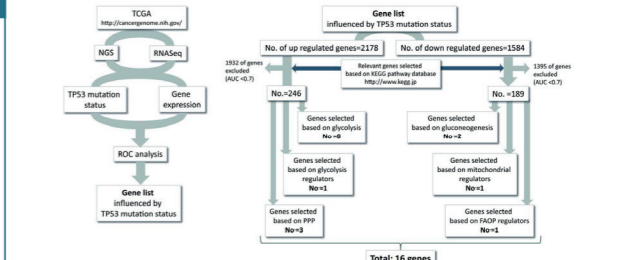
In silico elemzés eredményei:
1. TP53 mutáció által befolyásolt metabolikus gének (Kép 1.)
2. Ezen gének expressziója szignifikánsan eltér a wtTP53 és mutTP53 betegek transzkriptomjában (példa gének Kép 2.).

In vitro eredmények:
1. Három emlő tumor sejtvonal TP53 státusza (Kép 3.): MCF-7^{wt}, MDA-MB-231^{mut}, JIMT-1^{mut}
2. Mitokondriális O₂ felvétel mérése (OCR) (Kép 4.)
- Alap O₂ felvétel MCF-7^{wt} > MDA-MB-231^{mut} és JIMT-1^{mut} (Kép 4. A). Legmagasabb mitokondriális aktivitás: MCF-7^{wt} (Kép 4. B)
- Glukóz hozzáadásakor oxigén fogyasztás csökkenés, mutTP53 > wtTP53 mértékben (Kép 4. B és E)
3. Extra celluláris pH változás mérése (ECAR) (Kép 4.)
- MCF-7^{wt} alap savképzése > MDA-MB-231^{mut} és JIMT-1^{mut} (Kép 4. C).
- Glukóz hozzáadásakor mutTP53 sejtvonalak savképzése > mint a wtTP53 sejtvonalé (Kép 4.F). Legnagyobb mértékű savképzés a JIMT-1^{mut} esetében.

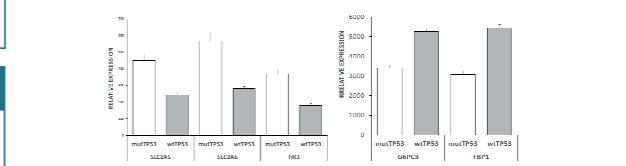
Következtetés

A tumorokban legtöbb mutációt tartalmazó TP53 tumorszuppresszor gén és a metabolizmus kapcsolatát vizsgáltuk. A TP53 mutációja az energiaháztartást több szinten is befolyásolhatja, ezáltal különböző tumor-jellemzők szinergisztikus aktiválódását okozhatja.

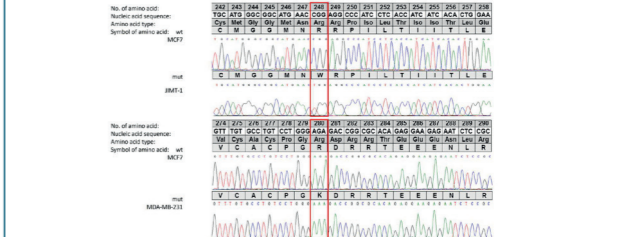
Kép 1. In silico elemzés összefoglalja



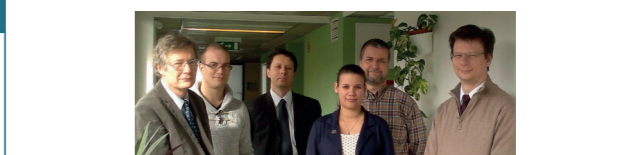
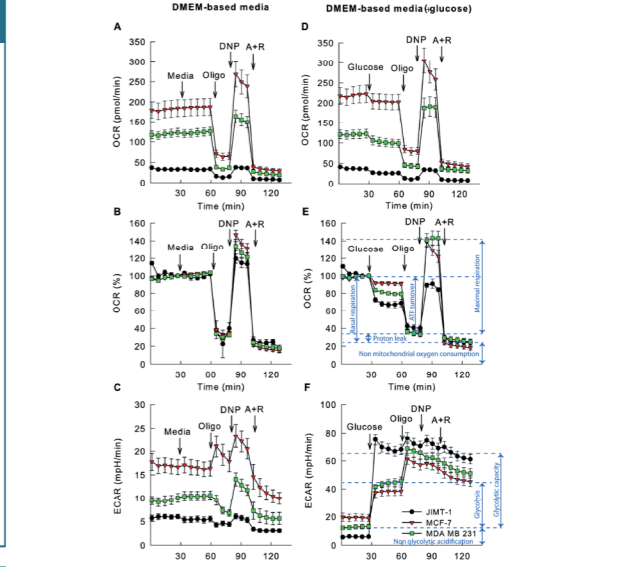
Kép 2. Metabolikus gének expressziója mutTP53 és wtTP53 betegek emlő tumor mintáiban



Kép 3. TP53 mutáció a három emlő tumor sejtvonalban



Kép 4. Metabolikus paraméterek meghatározása Seahorse XF96 extra celluláris flux analízissel



A párválasztás fontossága. A podocin-dimerizáció jótékony és káros hatása a membrán-lokalizációra

Kimutattuk, hogy a p.F344Lfs*4 mutáns podocin intracelluláris elhelyezkedése endocytosis következménye, ugyanis az endocytosis gátlását követően megjelenik a sejtmembránban.

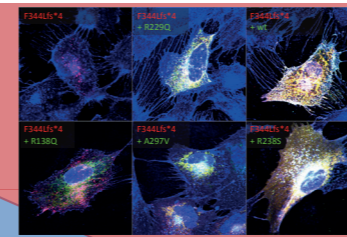
Ezt a hatást más membrán-asszociált podocinnal való együttes expresszió is biztosítani tudja, ami arra utal, hogy a podocin-oligomer részeként stabilizálódhat a sejtmembránban. A különböző pontmutációk (A284V, A297V, V290M) és a vad típusú fehérje coiled-coil doménjének stabilitásvizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a mutációk jelentős hőstabilitás-csökkenést okoznak.

Ugyanezen mutációk szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából a megfelelő GST-vel fuzionált fehérjedomének kristályosítási kísérleteit végezzük.

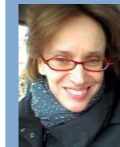
Importance of mate-selection. Beneficial and harmful effect of podocin-dimerization on its membrane-localization

We found the p.F344Lfs*4 podocin to be mislocalized within cytoplasmic compartments and showed that this is secondary to its internalization, as by inhibiting endocytosis it appears in the cell membrane. Interestingly, coexpression of different membranous podocin variants also made the p.F344Lfs*4 podocin membranous, suggesting that it can be stabilized in the membrane as part of a podocin oligomer. Our study on coiled-coil domains of point mutant (A284V, A297V, V290M) and wild type forms of podocin revealed that mutation caused significant decrease of thermal stability. GST-fused domains of these are currently under crystallization for subsequent structural studies.

A párválasztás fontossága - A podocin-dimerizáció jótékony és káros hatása a membrán-lokalizációra



Kimutattuk, hogy a C-terminális trunkáns podocinok (F344Lfs*4, F344*, L346Yfs*2) intracelluláris elhelyezkedése endocitózis következménye, ugyanis az endocitózis gátlását követően ezen mutáns podocinok megjelennek a sejtmembránban. Ezen hatást más membrán-elhelyezkedésű vad vagy akár mutáns podocinnal való együttes expresszió is biztosítani tudja, ami arra utal, hogy a podocin-oligomer részeként stabilizálódhatnak a sejtmembránban.



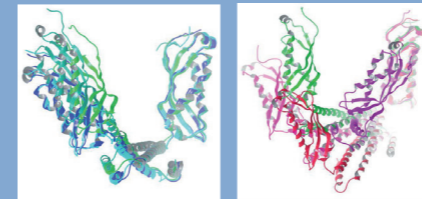
Karancsiné Menyhárd Dóra
MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport



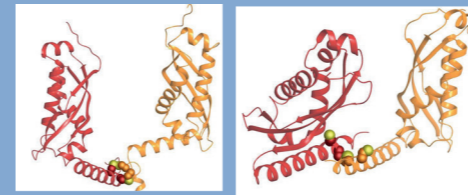
Tóty Kálmán
(SE, I. sz. Gyermekklinika)

A dimer-asszociációk szerkezetének modellezése

A podocin dimer alapú oligomerek formájában aktív. Eredményeink arra utalnak, hogy a patogén mutációk módosult szerkezetű és stabilitású dimer-párokat eredményeznek.



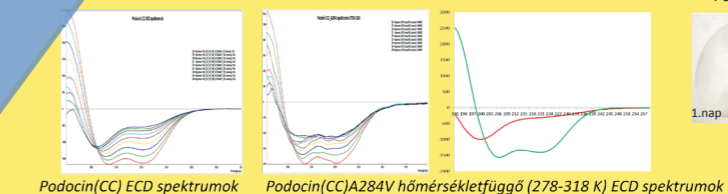
Ártalmatlan és patogén misszensz mutációk hatása a podocin dimer szerkezetére



Kettő, illetve egy diszulfid-híd rögzítette kovalens dimer-párok az R286Tfs*17 variáns esetében

Az R286Tfs*17 frameshift mutáció szerkezeti hatásának vizsgálata

Ez a variáns sem a WT podocin sem az R229Q polimorf módosulat membrán-lokalizációját nem változtatja meg, ezért feltételezéseink szerint igen stabil homo-dimereket alkothat. Megvizsgáltuk, annak eshetőségét, hogy diszulfid-híddal kapcsolt párok alakulnak ki – a modellezés eredményei alapján, Cys→Ser mutánsok létrehozását tervezzük, hogy kísérletileg is igazoljuk ezen kapcsolatok jelentőségét.



Podocin(CC) ECD spektrumok Podocin(CC)A284V hőmérsékletfüggő (278-318 K) ECD spektrumok

A podocin a vese glomerális filtrációs rendszerének fontos alkotóeleme. Mutációi autoszomális recesszíven öröklődő nefrózist okoznak. Korábban kimutattuk, hogy a két allél mutációjának interakciói – kóros heterodimerek létrejötté révén – döntő szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. Jelen munka során egy ezzel ellentétes hatást vizsgálunk. Bizonyos C-terminális trunkáns mutációk podocin-internalizáció okozó hatásait más membrán-lokalizált mutációk együttes expressziója gátolni képes, arra utalva, hogy az oligomerizáció a korábban megfigyelt káros hatásával szemben stabilizáló, komplementáló szereppel is bírhat. Ezen hatások megértéséhez a podocin oligomerizációját befolyásoló szerkezeti hatásokat vizsgáljuk, melynek során sikerült a podocin C-terminális régióját a kristályosításhoz szükséges mennyiségben előállítani. Jelenleg a kristályosításon dolgozunk.

A coiled-coil domének vizsgálata ECD- és NMR-spektroszkópiával

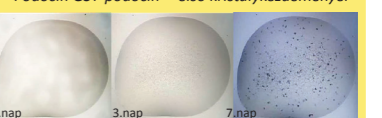
A kísérletsorozat célja, hogy ECD spektroszkópiával és DOSY mérésekkel megállapítsuk a coiled-coil (CC) domén kölcsönhatások erősségét a mutációk függvényében.

A különböző pontmutációk (A284V, A297V, V290M) és a vad típusú fehérje coiled-coil doménjének stabilitásvizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a mutációk jelentős hőstabilitás-csökkenést okoznak. Ezen mutációk szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából a megfelelő GST-vel fuzionált fehérjedomének kristályosítási kísérleteit végezzük.



Harmat Veronika Stráner Pál Kiss-Szemán Anna
ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium
MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

Podocin GST-podocin^{WT} első kristálykezdményei



1.nap 3.nap 7.nap

Humán Organikus Anion Transzporter Polipeptidek vizsgálata: új inhibitorok/szubsztrátok azonosítása

Az Organikus Anion Transzporter Polipeptid (OATP) család tagjai amellett, hogy részt vesznek a sejtek hormonfelvételében, számos gyógyszert (például tumor- vagy gyulladásellenes szereket) is transzportálnak, ezáltal befolyásolják azok *in vivo* hatékonyságát. Jelen kutatás keretében elsőként sikerült kidolgoznunk egy funkcionális esszét a teljes humán OATP család vizsgálatára.

Az együttműködésünk eredményeként, az új esszé és bioinformatikai módszerek kombinálásával új potenciális OATP inhibitorokat/szubsztrátokat azonosítottunk.

Members of the Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs) family that mediate the uptake of large, amphipathic or negatively charged molecules into the cells, are important determinants of drug pharmacokinetics. In the frame of the present collaboration, we managed to set up a novel functional assay for the investigation of entire human OATP family. In addition, by combining this *in vitro* assay with *in silico* methods we identified several new OATP- inhibitor/ substrate interactions.

Daganatos és gyulladásos folyamatokban szerepet játszó Organikus Anion Transzporter Polipeptidek *in silico* és *in vitro* jellemzése Szinergia II.



A humán Organikus Anion Transzporter Polipeptidek (OATP-k)

- Plazmamembrán „uptake” transzporterek
- Előfordulnak a vékonybélben, májban, vesében és a vérégy gátban
- Számos gyógyszer sejtekbe történő felvételét elősegítik, ezáltal működésük befolyásolja tumor-ellenes szereket, sztatintokat, gyulladás ellenes molekulák hatékonyságát
- Több OATP megnövekedett expressziót mutat tumorokban
- OATP polimorf változatokat összefüggésbe hoztak gyulladásos bélbetegség kialakulásával

AZ EGYÜTTMŰKÖDÉS CÉLJA

a két kutatócsoport bioinformatikai és kísérletes tapasztalatainak összekapcsolásával az OATP-k működésének jobb megértése:

1. *in vitro* esszé kidolgozása, amelyek segítségével OATP-vegyület kölcsönhatások tesztelhetők.
2. OATP szubsztrát/inhibitor adatbázis létrehozása az eddig leírt szubsztrátok, adatbázisokban elérhető adatok kinyerése és elemzése alapján.
3. szerkezet-függés vizsgálatok: szerkezeti modell és mutáns konstrukciók készítése
4. adatbázisokból kiválasztott olyan fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozása, amelyek fontosak lehetnek OATP fehérjék szabályozásában

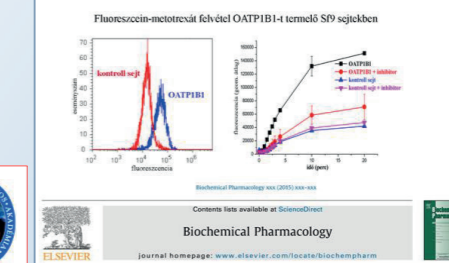


Hegedűs Tamás
MTA-SE
Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport
Jelen projektben való részvétel:

- Organikus Anion Transzporter Polipeptidek szerkezeti modelljének elkészítése,
- OATP szubsztrát/inhibitor adatbázis létrehozása,
- Szabályozó mechanizmusok azonosítása *in silico*.

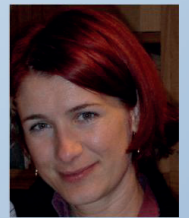
EREDMÉNYEK

I. Funkcionális esszé kidolgozása



Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate

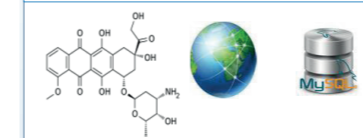
Isabella Páti¹, Daniella Kovács¹, Orsolya Németh¹, Melinda Gerz¹, Csörgő Várady², Bruno Steiger³, Bruno Hagenbuch⁴, Gergely Szakács⁵, Csilla Orszégy-Laczka⁶



Laczka Csilla
MTA TTK
Membrán fehérje
kutatócsoport
Kutatási terület:
Humán Organikus Anion
Transzporter Polipeptidek
in vitro vizsgálata

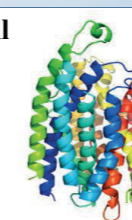
II. OATP szubsztrát adatbázis

Adatbányászat
DrugBank és PubChem adatbázisokból

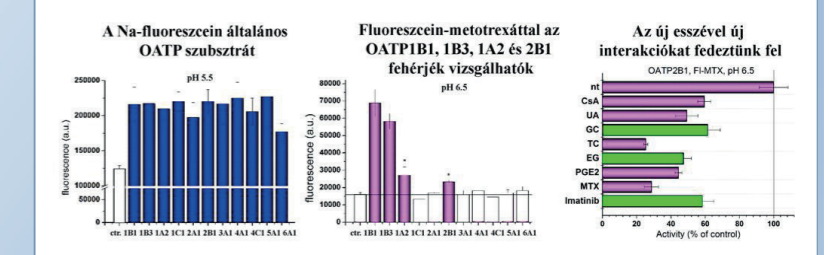


V. Szerkezeti modell

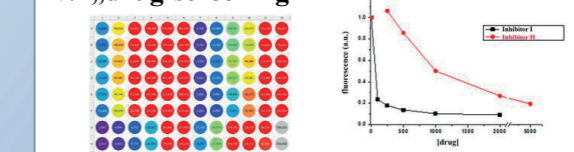
- Modellépítés különböző módszerekkel,
- a legmegfelelőbb modell kiválasztása molekuláris dinamika segítségével,
- a TMFoldWeb (Kozma és Tusnády 2015) felhasználásával készült OATP1B1 modell alapján a többi OATP szerkezeti modelljének elkészítése megtörtént.



III. ÚJ INTERAKCIÓK



IV. „drug-screening”



VI. Mutációk komparatív elemzése

- Elvégeztük OATP és rokon SLC családok mutációinak szemi-automatikus összegyűjtését cikkekben,
- Jósoltuk aminosav pozíciók működésben betöltött szerepét homológ fehérjék mutációi segítségével.

További tervek:
Mutációk tervezése
és *in vitro* jellemzése



Támogatások:
NKFIH/OTKA K 111678 (H. T.) és K 109423 (L. Cs.)

Fehérje kinázok 4D-ben

Molekuláris dinamikai számítások segítségével atomi szinten feltérképeztük fehérje kinázokból felépülő jelátviteli komplexek atomi szintű mozgásait, valamint az ERK2-RSK1 és Cbk1-Mob2 komplexek kristályszerkezeteire építve bemutattuk a katalitikus komplex, a sejt-növekedési pálya univerzálisan fontos kapcsolóállomása összeépülését. Feltártuk, hogy koaktivátor fehérjék (pl. Mob2) miként szabályozzák az NDR/LATS (pl. Cbk1) kinázok aktivitását. A komplexképződések mechanizmusának finomításához módszereket dolgoztunk ki és validáltunk a fehérjék szabad felszínére, valamint a komplexek interfész régiói hidrát szerkezetének számítására.

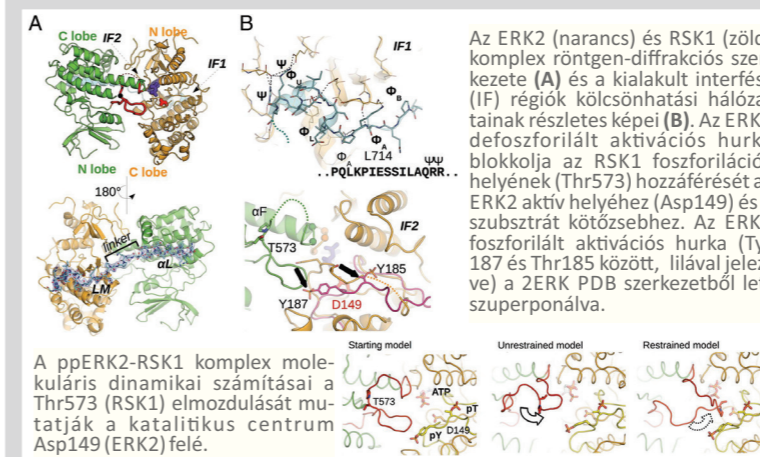
Protein kinases in 4D

We mapped the atomic motions of protein complexes of protein kinases relevant in signaling by molecular dynamics calculations, and based on the crystallographic structure of complexes ERK2-RSK1 and Cbk1-Mob2, we could follow the assembly of a cellular growth promoting molecular switch. We also demonstrated how co-activator protein (Mob2) binding to an NDR/LATS kinase (Cbk1) exerts allosteric control on the activity of a unique group of protein kinases. To refine the mechanisms of complex formations, methods were elaborated for calculation of hydration structures of free protein surfaces and complex interfaces.

Fehérje kinázok 4D-ben

Hetényi Csaba¹, Reményi Attila²

¹MTA-ELTE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport, Budapest
²MTA Természettudományi Kutatóközpont, Budapest

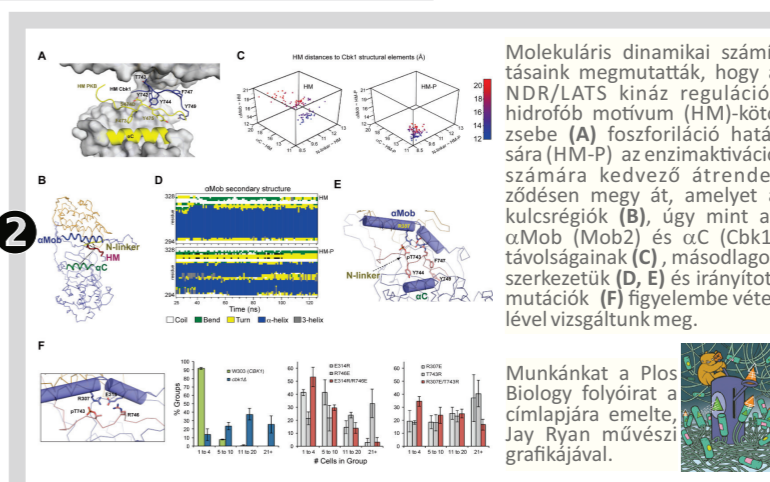


A ppERK2-RSK1 komplex molekuláris dinamikai számításai a Thr573 (RSK1) elmozdulását mutatják a katalitikus centrum Asp149 (ERK2) felé.

Az ERK2 (narancs) és RSK1 (zöld) komplex röntgen-diffrakciós szerkezete (A) és a kialakult interfész (IF) régiók kölcsönhatási hálózatának részletes képe (B). Az ERK2 defoszforilált aktivációs hurka blokkolja az RSK1 foszforilációs helyének (Thr573) hozzáférést az ERK2 aktív helyéhez (Asp149) és a szubsztát kötőzsebéhez. Az ERK2 foszforilált aktivációs hurka (Tyr 187 és Thr185 között, lilával jelezve) a 2ERK PDB szerkezetből lett szuperponálva.

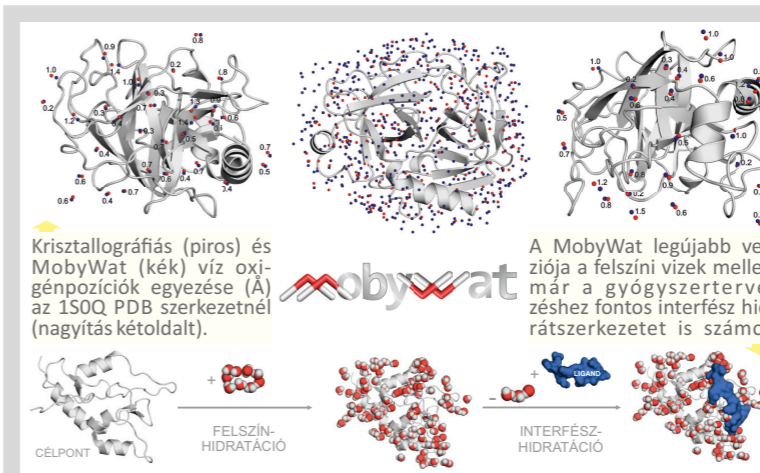
A tanulmányban az ERK2 és RSK1 kinázokból felépülő komplex szerkezetének röntgen-kristallográfiás meghatározását végeztük el, katalízis előtti állapotban és molekuláris dinamikai számításokkal bemutattuk a komplex átalakulását a szignál-kompetens állapotba. A szerkezeti eredményeket biokémiai és sejteken végzett vizsgálatokkal kombináltuk.

Meghatároztuk a Cbk1-Mob2 kináz-koaktivátor komplex röntgen-kristallográfiás szerkezetét, amely az első ilyen eredmény a NDR/LATS kináz-Mob típusú rendszerek esetében. Egy új szubsztát-dokkolási mechanizmust is sikerült feltárni, amely eddig ismeretlen volt az AGC család kinázai körében és a Cbk1 regulációs robusztusságát bizonyítja.



Molekuláris dinamikai számításaink megmutatták, hogy a NDR/LATS kináz regulációs hidrofób motívum (HM)-kötő zsebe (A) foszforiláció hatására (HM-P) az enzimaktiváció számára kedvező átrendeződésen megy át, amelyet a kulcsrégiók (B), úgy mint az α Mob (Mob2) és α C (Cbk1) távolságainak (C), másodlagos szerkezetük (D, E) és irányított mutációk (F) figyelembe vételével vizsgáltunk meg.

Munkánkat a Plos Biology folyóirat címlapjára emelte, Jay Ryan művészi grafikájával.



Kristallográfiás (piros) és MobyWat (kék) víz oxigénpozíciók egyezése (A) az 1S0Q PDB szerkezetnél (nagyítás kétoldalt).

A MobyWat legújabb verziója a felszíni vizek mellett már a gyógyszertervezéshez fontos interfész hidrát szerkezetet is számol.

1 Alexa A, Gógl G, Glatz G, Garai Á, Zeke A, Varga J, Dudás E, Jeszenői N, Bodor A, Hetényi C, Reményi A*. (2015) Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 2711-6.
2 Gógl G, Schneider KD, Yeh BJ, Alam N, Nguyen AN, Moses AM, Hetényi C, Reményi A*, Weiss EL*. (2015) The structure of an NDR/LATS kinase – mob complex reveals a novel kinase-coactivator system and substrate docking mechanism. *Plos Biology*, 13, e1002146.
3 Jeszenői N, Horváth I, Bálint M, van der Spoel D, Hetényi C*. (2015) Mobility-based prediction of hydration structures of protein surfaces. *Bioinformatics*, 31, 1959-65.

A röntgen-kristallográfia korlátozottan képes a hidrát szerkezet meghatározására, mivel a víz oxigénatomjának elektronsűrűség-asszignációja nem mindig triviális. Szoftvert dolgoztunk ki a fehérjék hidrát szerkezetének számítására, amelyet több mint 1500 kísérletes vízpozíció segítségével validáltunk és a www.mobywat.com oldalon ingyen elérhetővé tettünk.

Daganatos megbetegedésekben jelentős szerepet játszó rendezetlen fehérjék új tisztítási módszereinek kidolgozása

Együtműködésünk célja új, mágneses nanorészecskékhez (MNP) kötött kelátorok kialakítása és tesztelése rendezetlen fehérjék tisztítása során. A munkánk során több, különböző fizikai tulajdonságú MNP sorozatot készítettünk és teszteltünk le rendezetlen fehérjék tisztítása során. A fehérjetisztítási kísérleteket kiegészítettük az MPN-k fehéreje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokban való használhatóságának vizsgálatával.

Development of new purification methods for proteins with key roles in cancer

The aim of our cooperation is the production and testing of new chelators bound magnetic nanoparticles (MNP), with special focus is on their affinity towards disordered proteins. We have produced and tested various MNP series with different physical characteristics with in the purification of several disordered proteins. Additionally to the purification experiments, we also tested the applicability of the MNPs in protein-protein interaction studies.

Daganatos megbetegedésekben jelentős szerepet játszó rendezetlen fehérjék új tisztítási módszereinek kidolgozása



Dr. Poppe László
MTA Doktora, egyetemi tanár
BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék
BioOrganikus Kémia Kutatócsoport vezetője

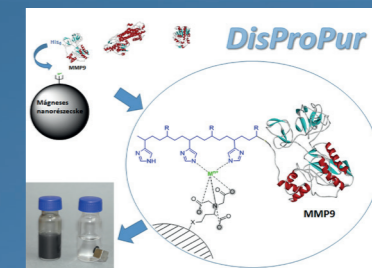


Kutatási témái

- ◆ Biokatalízis: enzimek és egész sejtes rendszerek alkalmazása sztereoselektív szintézisekben
- ◆ Mini és mikrofluidikai rendszerek alkalmazása kemoenzimátikus folyamatokban
- ◆ Enzimek előállítása, tisztítása, mechanizmusvizsgálata és rögzítése

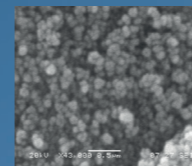
EGYÜTTMŰKÖDÉSÜNK CÉLJA

- ◆ Új, mágneses nanorészecskékhez (MNP) kötött kelátorok kialakítása és tesztelése, melyek a Ni-NTA agaróznál jobb hatékonysággal kötik meg a His-tag fuzionált fehérjéket.
- ◆ Az eredetileg vizsgálni kívánt két MNP sorozatot kiegészítettük két, köztes hosszúságú karral rendelkező sorozattal.
- ◆ Három, a Ni-NTA agarózhoz gyengén kötődő rendezetlen fehérje/fehérjeszakasz tisztításának beállítása az új MNP-k segítségével.
- ◆ Az MNP-k tesztelése fehérje-fehérje kötődés vizsgálatokban

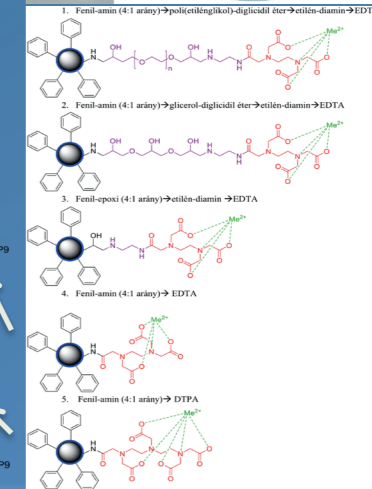
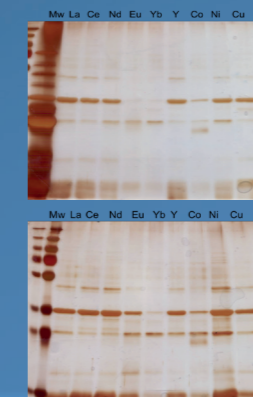
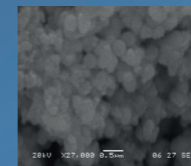


EREDMÉNYEK

MNP SEM FELVÉTELE



MNP-TEOS SEM FELVÉTELE



Dr. Tantos Ágnes
PhD, tudományos munkatárs
MTA TTK Enzimológiai Intézet
Rendezetlen fehérjék kutatócsoport



Kutatási témái

- ◆ A rendezetlenség szerepe a rákos megbetegedésekkel összefüggő processzív enzimek működésében.
- ◆ Rendezetlen fehérjék szerkezeti adaptációjának vizsgálata.
- ◆ Rendezetlen chaperon fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek tanulmányozása.

Funkcionális különbségek a humán CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) receptorok közt: a CD11b az iC3b-mediált fagocitózisban, míg a CD11c a sejtadhézióban játszik döntő szerepet.

Gyöngy alapú módszerrel meghatároztuk a CD11b és CD11c pontos számát három humán sejt típuson, és azt találtuk, hogy a CD11b/CD11c arány 1.2 az MDDC-ken, 1.7 az MDM-eken és 7.1 a monocitákon, amely arra utal, hogy a CD11c szerepe a MDDC-kben a leghangsúlyosabb, és kevésbé kifejezett a monocitákban. Ellenanyagokkal blokkolással és RNS csendesítéssel megmutattuk, hogy az (általános CR3- és CR4-kötő) fibrinogénhez való sejtadhéziót a CD11c közvetíti. Ezen felül azt találtuk, hogy a CD11b blokkolása erősíti a fibrinogénhez való sejtadhéziót, amely arra utal, hogy a CD11b és a CD11c verseng ezen ligand kötéséért.

We determined the exact number of CD11b and CD11c on three human cell types by a bead based technique, and found that the ratio of CD11b/CD11c is 1.2 for MDDCs, 1.7 for MDMs and 7.1 for monocytes, suggesting that CD11c's function is most obvious for MDDCs and less for monocytes. Using antibody blocking and RNA silencing techniques we proved that adherence to fibrinogen – the common ligand of CR3 and CR4 – is mediated by CD11c. Moreover we found that blocking CD11b even enhances attachment to fibrinogen, suggesting a competition between CD11b and CD11c for this ligand.

Sándor Noémi, MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport

Kutatócsoportunk fő témája a komplement rendszer vizsgálata, mely a veleszületett és adaptív immunitás egyik elengedhetetlen komponense. Témánk fókuszpontjában a különféle immunsejteken kifejeződő komplement receptorok állnak. Ezek közül jelen munkánkban a 3-as (CR3, CD11b/CD18) és 4-es (CR4, CD11c/CD18) komplement receptorok szerepét vizsgáljuk részletesen, melyek a $\beta 2$ integrinek családjába tartoznak. Arra vagyunk kíváncsiak, hogy a két nagyon hasonló receptor között megfigyelhető-e funkcionális különbség.



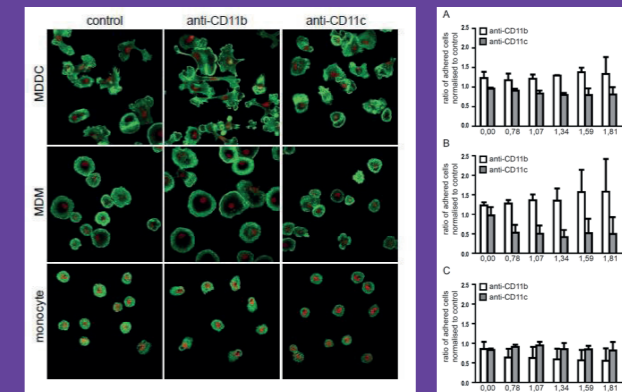
Székács Inna, MTA EK MFA Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport

Jelölésmentes optikai bioszenzorok segítségével vizsgálom kis molekulák bekötődését valamint az *in vitro* sejtadhézió kinetikáját. A sejtadhézió jelölésmentes és időbeli felbontást adó monitorozása az optikai bioszenzorok egyik legújabb alkalmazási területe. Célunk, hogy az felületi plazmon rezonanciánál (SPR-nél) biofizikai szempontból átláthatóbb, könnyebben értelmezhető és egyúttal nagyobb érzékenységet adó OWLS (és az ezzel rokon EPIC) bevetésével a korábbiaknál részletesebb képet kapjunk a sejtadhézióról.



Funkcionális különbségek a humán CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) receptorok közt: a CD11b az iC3b-mediált fagocitózisban, míg a CD11c a sejtadhézióban játszik döntő szerepet.

A CR3 és CR4 receptorok a $\beta 2$ integrinek családjába tartoznak. Számos, főként csontvelői sejt típusban kifejeződnek. Az iC3b által opsonizált fagocitózisban és az ICAM-1-hez valamint fibrinogénhez történő sejtadhézióban vesznek részt. Célunk az volt, hogy felderítsük a CR3 és CR4 közti funkcionális különbséget. Vizsgáltuk, hogy a CD11b ill. CD11c hogyan járul hozzá a sejtadhézióhoz. Humán monocitákat, monocitából származó makrofágokat (MDM) és dendritikus sejteket (MDDC) használtunk, melyekben a CD11b és CD11c expressziója magas, és a sejtadhézió természetes tulajdonságuk. Gyöngy alapú módszerrel meghatároztuk a CD11b és CD11c pontos számát ezeken a sejteken, és azt találtuk, hogy a CD11b/CD11c arány 1.2 az MDDC-ken, 1.7 az MDM-eken és 7.1 a monocitákon, amely arra utal, hogy a CD11c szerepe a MDDC-kben a leghangsúlyosabb, és kevésbé kifejezett a monocitákban. Ellenanyagokkal blokkolással és RNS csendesítéssel megmutattuk, hogy az (általános CR3- és CR4-kötő) fibrinogénhez való sejtadhéziót a CD11c közvetíti. Ezen felül azt találtuk, hogy a CD11b blokkolása erősíti a fibrinogénhez való sejtadhéziót, amely arra utal, hogy a CD11b és a CD11c verseng ezen ligand kötéséért. Az ábrák az ellenanyagokkal blokkolt sejtek alakjára és a sejtadhézióra kifejtett hatását mutatják.



Szabó Bálint, ELTE Biológiai Fizika Tanszék

Egyedi élő emlős sejtek mikroszkópos megfigyelésével és válogatásával, valamint a sejtadhézió molekuláris hátterének vizsgálatával foglalkozom az utóbbi években. Az általunk fejlesztett számítógép-vezérelt mikropipetta képes az *in vitro* sejtenyészetből a mikroszkópos kép alapján egyedi sejteket izolálni az ezt követő DNS, RNS vagy fehérje vizsgálatok céljából. Ugyanez a műszer képes egyedi sejtek adhéziós erejének nagy pontosságú mérésére. A felületet, amire a sejtek kitapadnak, molekuláris szinten kézben tartjuk, így a felület és a sejtek közti kölcsönhatás fehérje-specifikus lehet.



Kellermayer Miklós, SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Elsősorban egymolekula biofizikai módszerekkel vizsgáljuk fehérjék mechanikai tulajdonságait, gombolyodási mechanizmusait, aggregációs tulajdonságait és kölcsönhatásait fehérje- és lipidrendszerekkel. Fluoreszcenssen jelölt fehérjék és fehérjekomplexek multiplex vizsgálatára rendelkezésre áll egy olyan TIRF mikroszkóp, amely egyedülálló módon egy atomerómikroszkóppal tér- és időbeli szinkronizációban működik, lehetővé téve a nagyfelbontású topográfiai szerkezet és nanomechanikai tulajdonságok analizisét.



ALR: kapocs a mitokondriális DNS és oxidatív folding között

A máj regenerációt fokozó (augmenter of liver regeneration, a továbbiakban ALR) fehérje részt vesz a mitokondriális biogenezisben, fenntartásban és a mitokondrium fiziológias működésében, továbbá a mitokondriális oxidatív fehérje folding apparátus egyik fontos eleme. mtDNS depletált 0 sejt vonalat készítettünk, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a mitokondriális elektrontranszfer lánc és a mtDNS ALR kifejeződésében betöltött szerepét. A mtDNS depléció RNS szinten semmilyen hatást sem gyakorolt, azonban fehérje szinten jelentős mértékben megemelte az ALR kifejeződését. Az ATP és a ROS szintek szabályozásában betöltött szerepét kizártuk, mivel az eredeti sejt vonalakat, légzést gátló- és szétkapcsoló szerekkel kezelve semmilyen ALR expressziós változást sem tapasztaltunk. Megfigyeléseink alapján igen valószínűnek tűnik, hogy az mtDNS és/vagy annak valamely terméke szabályozó szereppel bír az ALR fehérjeszintjére.

ALR: The link between the mitochondrial DNA and oxidative folding

Augmenter of liver regeneration (ALR) contributes to mitochondrial biogenesis, maintenance and to the physiological operation of mitochondria, moreover it is an important element of the mitochondrial oxidative protein folding machinery. mtDNA depleted, 0 cell line was prepared to investigate the role of mitochondrial electron transfer chain and mtDNA on ALR expression. The depletion of mtDNA has not caused any difference at mRNA level, but at protein level the expression of ALR has been markedly increased. The regulatory role of ATP and ROS levels could be ruled out because the treatment of the parental cell line with different respiratory inhibitors and uncoupling agent could not provoke any changes in the protein level of ALR. On the base of these observations it seems that mtDNA and/or its products may have regulatory role on the protein level of ALR.



ALR: kapocs a mitokondriális DNS és oxidatív folding között

Balogh Tibor¹, Lőrincz Tamás¹, Mandl József², Szarka András¹

¹Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Biokémiai és molekuláris Biológiai Laboratórium

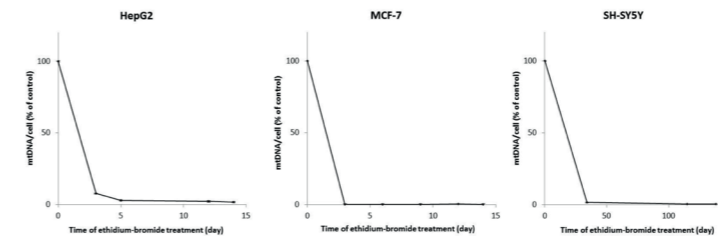
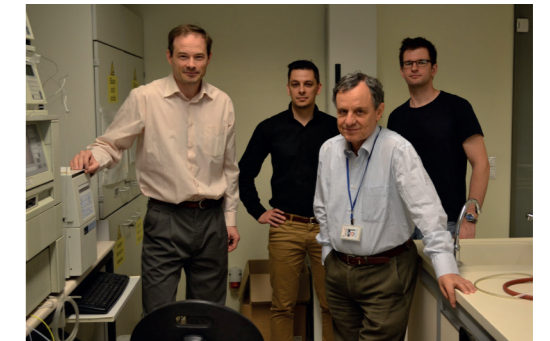
²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

Az ALR (augmenter of liver regeneration) fehérje fontos szerepet tölt be a mitokondriális biogenezis, fenntartás folyamatában, illetve a mitokondrium fiziológias működésében. Ezen túl a mitokondriális oxidatív fehérje folding apparátus fontos tagja. Az ALR fehérje közvetítésével csatornázódnak be a redukált fehérjéről érkező elektronok a mitokondriális elektrontranszfer láncba. Az ALR depléciója széles körben tanulmányozott, nem véletlen, hisz igen súlyos mitokondriális funkcióromlással jár együtt. Az ellentétes irányú folyamat, a mitokondriális elektrontranszfer lánc és a mitokondriális DNS (mtDNS) depléciójának hatása az ALR-re azonban mind a mai napig ismeretlen. A mitokondriális elektrontranszfer lánc és a mtDNS ALR szint szabályozásában betöltött szerepének felderítése végett mtDNS depletált sejt vonalakat hoztunk létre (1. ábra). A mtDNS depléciója nem okozott lényeges különbséget az ALR mRNS szintjében (2. ábra), azonban a fehérje szintje jelentős mértékben megemelkedett (3. ábra). Az ATP és a reaktív oxigénvegyületek szerepét az ALR fehérje szintjének szabályozásában kizártuk, mivel az eredeti anyasejt vonalakat különböző respirációs gátlószerekkel és szétkapcsoló szerrel kezelve nem változott meg az ALR fehérje kifejeződésének mértéke (4. ábra). A mtDNS depléció ALR fehérjeszintre gyakorolt hatása bizonyítottan nem máj specifikus, mivel a jelenséget két nem máj eredetű sejt vonalon is meg tudtuk figyelni (3. ábra).

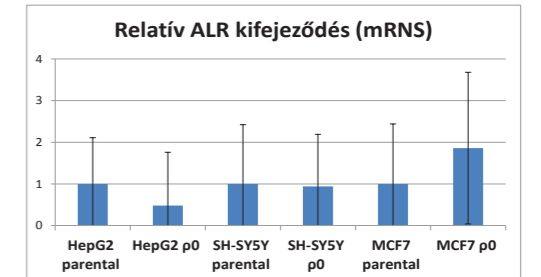
Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az mtDNS és/vagy egy(es) terméke(i) részt vesz(nek) az ALR fehérje kifejeződésének szabályozásában. Az ALR fehérje felszabályozása egy adaptív válaszreakció része lehet hiányos, vagy sérült mtDNS-sel, elektrontranszfer láncsal rendelkező sejtekben, amely segít megőrizni a mitokondrium szerkezeti integritását és fenntartani a membránpotenciált.

MEDINPROT fehérjetudományi együttműködés:

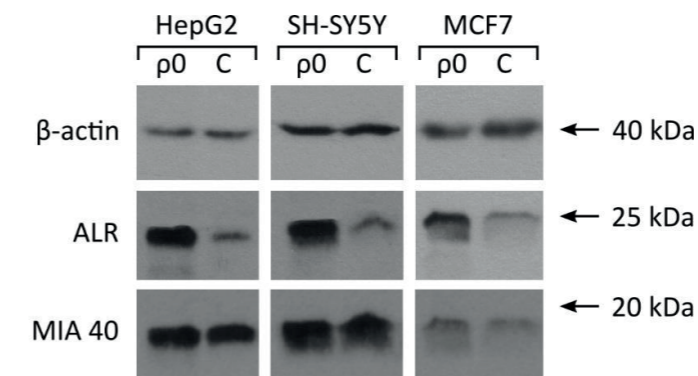
Szarka András, Lőrincz Tamás, Mandl József, Balogh Tibor



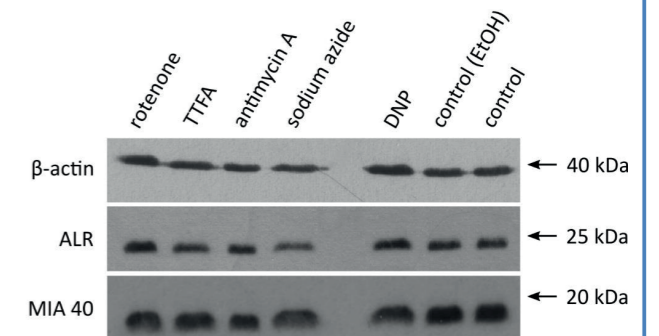
1. ábra A mtDNS tartalom változása HepG2, MCF-7 és SH-SY5Y sejt vonalokban hosszú távú etidium-bromid kezelés hatására. Az etidium-bromid kezelést a párhuzamos sejt vonalakat esetében azonos időben kezdtük. A sejtéből a kezelés különböző időpontjaiban mintát vettünk, majd teljes sejt DNS-t izoláltunk belőlük. Az mtDNS tartalmukat real-time PCR segítségével határoztuk meg.



2. ábra Az mtDNS depléció hatása az ALR kifejeződésére (mRNS). A sejtéből a kezelés különböző időpontjaiban mintát vettünk, majd RNS-t izoláltunk belőlük, amit ezt követően cDNS-re írtunk vissza. Az ALR gén kifejeződését real-time PCR segítségével határoztuk meg.



3. ábra Az mtDNS depléció hatása az ALR és a MIA40 kifejeződésére. Az ALR és a MIA40 fehérjék szintjét összevetettük mtDNS depletált (p0), illetve kontrolli (C) sejt esetében. A hosszú távú etidium-bromid kezelt illetve kontrolli sejtéből fehérjét izoláltunk, majd redukáló SDS-PAGE segítségével elválasztottuk őket. Blottolást követően a membránokat anti-ALR illetve anti-MIA40 poliklonális antitesttel jelöltük. Belső kontrollnak β-actin-t használtunk.



4. ábra Különböző légzési gátlószerek hatása az ALR, illetve a MIA40 fehérjék kifejeződésére. HepG2 sejteket kezeltünk a komplex I gátlószer rotenone-nal, a komplex II gátlószer TTFA-val, a komplex III gátlószer antimycin A-val és a komplex IV gátlószer nátrium-azidddal. A 2,4-dinitrofenolt, mint szétkapcsolószert alkalmaztuk. 24 órával a kezelés megkezdését követően fehérjét izoláltunk a sejtekből, majd redukáló SDS-PAGE segítségével elválasztottuk őket. Blottolást követően a membránokat anti-ALR illetve anti-MIA40 poliklonális antitesttel jelöltük. Belső kontrollnak β-actin-t használtunk.

Hő- és kémiai denaturáció a humán epesav-kötő fehérjében

Lokális letekeredési folyamatok fontos szerepet játszanak az intracelluláris lipikötő fehérjék (iLBP) működésében (zsírszerű anyagok transzportja, nukleáris receptorok transzkripció aktivitásának szabályozása), és ennek megfelelően számos patológiás állapottal összefüggésbe hozhatók. NMR spektroszkópiai, fluoreszcenciás és kalorimetriás módszerek alkalmazásával jellemeztük a kémiai- és hődenaturációt az iLBP fehérjék családjába tartozó humán epesav-kötő fehérjében. A három különböző technikával nyert termodinamikai, kinetikai és szerkezeti információ összevetése többállapotú folyamatra, valamint a fehérje hidrofób magja és a perifériális N-terminális szegmens eltérő viselkedésére utal.

Chemical and thermal denaturation in human ileal bile acid-binding protein

Local unfolding processes have a key role in mediating ligand binding and nuclear translocation in intracellular lipid-binding proteins (iLBPs). Using NMR and fluorescence spectroscopy as well as calorimetric measurements, we investigated the mechanism of chemical and thermal denaturation in human ileal bile acid-binding protein, a member of the iLBP family. Thermodynamic, kinetic, and structural information obtained from the three independent techniques indicates a multistate folding process and differences in the temperature response of the hydrophobic core and the peripheral N-terminal segment.

Hő- és kémiai denaturáció a humán epesav-kötő fehérjében

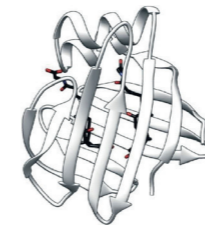


Tőke Orsolya^{a*}, Biczók László^b, Kovács Mihály^c



^aMTA TTK Szerves Kémiai Intézet, ^bMTA TTK Anyag és Környezetkémiai Intézet,

^cELTE TTK Biokémia Tanszék



Együttműködésünk középpontjában az intracelluláris lipikötő fehérjék (iLBP) családjába tartozó, anyagcsere-rendellenességekkel és daganatos megbetegedésekkel összefüggésbe hozható humán epesav-kötő fehérje (hI-BABP) működési mechanizmusának vizsgálata áll. Más iLBP fehérjékhez hasonlóan, a BABP-fehérjék molekuláris kölcsönhatásaiban (epesavak intracelluláris transzportja, nukleáris transzlokáció és a farnesoid X receptor transzkripció aktivitásának stimulációja) fontos szerep jut a fehérjében zajló lokális letekeredési folyamatoknak. Vizsgálataink célja szerkezeti biológiai (NMR) és biofizikai módszerek segítségével a le- és feltekeredés mechanizmusának megértése a BABP fehérjékben.

TERMODINAMIKA
ITC, fluoreszcencia

Biczók László, D.Sc.
MTA TTK AKI

- molekulaszerkezet és mikroköznyezet hatása a kötődés termodinamikájára és kinetikájára többkomponensű kémiai/biológiai rendszerekben
- izokinolin és indol vázsal rendelkező alkaloidok kötődése

SZERKEZET, DINAMIKA
NMR

Tőke Orsolya, Ph.D.
MTA TTK SZKI

- fehérje-ligandum, fehérje/peptid-membrán kölcsönhatások
- lipidkötő fehérjék
- belső molekuláris mozgások NMR spektroszkópiai és biofizikai vizsgálata

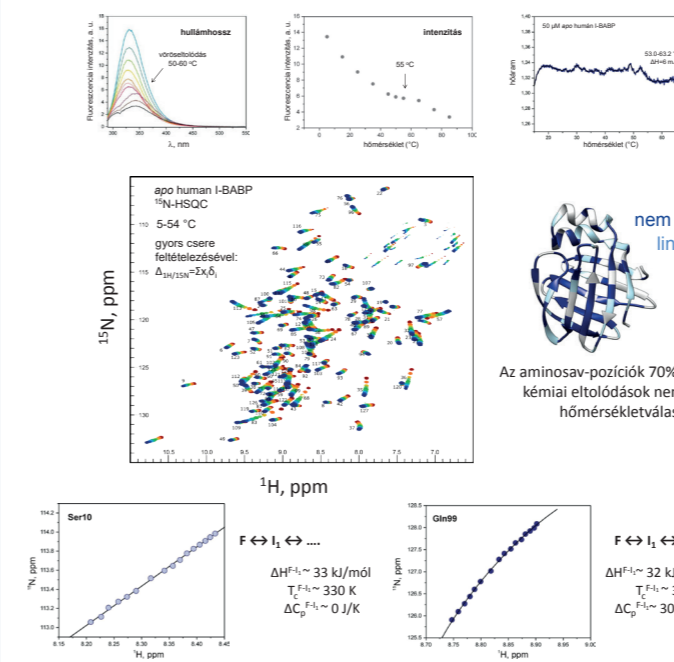
KINETIKA
stopped-flow fluoreszcencia

Kovács Mihály, Ph.D., Habl. Ö. Sc.
ELTE TTK

- DNS-hibajavításban központi szerepet játszó DNS-helikáz fehérjék működési mechanizmusának és biológiai szerepének felderítése
- gyorskeveréses kinetikai módszerek

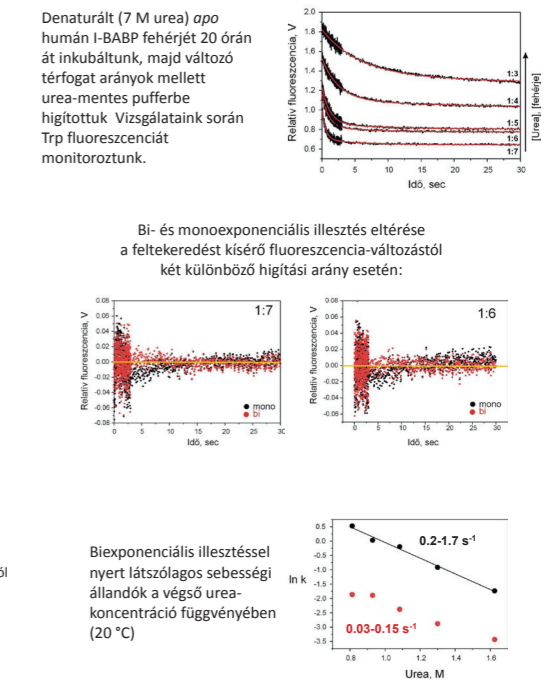
DENATURÁCIÓ

fluoreszcenciás, DSC és NMR spektroszkópiai vizsgálata



RENATURÁCIÓ

stopped-flow fluoreszcenciás vizsgálata



Mind az NMR spektroszkópiás, mind a stopped-flow fluoreszcenciás vizsgálatok többállapotú le- illetve feltekeredést jeleznek.

NMR spektroszkópiás mérések alapján heterogenitás az aminosav szekvencia mentén. A hidrofób mag és a perifériális N-terminális szegmens eltérő viselkedése a hőmérséklet függvényében.

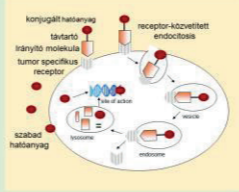


Céltumortherápiában fontos receptor fehérjék és azok jelátviteli változásának vizsgálata peptid-hatóanyag-polimer nanorendszer segítségével

Dr. Mező Gábor¹, Dr. Iván Béla², Dr. Kóhidai László³

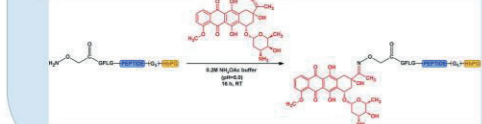
¹ MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ² MTA TTK AKI Polimer Kémiai Kutatócsoport, ³ Semmelweis Egyetem, GSI, Kemotaxis Munkacsoport

A tumorsejteken megjelenő sejtspecifikus vagy túltermelődött receptor fehérjéknek óriási jelentősége van a célzott, személyre szabott tumortherápiában. A terápia hatékonysága növelhető, ha egyszerre több receptor-típuson keresztül juttatunk különböző hatóanyagokat a tumorsejtekbe, amelyek így additív vagy szinergista módon fejthetik ki hatásukat. A peptidligandumok kötődése után a receptorok azonban különböző jelátviteli útvonalakon és komplex folyamatokon át befolyásolhatják egymás expresszióját, szerkezetét (pl. foszforiláltság), jeltovábbító képességüket és endocitózisa való hajlamukat. Ezeknek a folyamatoknak az ismerete elengedhetetlen a megfelelő kombinált kezelés kidolgozásához. A kombinált célzott tumortherápia hatékonyságát befolyásoló fehérjeszintű változások feltérképezésére tesz kísérletet kutatócsoportjainkból létrehozott konzorcium egy peptid-hatóanyag-polimer nanorendszer segítségével.



Dr. Mező Gábor
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Két kiválasztott EGFR-hoz kötődő peptid konjugátuma:
 Dau=Aoa-GFLG-LARLLT-NH₂ (Dau=Aoa-GFLG-D4)
 Dau=Aoa-GFLG-YHWYGYTPQNV-NH₂
 (Dau=Aoa-GFLG-GE11)



Dr. Iván Béla
MTA TTK AKI
Polimer Kémiai Kutatócsoport

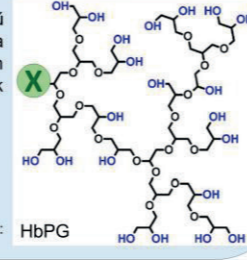


Polihidroxil karakterű makromolekula előállítás a komplex biokonjugátum megfelelő oldhatóságának elérése céljából

Feladatok:

- Polimer szintézis és karakterizálás
- Funkcionalizálás

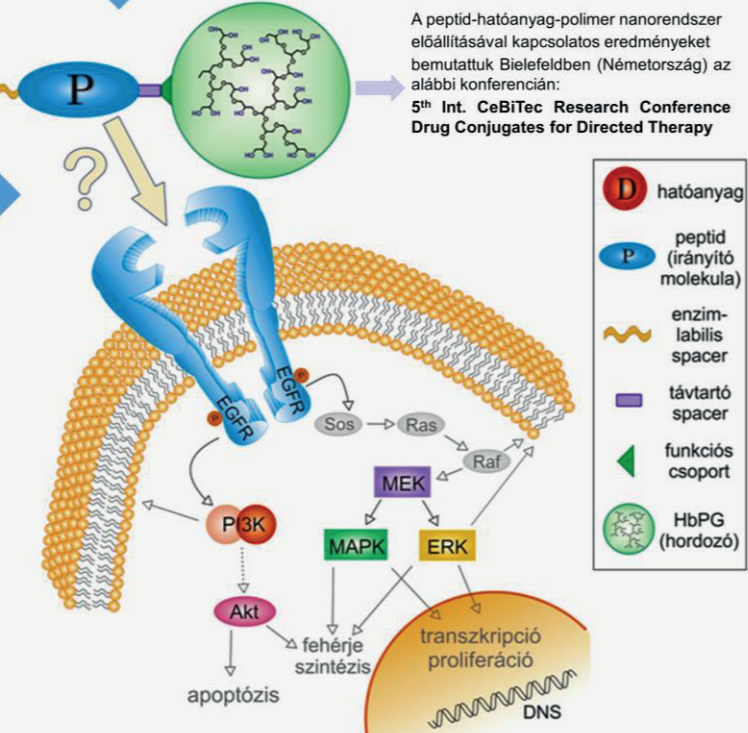
A megvalósításban részt vesz: Kasza György



Dr. Kóhidai László
Semmelweis Egyetem, GSI,
Kemotaxis Munkacsoport

Kísérleteinkben a fent ismertetett módon szintetizált, EGF receptorhoz kötődni képes peptid konjugátumok sejtbiológiai paraméterekkel mérhető hatásait vizsgáljuk. Ezek két fő útvonalát a (i) jelátviteli utakat is érzékenyen érintő receptor-moduláció (ld. monoklonális antitestek; tirozinkináz gátlók; kemopreventív anyagok alkalmazása) és a (ii) receptor internalizáció (pl. EGFR-STAT3-E2P1 komplex génszintű hatásai ciklin vagy iNOS termelésre) multidimenziális szignalizációi képviselik. Modellül a tumorok sejtleletleni jellemzőit (egészséges sejtektől eltérő kitapadás, sejtmozgás, osztódó képesség) jól reprezentáló, a hazai populációban magas incidenciával előforduló két daganatnak megfelelő sejt vonalat (HT-29 – colon adenoc.; MCF7 – emlőcc.) használunk. Vizsgálataink során az előállított konjugátumokkal (i) az EGFR jelátvitelére jellemző, csomóponti elemek (MEK-ERK, PI3K-AKT) aktivitását vizsgáljuk immuncitokémia/FACS elemzéssel; (ii) a sejtek adhézióját, migrációját és proliferációját mérjük impedimetriás úton, valós idejű rendszerben.

A megvalósításban részt vesz: Láng Orsolya és Lajkó Eszter



Megválaszolandó kérdések:

- > A HbPG oldékonyságot növelő hatása és a biohasznosulásra valamint tumornövekedésre gyakorolt hatása összevetve a PEG-alapú konjugátumokkal.
- > A konjugátummal történő kezelés hatására bekövetkező fehérje szintű változások megállapítása, különös tekintettel a jelátviteli csomópontok aktivitására és más a célzott tumortherápiában hasznosítható receptorok (pl. GnRH-R) kifejeződésére.

A NAD(P)H-citokróm b5 oxidoreduktáz fehérje-interakciói az endoplazmás retikulumban: szerepe a lipotoxicitás által kiváltott gyulladási folyamatok kivédésében

Monostory Katalin
MTA Természettudományi Kutatóközpont

Kutatási terület:

- a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő citokróm P450 (CYP) enzimek működése
- CYP gén expresszió szabályozása
- CYP enzimek működésének gátlása
- CYP mutációk kimutatása
- metabolikus gyógyszer-interakciók vizsgálata
- egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség megállapítása

Csala Miklós
Semmelweis Egyetem

Kutatási terület:

- az endoplazmás retikulum (ER) redox metabolizmusa
- az ER-stressz befolyásolása
- a mikroszomális elektrontranszfer útvonalai
- inzulinrezisztencia és β-sejt-diszfunkció
- szabad zsírsavak patológiai szerepe és ennek mechanizmusa (lipotoxicitás)
- a zsírsav-KoA-deszturáció citoprotektív hatása

MedInProt Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program

Bevezetés

Az ER-membránban zajló deszturációt végző enzimek, valamint a gyógyszer-metabolizmusban meghatározó citokróm P450 (CYP) enzimek között szoros kapcsolatot valószínűsítünk. A sztearil-KoA-deszturáz (SCD1) – a CYP monooxigenázokhoz hasonlóan – a citokróm b5 (b5) és b5-reduktáz (b5R) közvetítésével NAD(P)H-től kapja az elektronokat. A tisztázatlan funkciójú, citoszolban oldott formában található NAD(P)H-citokróm b5 oxidoreduktáz (Ncb5OR) fehérje b5-szerű és b5R-szerű doméneket tartalmaz. Ez alapján feltételezhető, hogy az Ncb5OR részt vesz az ER-ben zajló elektrontranszferben.

Célkitűzés

Annak kiderítése, hogy az Ncb5OR kölcsönhat-e az SCD1-el, valamint CYP-el, esetleg mindkét típusú enzimmel; azaz közreműködik-e a zsírsav-deszturációban, illetve a gyógyszer-metabolizmusban.

Alkalmazott modell-rendszerek

- 1) SCD1-et és/vagy CYP izoenzimet termelő HEK293 sejtek, amelyekben vizsgálhatók az egyes enzimaktivitások b5- és/vagy Ncb5OR-kotranszfektlálás, illetve géncsendesítés hatására;
- 2) Humán májszövetből preparált mikroszóma, amelyben lévő enzimek működése kofaktorok (NADH, NADPH), citoszol-komponensek vagy tisztított Ncb5OR fehérje adagolásával befolyásolható;
- 3) Szuperszómak, amelyek egyféle CYP izoenzimet tartalmaznak az egyes elektronközvetítő fehérjékkel kombinálva, így alkalmasak a kívülről hozzáadott Ncb5OR szerepének tisztázására.

Eddigi eredmények

SCD1 és Ncb5OR túltermelése HEK293T sejtekben.
 A HEK293T sejtek endogén SCD1 és Ncb5OR fehérjétartalma Western blottal alig detektálható (kontroll). A megfelelő inszertet tartalmazó expressziós vektorral transzfektlált sejtek lisátumaiban (transzf.) a vártan megfelelő méretű fehérjék specifikus antitestekkel jól kimutathatók.

SCD1 és Ncb5OR expressziójának csendesítése transzfektlált HEK293T sejtekben.
 Az SCD1, illetve Ncb5OR fehérjét termelő, expressziós vektorral transzfektlált HEK293T sejtek lisátumaiban (expressziós vektor) a megfelelő fehérjék Western blottal jól detektálhatók. A különböző típusú (I, II, III) és mennyiségű (2 vagy 4 µg) siRNS-sel transzfektlált sejtekben a fehérjeexpresszió csökkenése észlelhető. Az analízis fehérjék egyenlő mennyiségének ellenőrzésére kontrollként β-aktin elleni elsődleges antitesttel is elvégeztük az immunoblot vizsgálatot.

CYP izoenzimek termelésére alkalmas, expressziós konstruktok előállítása.
 A CYP kódoló szekvenciákat tartalmazó cDNS-eket HepG2 sejtek mRNS-éből állítottuk elő reverz transzkripcióval, majd klónozásra alkalmas inszerteket amplifikálunk, amelyeket p.cDNA3.1(+) vektorba ligálunk. A jobb oldali ábra egy cDNS mintából készült gradiens PCR agaróz gélelektroforézissel elválasztott termékeit mutatja.

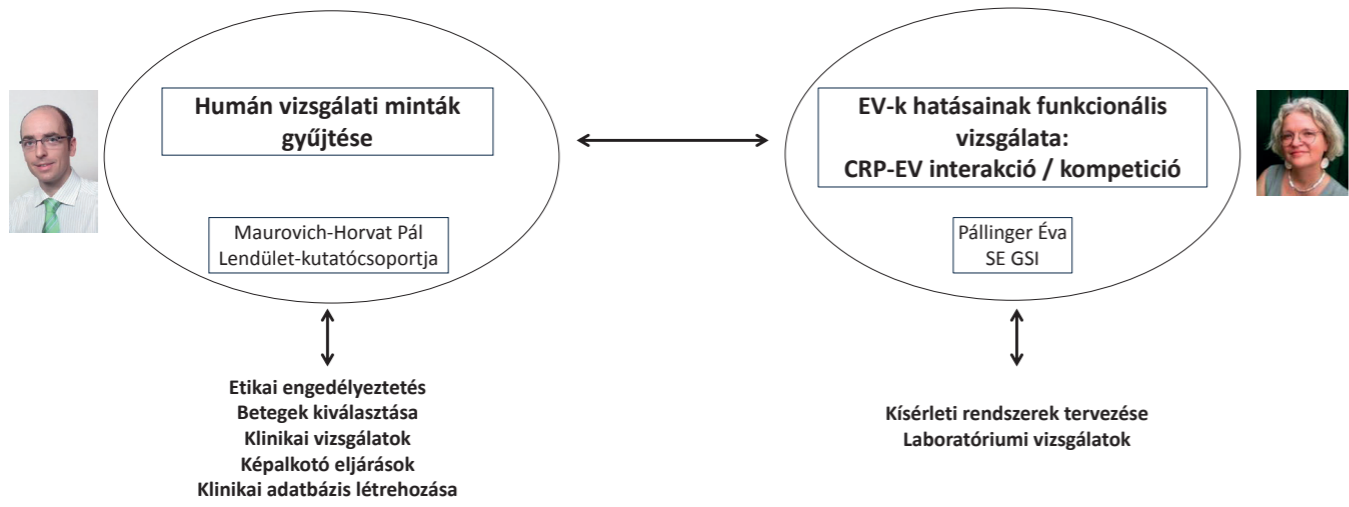
További feladatok

- Koexpressziós konstruktok létrehozása és ezekkel HEK293T sejtek transzfektlációja;
- Metabolit mérések a kotranszfektlált sejtekben;
- Tisztított Ncb5OR előállítás E. coli felhasználásával;
- In vitro mikroszomális és szuperszómak aktivitásmérések.

2015. november

SZINERGIA III.

A CRP és az extracelluláris vezikulák (EV-k) kölcsönhatásának rendszerszemléletű megközelítése a CVD prognosztikájában felhasználható új biomarkerek azonosítása céljából

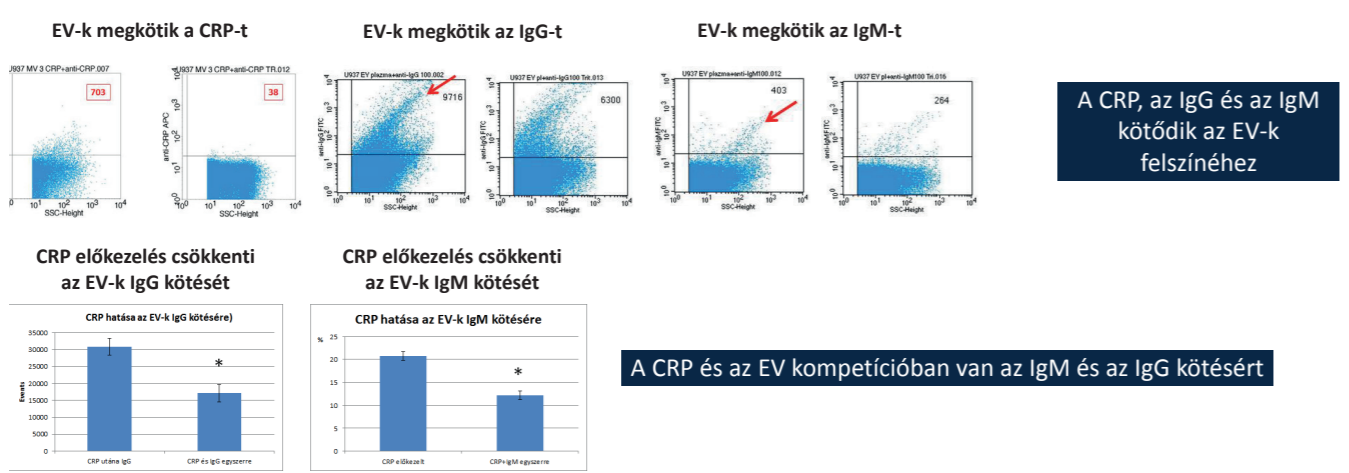
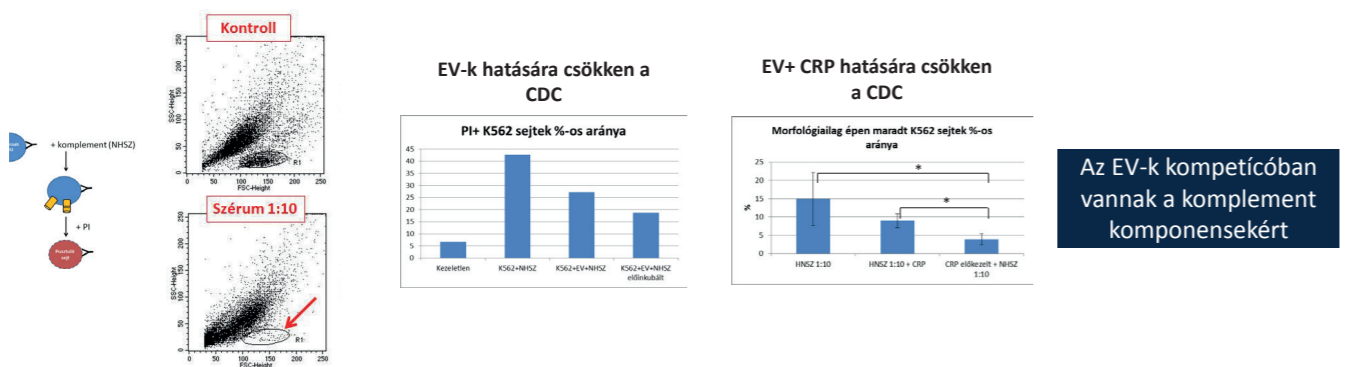


KÉRDÉSEINK

- Befolyásolja-e a komplement-mediálta lízist (CDC) az EV-k jelenléte?
- Befolyásolja-e a CDC-t CRP jelenléte?
- Befolyásolja-e a CRP az EV-k immunoglobulin-kötő képességét?
- Képesek-e az EV-k megkötni a CRP-t?

MÓDSZEREK

- Komplement-mediálta sejtlízis (CDC) FACS-alapú mérése
- CDC vizsgálata CRP jelenlétében
- EV-k immunoglobulin-kötő képességének vizsgálata CRP jelenlétében és hiányában: FACS
- EV-k CRP-kötő képességének vizsgálata: FACS



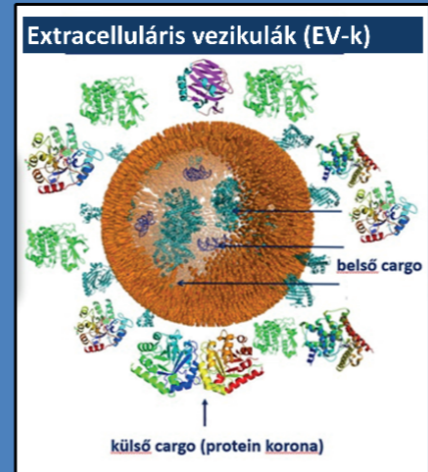
A CRP és az EV kompetícióban van az IgM és az IgG kötődés

email: eva.pallinger@gmail.com, p.maurovich-horvat@cirg.hu

Extracelluláris vezikula cargo vizsgálata

Dr. Vékey Károly, MTA TTK
Dr. Buzás Edit, Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet Extracelluláris Vezikula Csoport

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal körülvett, valamennyi sejtünk által termelt képletek, melyek a sejtek közötti kommunikáció-ban betöltött jelentős szerepük miatt új paradigmát képviselnek a biológiában. A MEDINPROT projekt keretében tervezett munkánk során tömegspektrometriával vizsgáljuk az EV-k külső és belső fehérje cargo-ját, és annak információ-tartalmát gyulladással és daganatos megbetegedésekben



Turiák L. et al J Proteomics. 2011;74:2025-33

Éhomi és postprandiális humán vérplazma eredetű EV-k fehérjét vizsgáltuk. E mellett az U937 humán monocytá sejt vonal eredetű EV-k proteomikailag jellemzését végeztük el. APO : 407, MV: 420 és EXO: 242 azonosított fehérje.

Éhomi vérplazma mikrovezikulák		4h postprandiális vezikulák	
Acces	Protein	Acces	Protein
ALBU_HUMAN	Serum albumin	ALBU_HUMAN	Serum albumin
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	CO3_HUMAN	Complement C3
CO3_HUMAN	Complement C3	APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100
AZMG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	AZMG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	Serotransferrin
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	Complement C4-B
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	Complement C4-A
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain
FINC_HUMAN	Fibronectin	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-1	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-1
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain
CFAH_HUMAN	Complement factor H	FINC_HUMAN	Fibronectin
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain
IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region
APOA_HUMAN	Apolipoprotein E	HPT_HUMAN	Haptoglobin
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1
MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin

A táblázatban található TOP 20 fehérje listája szerint a vérplazmából izolált EV cargo részeként (feltehetőleg külső cargo-ként) jelentős számú vérplazma fehérje is jelen van a vérplazma eredetű EV preparátumokban. Ugyanakkor a fenti plazmafehérjék hiányoznak az U937 sejt vonal eredetű, szérumban közegben termelt EV-k preparátumainak proteinjai közül.

Gyors mérések adaptálása és tesztelése

Gyors (SOFAST, BEST) típusú mérések adaptálása és kiértékelése kis koncentrációban jelen levő, vagy bomlékony fehérjék hatékony jellemzésére, illetve in-cell körülmények közötti vizsgálatára. A 2D SOFAST (Band-Selective Optimized-Flip-Angle Short-Transient) HMQC mérések tipikusan 1 perc alatt futtathatók, míg a jelazonosításhoz szükséges 3D BEST (Band-Selective Short Transient) alapú HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO pulzusszekvenciák segítségével a korábbi hetes nagyságrend 2-3 napra szűkül. A p53 fehérje rendezetlen TAD régióját használtuk a 3D klasszikus és gyors mérések összehasonlítására, ezen kívül több globuláris és rendezetlen fehérje esetében alkalmaztuk már ezeket a módszereket.

Protein samples are not always available in cca 1 mM concentration, and in many cases are not stable for days, moreover under in-cell conditions the concentrations are really low. On the other hand good quality multidimensional measurements can necessitate several day long acquisition. In order to speed up data acquisition we use the approach of rapid pulsing techniques. In this respect we implemented and tested 2D SOFAST (Band-Selective Optimized-Flip-Angle Short-Transient) HMQC and 3D BEST (Band-Selective Short Transient) based HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO pulse sequences both for disordered and folded proteins. We also compared the results with the assignments obtained from the classical approach.



Bodor Andrea
ELTE, TTK, Kémiai Intézet



Nyitray László
ELTE, TTK
Biológiai Intézet

Az áttétképzést és gyulladást fokozó, Ca^{2+} kötő homodimer S100A4 fehérje és a rendezetlen szerkezetű p53 transzaktivációs domén kölcsönhatásának leírása.



Kalmár Lajos
MTA-TTK
Enzimológiai Intézet

In-cell NMR alkalmazása a rendezetlen ERD hőszokk fehérje esetében, és a teljesen rendezetlen – ideális IDP – változat vizsgálata.

Gyors, multidimenzionális mérések adaptálása és tesztelése

Alkalmazás: kis koncentrációban jelen levő, vagy bomlékony fehérje minták vizsgálatára, illetve in-cell körülmények közötti jellemzésre. A módszer előnye a lényegesen rövidebb mérési idő.

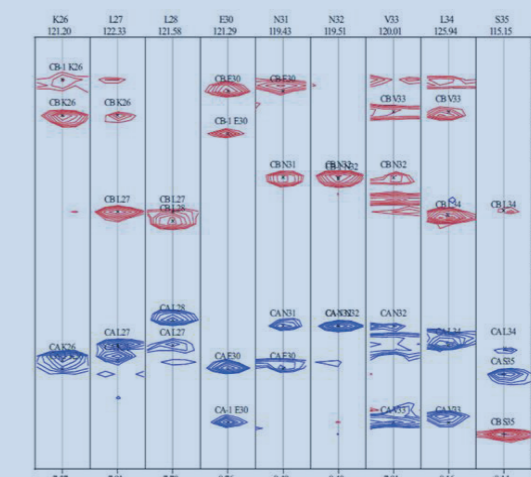
2D SOFAST HMQC; BEST 3D: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO és HN(CA)CO mérések.

Mérési időtartamok összehasonlítása:

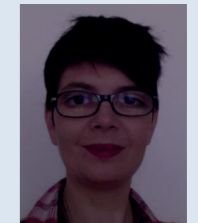
	klasszikus	BEST	NS
HNCO	8 h 46 min	2h 32 min	8
HNCA	16 h 45 min	7h 21 min	8
HN(CO)CA	16 h 58 min	6h 54 min	8
HNCACB	32 h	23h 56 min	16

3D BEST HNCACB részlet:

A rendezetlen p53 TAD régió minor komponenseinek aszignációja is lehetséges



NMR 700 MHz
ELTE, TTK



Tantos Ágnes
MTA-TTK
Enzimológiai Intézet

STINT-NMR technika :
Kialakulhatnak-e sejtes környezetben is a szabad állapotban rendezetlen TB4 "fuzzy" komplexei?



Batta Gyula
DE-TTK

Antifungális hatású, diszulfid hidas fehérjék szerkezeti és dinamikai jellemzése.



Pál Gábor
ELTE, TTK
Biológiai Intézet
Lektin út gátló fehérjék oldatfázisú konformáció analízise.

A kisszögű röntgenszórási módszer fejlesztése fehérjék oldatfázisú mérésére

A kisszögű röntgenszórási módszer nanorendszerek, így az oldott állapotú fehérjék szerkezetvizsgálatának hatékony eszköze. Előzőleg egy ilyen berendezést terveztünk és építettünk, amelynek most mintakezelési és mérési adatgyűjtő/feldolgozó környezetét fejlesztettük tovább gyengén szóró fehérje minták esetére. A mintatartó rendszer különböző formáinak (egyedi zárású és átfolyós formák) fejlesztése még folyamatban van.

Development of the small angle X-ray scattering method for the measurement of diluted protein systems

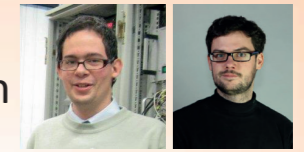
Small angle X-ray scattering is a powerful method for the structural studies of nanomaterials, e.g. solutions of proteins. We have previously designed and built a small angle X-ray scattering apparatus, and now we have developed the sample holder and data processing systems of this apparatus for the case of weakly scattering proteins. Further designs of the sample holder systems (sealed vessels and flow cells) are in progress.

A kisszögű röntgenszórási módszer fejlesztése fehérjék oldatfázisú mérésére



Bóta Attila, Wacha András, Varga Zoltán

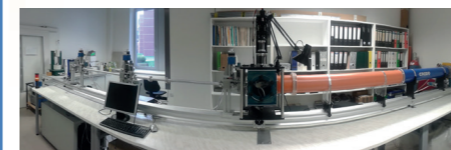
MTA TTK Biológiai Nanokémia Kutatócsoport
1117 Bp. Magyar Tudósok krt. 2.



A kisszögű röntgenszórás az oldott állapotú fehérjék és általában a nanorendszerek szerkezetvizsgálatának hatékony módszere. A pályázat támogatásával az általunk tervezett és épített CREDO (Creative Research Equipment for Diffraction) berendezés mintakezelési és mérési adatgyűjtő/feldolgozó környezetét fejlesztettük. (<http://credo.ttk.mta.hu>)

Fejlesztések

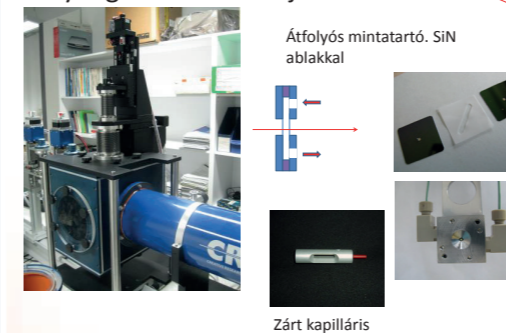
A minta – detektor távolság növelése:



➤ Nagyobb méretű objektumok mérése vált lehetővé

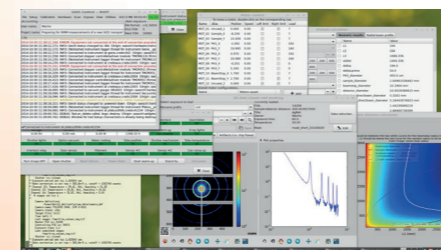
Egyedi zárású és átfolyós mintatartók építése:

➤ Gyengén szóró fehérje minták mérése



Adatgyűjtő és feldolgozó rendszer fejlesztése:

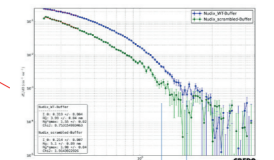
➤ Gyorsabb mérések, jobb jel/zaj arány, gyorsabb kiértékelés



Eredmények

Kooperációs kapcsolatok, szinergia

➤ Intézetben belül: nem rendezett fehérjék

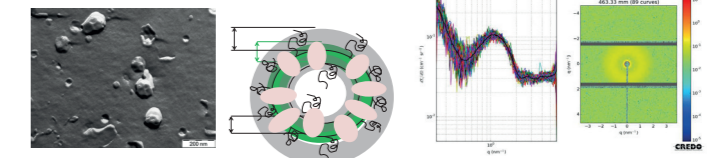


MEDinPROT Gépidő pályázat

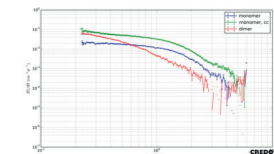
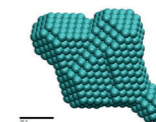


CREDO

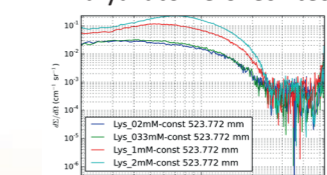
➤ Saját kutatások: vörösvértest membránból előállított vezikulák



➤ Intézetben kívül: polipeptidek Perczel A. /ELTE



➤ Pályázatok előkészítése:



Fehérjék kompaktasága és annak összefüggése az NMR módszerrel Bodor A. /ELTE

➤ Ipari kapcsolatok: RG

Irodalom:

A. Wacha, Z. Varga and A. Bóta: CREDO: A New General-Purpose Laboratory Instrument for Small-Angle X-ray Scattering, *Journal of Applied Crystallography*, 47 (2014) 1749-1754.
B. Söptei, J. Mihály, J. Visy, A. Wacha, and A. Bóta: Intercalation of Bovine Serum Albumin-Coated Gold Clusters between Phospholipid Bilayers: Temperature-Dependent Behavior of Lipid-AuQC@BSA Assemblies with Red Emission and Superlattice Structure, *Journal of Physical Chemistry B*, 118 (2014) 3887-3892.
R. Deák, J. Mihály, I. Cs. Szegvártó, A. Wacha, G. Lelkes, A. Bóta: Physicochemical characterisation of artificial nanoerythrocytes derived from erythrocyte ghost membranes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135 (2015), 225-234.
Köszönetnyilvánítás
A berendezés építését a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt (Dr. Demeter Ádám, Dr. Szombathelyi Zsolt, Dr. Thaler György) a Nemzeti Innovációs Hivatal által kezelt CNK 81052-es számú OTKA pályázat, valamint a 1.1.2-07/1-2008-0002 számú Középmagyarországi Operatív Program (KMOP) pályázat támogatta. A fehérjék mérésének bevezetését a MEDinPROT Szinergia I és Műszerpályázata tette lehetővé.

Fehérjekristallográfiai együttműködés az ELTE Kémiai Intézet kristályosító labor és röntgendiffraktométer felhasználásával

Együttműködésünk célja fehérjék és fehérjekomplexek szerkezet-meghatározása a szerkezet, kölcsönhatás-mintázatok és a fehérjefunkció összefüggéseinek felderítése céljából. Kristályosítottuk az aktivált és proenzim MASP-2 peptid inhibitorokkal alkotott komplexeit, az emberi és Plasmodium falciparum kalmomodulinnal alkotott komplexeket, és a sertés acilaminoacil-peptidázt. A diffraktométerrel végzett vizsgálatok nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy a szinkrotron sugárforrásnál jó minőségű adatkészletet gyűjtöttünk ezekről. Az MTA-TTK kutatócsoportjaival létesített új együttműködések keretében kristályosítottuk a Dj-1 fehérje komplexeit és elkezdtük a DAAO fehérje kristályosítását. Az S100 fehérjék komplexeinek kristályairól röntgendiffrakciós adatgyűjtést végeztünk - a szerkezetek meghatározása segített a komplexet nem tartalmazó kristályformák kiszűrésében.

Protein crystallography studies using the protein crystallization facility and X-ray diffractometer at ELTE Institute of Chemistry

The aim of our collaboration is to solve the structures of proteins and protein complexes for exploring the relationship between structure, interaction-patterns and protein function. Diffraction quality crystals were grown of activated and proenzyme MASP-2 in complex with peptide inhibitors, human and Plasmodium falciparum calmodulin in complex with a target peptide, and porcine acylaminoacyl peptidase. X-ray diffraction experiments on these crystals using the diffractometer greatly facilitated crystal optimization and collection of good quality diffraction data at synchrotron sources. In new collaborations with research groups of the HAS-RCNS we started crystallizing the Dj-1 and DAAO proteins. X-ray diffraction data collected from crystals of S100 protein complexes and solving the structures helped to identify undesired crystal forms containing the uncomplexed protein.



Fehérjekristallográfiai együttműködés az ELTE Kémiai Intézet kristályosító labor és röntgendiffraktométer felhasználásával

Együttműködő partnerek:

Gál Péter (MTA TTK, Szerkezeti Biofizika Kutatócsoport), **Liliom Károly** (MTA TTK, Lizofosfolipid Kutatócsoport),
Mező Gábor (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport), **Nyitrai László** (ELTE Biokémiai Tanszék),
Pál Gábor (ELTE Biokémiai Tanszék), **Reményi Attila** (MTA TTK, Fehérje Kutatócsoport (Lendület)),
Tory Kálmán (SOTE 1.sz. Gyermekklinika), **Vértessy G. Beáta** (MTA TTK Genom Metabolizmus Kutatócsoport, BME),
Harmat Veronika (ELTE Kémiai Intézet, MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport; a diffraktométer üzemeltetője)

Együttműködésünk célja fehérjék és fehérje komplexek szerkezet-meghatározása a szerkezet, kölcsönhatás-mintázatok és a fehérjefunkció összefüggéseinek felderítése céljából. Az ELTE Kémiai Intézetben található röntgendiffraktométer használata kétféle célt szolgál: Jó minőségű kristályokról akár 1 Å felbontású adatkészlet gyűjthető. Kis méretű vagy gyengén szóró kristályok esetén a diffraktométer tesztmérések elvégzésével, a kristályosító és krio-körülmények optimalizálásával, nem kívánt kristályformák kizárásával járul hozzá a külföldi, szinkrotronnal végzendő mérések sikeréhez. Több kutatási együttműködésben a kristályosítás is a Kémiai Intézetben történik.



Kristályosítás:

- MASP2-peptid komplexek (Gál P., Pál G., Mező G.)
- Humán és malária kalmomodulin peptid komplexe (Liliom K.)
- Emlős acilpeptid hidroláz komplexei (Harmat V.)
- Podocin coiled-coil fragmentumok (Tory K.)



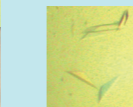
MASP-2 – peptid komplex kristályok



Malária és humán kalmomodulin-peptid komplex kristályai



Acilpeptid hidroláz kristályok

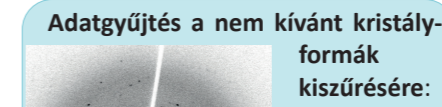


Kristályok további együttműködésből



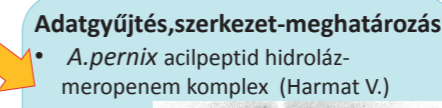
Tesztmérések:

- (Felkészülés szinkrotronnal történő adatgyűjtésre)
- MASP2-peptid komplexek (Gál P., Pál G., Mező G.)
 - S100 komplexek (Nyitrai L.)
 - Kalmomodulin-peptid komplexek (Liliom K.)
 - Emlős acilpeptid hidroláz (Harmat V.)



Adatgyűjtés a nem kívánt kristályformák kiszűrésére:

- S100B-p53 és Annexin A2-S100A4 komplex (Nyitrai L.)



Adatgyűjtés, szerkezet-meghatározás:

- *A. pernix* acilpeptid hidroláz-meropenem komplex (Harmat V.)

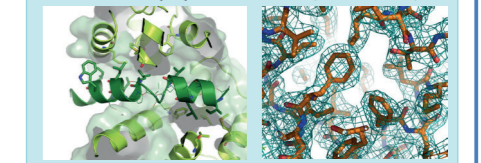


Biostruct-X pályázat, magyarországi kutatóhelyeket összefogó konzorcium: 2015-ben 11*8 óra röntgendiffrakció és 4*8 óra SAXS mérési idő európai szinkrotron sugárforrásoknál (A pályázat vezetői: Vértessy G. Beáta és Harmat Veronika)

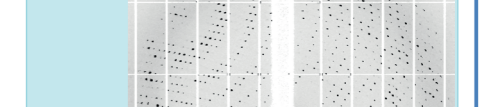


Röntgendiffrakciós adatgyűjtés, szerkezet-meghatározás:

- S100 komplexek (Nyitrai L.)
- MASP2-peptid komplexek (Gál P., Pál G., Mező G.)
- Humán és malária kalmomodulin peptid komplexe (Liliom K.)
- Emlős acilpeptid hidroláz (Harmat V.)



Malária kalmomodulin-peptid komplex Elektronműködési térkép (2,4Å felbontás)



Adatgyűjtés szinkrotronnál: emlős acilpeptid hidroláz (szerkezetmegoldás folyamatban)

Lineáris motívumok által dominált fehérje kölcsönhatások felületi plazmon rezonancia-alapú mérése

A felületi plazmon rezonancia (Surface Plasmon Resonance, SPR) univerzális lehetőséget biztosít fehérje-komplexek kialakulásának, megszűnésének, szelektivitásának és erősségének valósidejű vizsgálatára.

Az ELTE Természettudományi Kar Központi Kutató és Műszercentruma rendelkezik egy nagy áteresztőképességű ProteOn XPR36 típusú SPR készüléssel, amely ragyogóan alkalmas nagyszámú kölcsönhatásmérés gyors elvégzésére.

A MedinProt támogatásával létrejött, széleskörű együttműködés keretében nagyszámú olyan mérést végeztünk el az LC8 dinein könnyűlánc, a mitogén-aktivált protein kinázok és a metasztázis-asszociált S100A4 fehérjék körében, mely kölcsönhatásokat egy-egy lineáris motívum dominálja.

Surface plasmon resonance-based characterization of linear motif dominated protein interactions

Surface Plasmon Resonance (SPR) provides a universal platform for real time determination of the formation, dissociation, selectivity and stability of protein complexes.

The Research and Instrument Core Facility of ELTE Faculty of Science has an excellent high-throughput SPR instrument, ProteOn XPR36, which is capable of quickly measuring large numbers of protein interactions.

With the support of MedinProt we started a widespread collaboration to study protein interactions that are dominated by a linear motif and conducted large numbers of SPR measurements involving the LC8 dynein light chain; mitogen activated protein kinases and the metastasis associated S100A4 protein.

Lineáris motívumok SPR-alapú kölcsönhatásmérése

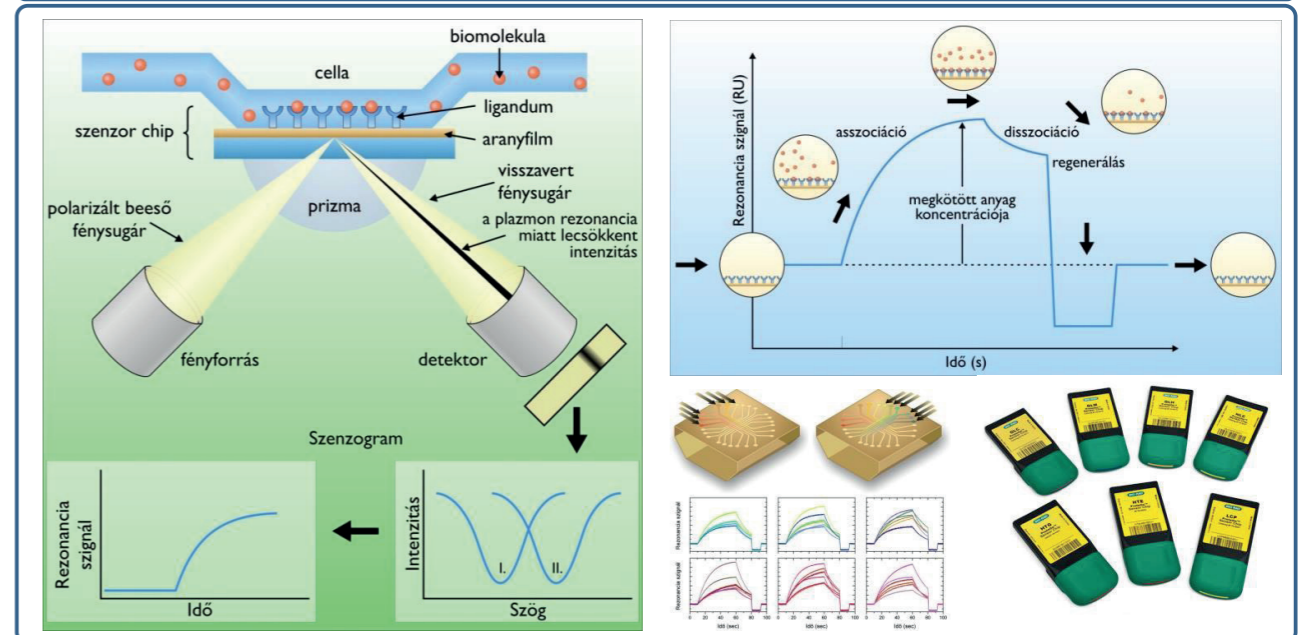


Pál Gábor, PhD,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
gabor.pal@ttk.elte.hu

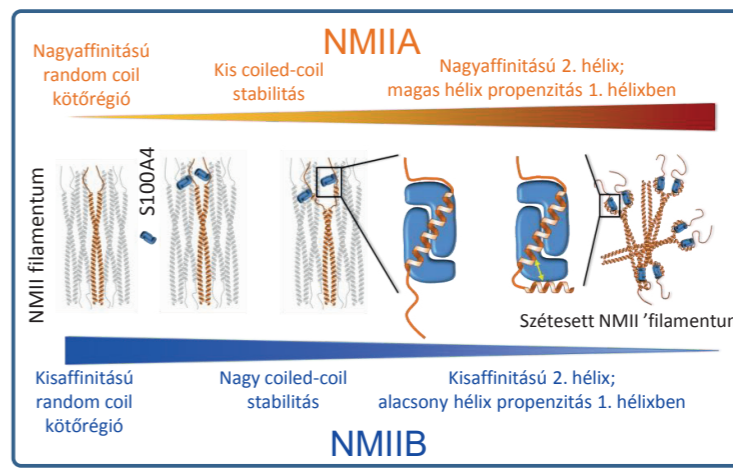


Dosztányi Zsuzsanna, PhD,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
dosztanyi@caesar.elte.hu

A felületi plazmon rezonancia (SPR) univerzális eljárás fehérje-komplexek kialakulásának, megszűnésének, szelektivitásának és erősségének valósidejű vizsgálatára. Az ELTE TTK KKMC ProteOn XPR36 típusú SPR készüléke ragyogóan alkalmas ilyen kölcsönhatások mérésére. A MedInProt támogatásával létrejött együttműködésünkben olyan kölcsönhatásokat mértünk az LC8 dinein könnyűlánc, a mitogén-aktivált protein kinázok és a metasztázis-asszociált S100A4 fehérjék körében, amelyeket egy-egy lineáris motívum dominál.



Reményi Attila, PhD,
MTA TTK
Enzimológiai Intézet,
remenyi.attila@ttk.mta.hu



Nyitrai László, DSc,
ELTE TTK Biológiai Intézet,
Biokémiai Tanszék,
nyitrai@ttk.elte.hu

Fehérje-ligandum és fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata NMR spektroszkópiával

Az NMR spektroszkópia a fehérje kölcsönhatások vizsgálatának hatékony eszköze. Előnye, hogy a molekuláris kölcsönhatásoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusát képes megvilágítani, és az általa nyert atomi-szintű információ összefüggésbe hozható makroszkopikusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel. A jelen pályázat keretében két rendszert, a neurodegeneratív megbetegedésekkel összefüggésbe hozható alfa-szinukleint, valamint a koleszterinszint szabályozásában szerepet játszó humán epesav-kötő fehérje kölcsönhatásait tanulmányozzuk.

Investigation of protein-ligand and protein-protein interactions by NMR

NMR spectroscopy plays a unique role in structural biology by providing both structural and dynamic information on biomolecules and their interactions. Its further advantage is that the microscopic atomic-level information obtained by NMR can be related to macroscopically measurable thermodynamic and kinetic parameters. Within the framework of the current grant we investigate two systems: alpha-synuclein associated with neurodegenerative diseases and human ileal bile acid-binding protein known to have a role in the maintenance of cholesterol homeostasis.

Fehérje kölcsönhatások vizsgálata NMR spektroszkópiával



Tőke Orsolya^{a*}, Oláh Judit^b, Ovádi Judit^b



^aMTA TTK SZKI NMR Kutatócsoport, ^bMTA TTK EI Sejtarchitektúra Kutatócsoport

Az NMR spektroszkópia a fehérje kölcsönhatások vizsgálatának hatékony eszköze. Előnye, hogy a molekuláris kölcsönhatásoknak mind a szerkezeti, mind a dinamikai aspektusát képes megvilágítani. Szintén fontos szempont, hogy segítségével molekuláris mozgások rendkívül széles időskálán tanulmányozhatók, és az általa nyert atomi-szintű információ összefüggésbe hozható makroszkopikusan mérhető termodinamikai és kinetikai paraméterekkel. A jelen pályázat keretében két rendszert, a neurodegeneratív megbetegedésekkel összefüggésbe hozható alfa-szinukleint, valamint a koleszterinszint szabályozásában szerepet játszó humán epesav-kötő fehérje kölcsönhatásait tanulmányozzuk.

**SEJTBOLÓGIA
GYÓGYSZERKUTATÁS**

Orsolya Tőke, Ph.D., D.Sc.
MTA TTK EI

- neurologiai betegségek pathomechanizmusa
- ultrastrukturák szerkezeti és funkcionális vizsgálata molekuláris és sejt szinten



**NMR
SPEKTROSKÓPIA**

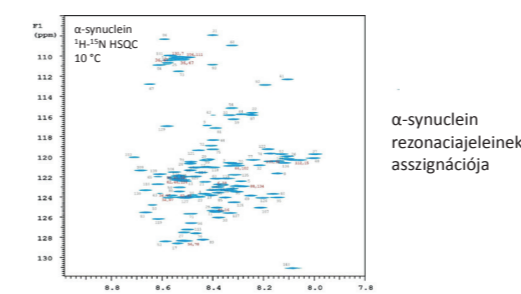
Tőke Orsolya, Ph.D.
MTA TTK SZKI

- fehérje-ligandum, fehérje/peptid-membrán kölcsönhatások
- lipidkötő fehérjék
- belső molekuláris mozgások NMR spektroszkópiai és biofizikai vizsgálata

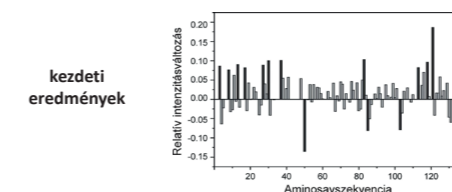
ALFA-SZINUKLEIN-TPPP/p25 kölcsönhatás

- TPPP/p25 (tubulin polymerization promoting protein): patológias körülmények között kölcsönhat az alfa-szinukleinnel, ami zárványtestek képződéséhez vezet
- humán agyszövetben a két fehérje kolokalizációt mutat, amely karakterisztikus a Parkinson-kórra és más synucleinopátiákra

Cél: kontaktfelület jellemzése, lehetséges konformációs állapot(ok) azonosítása



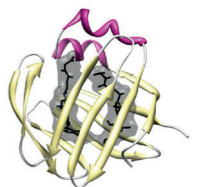
rezonanciajelek intenzitásának változása csonkolt TPPP/p25 jelenlétében:



Folyamatban: kísérleti körülmények optimalizálása a kölcsönhatás tanulmányozásához

HUMÁN EPESAV-KÖTŐ FEHÉRJE

- 14.2 kDa
- β-hordó szerkezet
- ~1000 Å³ kötőüreg a „hordó” belsejében
- sztoichiometria: 1:2
- pozitív kooperativitás a kötőhelyek között
- kötőhely szelektivitás
- ms konformációs mozgás az apo fehérjében, amely ligandumkötődés hatására megszűnik

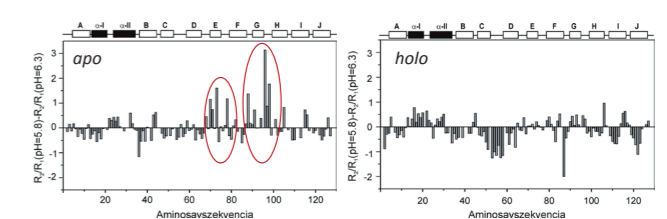


Ligandumkötődés pH-függése

pH csökkenésével

- a kumulatív affinitás kismértékben nő, a pozitív kooperativitás csökken (ITC)
- a kötődés első kinetikai lépésének sebességi állandója nő (stopped-flow)

¹⁵N R₁, R₂ NMR relaxációs sebességek tanulmányozása



A ¹⁵N relaxációs sebességek μs-ms konformációs mozgás jelenlétére utaló R₂/R₁ hányadosa az EFGH portál régióban pH csökkenés hatására az apo fehérjében szignifikánsan emelkedik.

Összhangban a korábban találtakkal (*Biochemistry* 51:1848 (2012), 53:5186 (2014)) az EFGH béta-szálakban legintenzívebb ms konformációs mozgás segíti a ligandumok kötőüregbe jutását. A nyitott és zárt konformációs állapot közötti egyensúlyt a pH csökkenése a kötődésnek kedvező nyitott állapot irányába tolja el.

Folyamatban: a kis populációban jelen levő nyitott konformációs állapot szerkezeti jellemzése

Fehérjék poszttranszlációs módosulásainak felderítése nagyfelbontású tandem tömegspektrometria alkalmazásával.

A közös kutatómunka célja egy gyulladáshoz vezető autoimmun betegség, a Rheumatoid arthritis esetén diagnosztikai jelentőséggel bíró fehérjék poszttranszlációs módosításainak vizsgálata. Célunk elsősorban a fehérjecitrullináció és glikoziláció feltérképezése, amelyhez modellpeptideket, enzimkinetikai és tandem tömegspektrometriás méréseket használunk. Az MTA Természettudományi Kutatóközpont rendelkezésére álló nagyfelbontású kvadrupol-repülési idő típusú tandem tömegspektrométer nagy érzékenységet és nagy felbontást kívánó proteomikai méréseket tesz lehetővé, amellyel igen kis anyagmennyiségű minta is analizálható.

Identification of posttranslational modifications of proteins using high resolution tandem mass spectrometry.

The aim of the study is the analysis of posttranslational modifications of proteins, which are involved in Rheumatoid arthritis. Our aim is the detailed study of protein citrullination and glycosylation, using synthetic peptide models, enzyme kinetics measurements and tandem mass spectrometry. The high resolution, quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometer installed at the Research Center of Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, has high sensitivity and high mass resolution needed for the proteomic analysis of samples in low quantities.

Nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket igénylő fehérjeanalitikai vizsgálatok

MedInProt gépidő felhasználási pályázat

A pályázók:



Vékey Károly, Ph.D., D.Sc.

tudományos tanácsadó
MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrumának vezetője

Kutatási területe az analitikai és fizikai kémia, tömegspektrometria, kromatográfia. Szerkezetvizsgálatok (szerves és bioorganikus vegyületek, biopolimerek); proteomika; klinikai-kémia (tömegspektrometrián alapuló új diagnosztikai eljárások kifejlesztése); gyógyszerkutatás (metabolitkutatás, farmakokinetika, szennyezésprofil meghatározása); élelmiszeranalitika. A tömegspektrométerben lejátszódó fragmentációs folyamatok elméleti modellezése.



Sármy Gabriella, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár
Immunológiai Tanszék, ELTE Biológiai Intézet

Kutatási területe a B sejt immunválasz szabályozása, a B sejteken kifejeződő receptorok által stimulált jelátviteli folyamatok és a receptorok közötti "párbeszéd" tanulmányozása. B sejt funkciók és autoreaktív ellenanyagok vizsgálata rheumatoid arthritisben.



Schlosser Gitta, Ph.D.

tudományos munkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet

Kutatási területe a tömegspektrometriás módszerek kidolgozása és alkalmazása fehérjék és peptidek szerkezetvizsgálatára, fehérjék poszttranszlációs módosításainak meghatározására, proteomikai és klinikai diagnosztikai kutatások.

Kutatási témák, publikációk:

Magyar A, Gyulai G, Pozsgay J, Schlosser G, Uray K, Szarka E, Rojkovich B, Nagy Gy, Kiss É, Sármy G and Hudecz F: Identification and targeting by citrulline containing B-cell epitope peptides related to rheumatoid arthritis as recognition unit with nanoparticles. 23rd Polish Peptide Symposium, Spala, Lengyelország, 2015. augusztus 30.-szeptember 3.

Sármy G, Pozsgay J, Magyar A, Uray K, Gyulai G, Kiss É, Rojkovich B, Nagy Gy, Hudecz F: Rheumatoid arthritis betegek citrullinált fehérjékre specifikus autoreaktív B sejteinek szelektív elpusztítása citrullin tartalmú és komplement aktiváló peptidekkel fedett nanorészecskék segítségével. Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2015. május 20.

Gyulai G, Magyar A, Schlosser G: Peptidekkel módosított felületű nanorészecskék szintézise, tömegspektrometriás analízise. Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2015. május 20.

Schlosser G, Knapp K, Majer Zs: Szulfhidril-csoportok azonosítása peptidekben fluoreszcens jelzés és tandem tömegspektrometria kombinálásával. MKE II. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, 2015. augusztus 31.- szeptember 2.

Tóth E, Hevér H, Ozogánics O, Telekes A, Vékey K, Drahos L: Simple correction improving long-term reproducibility of HPLC-MS. *J. Mass Spectrom.* 50: 1130-1135 (2015)

Knapp K, Majer Zs, Schlosser G: Combination of fluorogenic tagging and tandem mass spectrometry for monitoring sulfhydryl groups in peptides. *Közlésre benyújtva.*

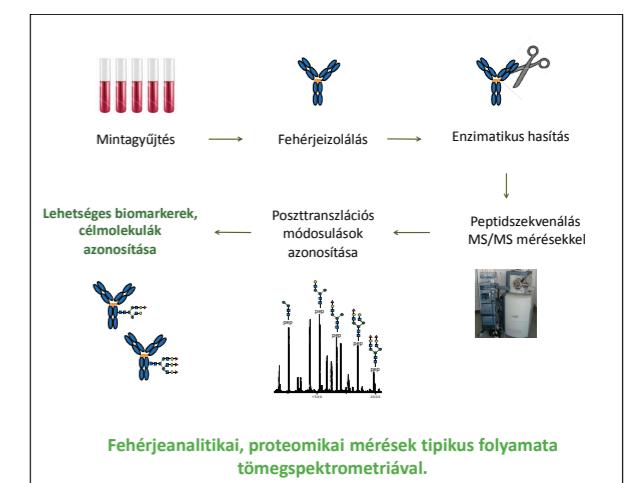
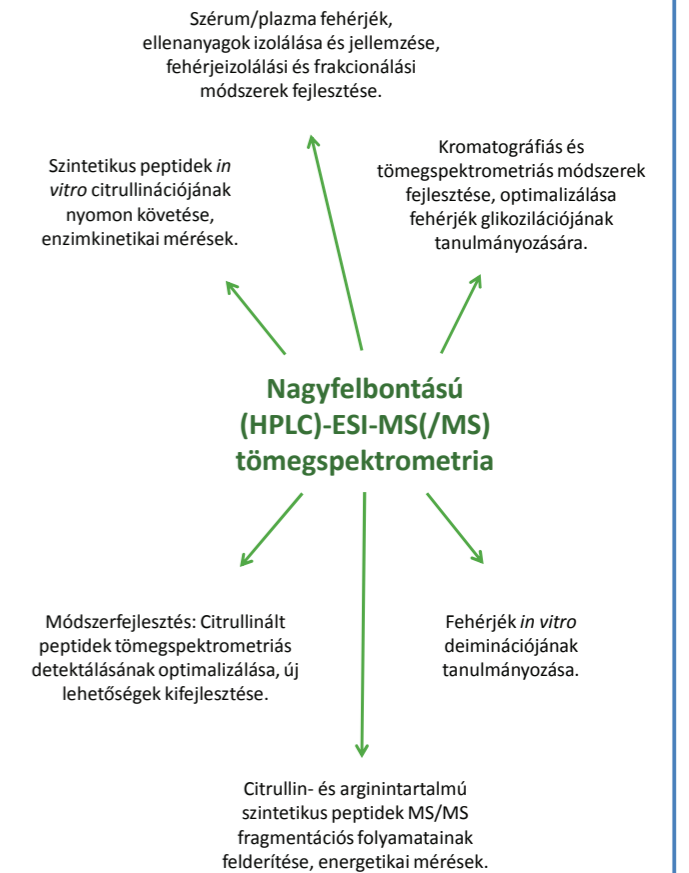
Bíri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Köhidai L, Fésüs L, Nyitray L: Metastasis-associated S100A4 is an interacting partner and a specific amine substrate of tissue transglutaminase-2. *Közlésre benyújtva.*

Pozsgay J, Babos F, Uray K, Magyar A, Gyulai G, Kiss É, Nagy Gy, Rojkovich B, Hudecz F, Sármy G: In vitro eradication of citrullinated protein specific B-lymphocytes of rheumatoid arthritis patients by targeted bifunctional nanoparticles. *Közlésre benyújtva.*

Köszönetnyilvánítás:

Dr. Schlosser Gitta munkáját az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.

Fontos kísérleti irányok:



A Biostruct laboratórium szerepe makromolekulák, kismolekulák és komplexeik vizsgálatában: egyedi infrastruktúra a fehérjetudomány szolgálatában

A Biostruct laboratórium egyedülálló infrastruktúrával segíti a molekuláris élettudományok fejlődését: makromolekulák, kismolekulájú ligandumok és ezek komplexeinek háromdimenziós térszerkezetét határozza meg röntgendiffrakciós analízis útján.

A laboratórium a házi sugárforrás kapcsán mikrofókuszos sugárforráshoz társított érzékeny detektorral rendelkezik, a vizsgálatok folyékony nitrogénáramban mennek végbe. A kristályosítást automatizált kristályosító robot (Mosquito) és a kristályképződést folyamatosan követő UV-VIS mikroszkópos egység (Formulatrix Rock Imager) segíti.

A Medinprot támogatás számos új 3D térszerkezet meghatározását tette lehetővé.

The Biostruct laboratory provides a unique combined infrastructure for 3D structure determination of macromolecules, small ligands and complexes via X-ray diffraction. The laboratory possesses a microfocus SuperNova beam source, with a sensitive detector, and enables investigations under liquid nitrogen stream. A Mosquito robot and a Formulatrix UV-VIS Rock Imager hotel enables to overcome the bottleneck in crystal preparation. The Medinprot funding constituted essential contribution to determination of several novel 3D structures.

Biostruct Laboratórium: az élettudományok szolgálatában Makromolekulák, komplexek és kismolekulák kristályosítása és krisztallográfiája



Vértessy Beáta és munkacsoportja

Tudományterület: genom metabolizmus

Uracil a DNS-ben: élettani szerep,
molekuláris mechanizmusok

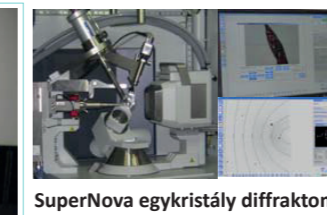


MTA TTK Enzimológiai Intézet és
BME Alkalmazott Biotechn. és Élelmiszertudományi Tanszék

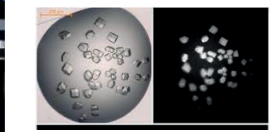
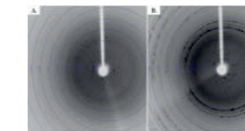


Műszerpark

BME CH épület
Biostruct laboratórium
Budapest, 1113 Szt Gellért tér 4
E-mail: vertessy@kutatok.org, leveles@mail.bme.hu

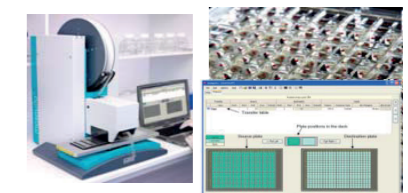


SuperNova egykristály diffraktométer



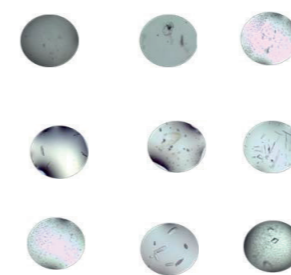
VIS UV

Képkalkító rendszer Rock Imager

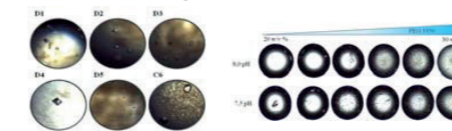


Mosquito
kristályosító
robot

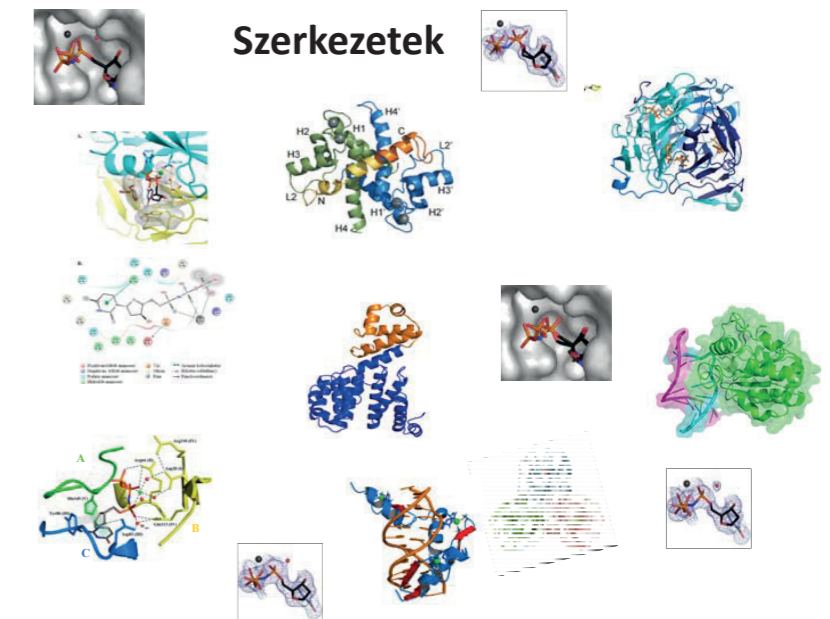
Kristályok



Optimalizálás



Szerkezetek



Publikációk

Róna G et al Cell Cycle. 2014;13(22):3551-64.

Róna G, et al Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014 Oct;70(Pt 10):2777-8.

Nagy GN et al Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Dec 1;53(49):13471-6.

Róna G, et al FEBS J. 2014 Dec;281(24):5463-78.

Szabó JE, et al Nucleic Acids Res. 2014 Oct 29;42(19):11912-20.

Nagy GN, et al FEBS J. 2014 Sep;281(18):4207-23.

Hirmondó R, et al DNA Repair (Amst). 2015 Jun;30:21-7. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.03.005.

Marton L, et al PLoS One. 2015 Jun 17;10(6):e0129632. doi: 10.1371/journal.pone.0129632

Horváth A, et al FEBS J. 2015 May;282(10):1998-2013. doi: 10.1111/febs.13255

Csaba, Á et al Cell Commun and Signaling. 2015, 13:33

Biri B, et al. Biochem J., Oct 20, 2015, ; DOI: 10.1042/BJ20150843

Gógl G, et al J. Biol. Chem., in press

Róna G, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013 Dec;69(Pt 12):2495-505.

Róna G, et al Nucleic Acids Res. 2015 Oct 1. pii: gkv977.

Bioruptor: a kromatin-immunoprecipitációhoz használt ultrahangos szonikátor

Arányi Tamás¹, Réthelyi János², Vető Borbála¹

¹MTA TTK Enzimológiai Intézet

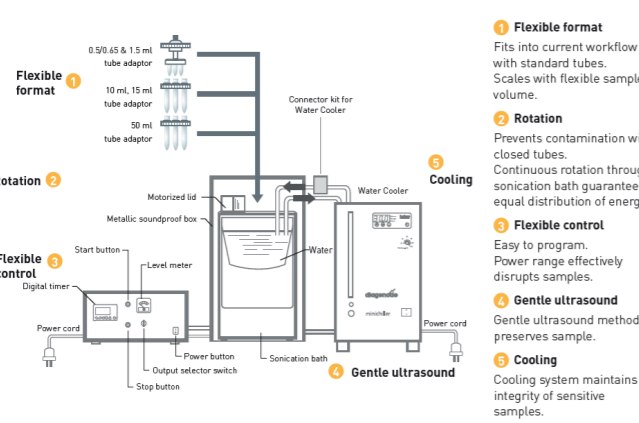
²Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, MTA TKI, Molekuláris Pszichiátriai Kutatócsoport



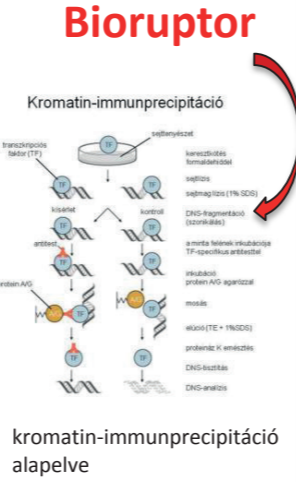
Az elnyert műszer egy "Bioruptor® Plus sonication device for 1.5 & 15 ml tubes" és egy azt kiegészítő "Water Cooler". A műszer egy programozható ultrahangos szonikátor, mely a vízfürdő segítségével hőszabályozható is. A műszer alapvető fontosságú ahhoz, hogy standard körülmények között preparálhassunk/fragmentálhassunk munkánk során kromatint.



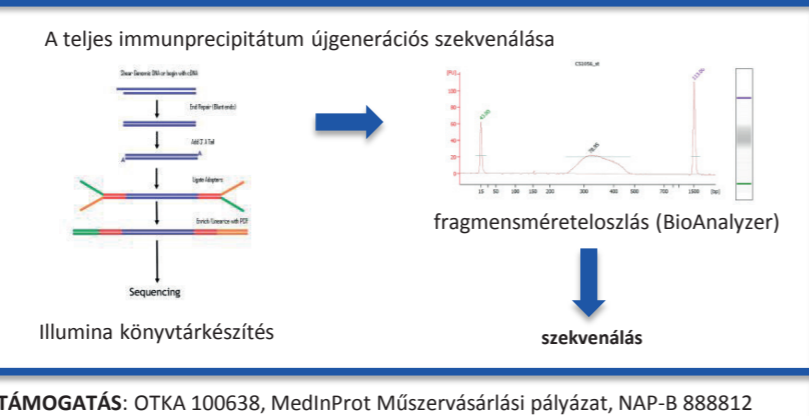
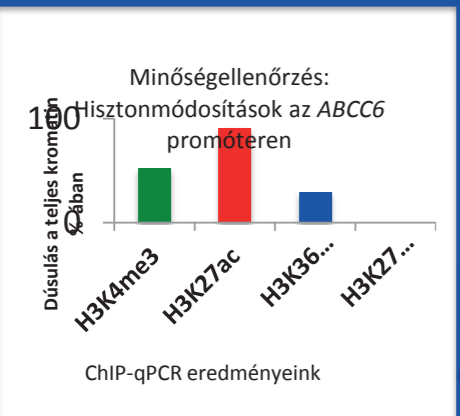
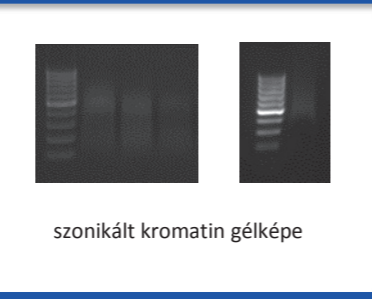
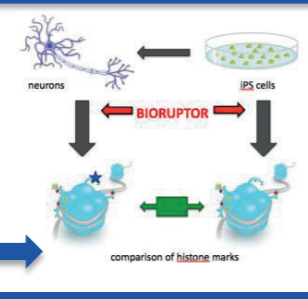
A.T. R.J. V.B.
Bioruptor felhasználók



Bioruptor működési elve (forrás: www.diagenode.com)



CÉLKITŰZÉS:
Munkánk során azt tanulmányozzuk, hogy különböző sejtekben a környezeti tényezők megváltozásának hatására hogyan alakul a transzkripciós faktorok DNS kötődési mintázata, továbbá arra is kíváncsiak vagyunk, hogy miképpen változik a kromatin szerkezete. Ez utóbbiról a hisztonok kovalens módosításainak mintázata nyújt felvilágosítást. Tanulmányainkat kromatin-immunoprecipitációs (ChIP) technikával végezzük, melyhez a kromatin megfelelő preparálása/fragmentálása szükséges a Biolruptor segítségével. Együttműködésünk során azt tanulmányozzuk, hogy a neuronális differenciáció során milyen kromatinváltozások figyelhetők meg.



TÁMOGATÁS: OTKA 100638, MedInProt Műszervásárlási pályázat, NAP-B 888812

Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamatban Műszervásárlási pályázat

Dr. Vellai Tibor
(ELTE Genetikai Tanszék)



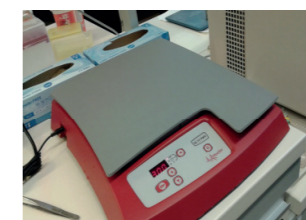
Dr. Sőti Csaba
(SE OVI Stressz Csoport)
<http://stresssgroup.semmelweis.hu>



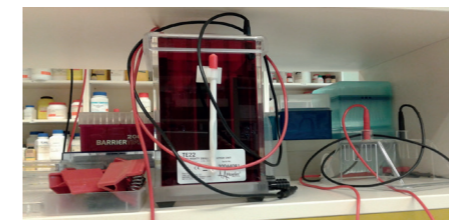
Dr. Bánhegyi Gábor
(SE OVI ER Redox Csoport)
<http://erredox.semmelweis.hu>



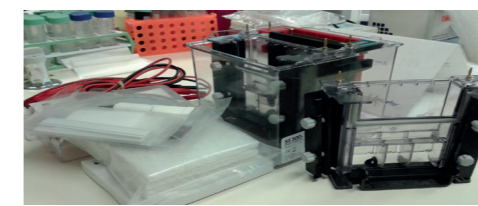
Transzferáló készülékek (Mighty small transphor with power supply, Mighty small transphor without power supply, chamber for wet blotting):
A további vizsgálatokhoz a megfuttatott géleket membránra történő áttranszferálása válik meg. Kísérleteinkhez mind fél-száraz mind nedves transzferáló készülékre szükségünk lenne. Míg a fél-száraz módszer a kisebb tömegű (10-75 kDa), addig a nedves transzfer a nagyobb tömegű (75-250 kDa) fehérjék gélről a membránra történő ájtuttatásához nélkülözhetetlen.



Sejtszámláló (Luna Automated Cell Counter):
Az automatizált sejtszámlálóval az általunk vizsgált sejteket rövid idő alatt tudjuk megszámlálni. Ez különösen fontos, mert sokszor 15-20 sejt-mintát is egyszerre kell vizsgálnunk. A készülék ugyancsak képes az élő és halott sejtek külön-külön történő megszámlálására.



Gélelektroforézis készülék (Mini VE complete):
A fehérje futató készülék alkalmas különböző sejtekből, szövetekből izolált fehérjék, méret, töltés stb. alapján történő elválasztására. Az elválasztott fehérjékből Westernblot technikával különböző kémiai ágensekkel történő kezeléseket eredményt tudjuk vizsgálni. Ezzel új eredményeket érhetünk el a sejtek működésének megértésében.



Gélelektroforézis készülék (Mighty small II complete):
A fehérje futató készülék alkalmas különböző sejtekből, szövetekből izolált fehérjék, méret, töltés stb. alapján történő elválasztására. Az elválasztott fehérjékből Westernblot technikával különböző kémiai ágensekkel történő kezeléseket eredményt tudjuk vizsgálni. Ezzel új eredményeket érhetünk el a sejtek működésének megértésében.

Elhelyezés: Semmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, 2. emelet, 2.117. labor
Kapcsolattartó: Dr. Bánhegyi Gábor, banhegyi.gabor@med.semmelweis-univ.hu, 266 26 15/60100

Áramlási hipoxiás sejtenyésztőrendszer beszerzése és beállítása a gyulladás egy új mechanizmusának leírásához

Gál Péter, Cervenak László, Pál Gábor



Gál Péter
MTA TTK Enzimológiai Intézet



Cervenak László
Semmelweis Egyetem,
III. Sz. Belgyógyászati Klinika



Pál Gábor
ELTE TTK Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék



Háttér

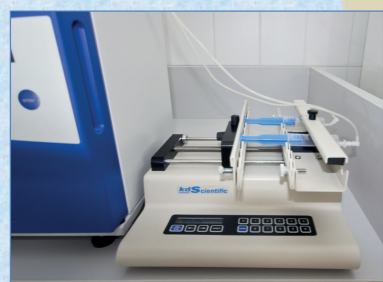
A Medinprot szinergia pályázat első fordulónak nyerteseként megvizsgáltuk a MASP-1 hatását az endotélsejtek adhéziós molekula expressziós mintázatára, és elemeztük a MASP-1 specifikus gátló szerének (SGMI-1) hatását is. A szinergia pályázat segítségével kimutattuk, hogy a MASP-1 hatására az endotélsejtek felszínén megjelenik az E-szelektin adhéziós molekula, amely nélkülözhetetlen minden fehérvérsejt irányított kitapadásának első lépésében, az endotéliumon való gördülésben, valamint hogy a MASP-1 összes eddig vizsgált

hatása gátolható az SGMI-1-gyel. Statikus rendszerben kimutattuk, hogy a neutrofil granulociták kitapadása erősebb a MASP-1 előkezelt endotélsejtekhez, mint a kezeletlenekhez. Azonban a szervezetünkben, *in vivo* az endotélsejtek és a leukociták interakciója áramlási körülmények között zajlik le, így szükségessé vált az eredmények további vizsgálata egy *in vitro* áramlási rendszerben is, valamint olyan körülmények között, ahol a hipoxia kialakításával a MASP-1 szerepe vizsgálható az ateroszklerózis modellrendszerében.

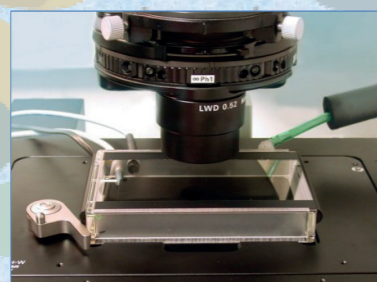
A beszerzett műszer

Az *in vitro* áramlási és hipoxiás vizsgálatokhoz a szükséges műszert két alegységből állítottuk össze. Az egyik egy infúziós pumpa (KDS 230), amely egyszerre akár 10 párhuzamos áramlási rendszert is tud működtetni több napos kísérletben. A másik egy, már meglévő mikroszkópra szerelhető, sejtenyésztő kamra (Ibidi Heating System), amelyben a standard

sejtenyésztő feltételek mellett a teljes hipoxia is beállítható (Ibidi Gas Mixer, Ibidi Temperature Controller). Bár a két alrendszer egymástól függetlenül is használható, célunk volt, hogy a két alegység összeépíthető legyen, így a lehető legjobban lehessen modellezni a fiziológiás és a patológiás folyamatokat.



KDS 230 infúziós pumpa



Ibidi mikroszkópos kamra



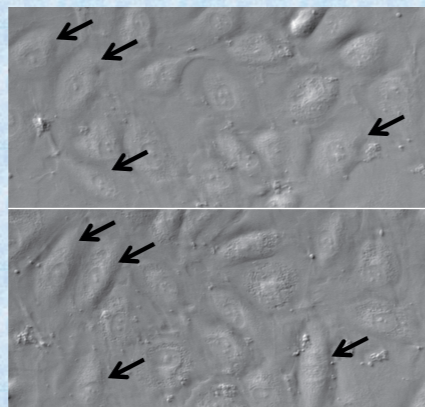
Ibidi Gas Mixer & Temp Controller

Eredmények

A műszerek beszerzése rendben megtörtént. Hosszabb időt vett igénybe a mikroszkópos helyiség átalakítása, a szükséges egyéb berendezések beszerzése és beüzemelése (CO₂ és N₂ gázpalackok helyének kialakítása, reduktorok beszerzése, polcrendszer kiépítése), és a teljes rendszer összeépítése.

Az infúziós pumpa és a mikroszkópos kamra összeszerelésével sikerült egy komplex rendszert létrehozni. Ezen körülmények között az endotélsejtek több napig életképesek voltak. Teszteltük a sejtek alakváltozását az áramlás függvényében. Az irodalmi adatoknak megfelelően a statikus körülmények között tartott sejtek „kockakő” morfológiája átalakult, és az áramlás irányában megnyúlt. A MASP-1 kezelés a sejtek morfológiáját nem változtatta meg áramlási körülmények között. A hipoxia az endotélsejtek leválását okozta a sejtenyésztő felszínről. Az elhúzó beüzemelés miatt a MASP-1 hatásának tesztelését hipoxiás körülmények között még nem tudtuk elkezdni. A műszer jövőbeni kihasználtsága azonban biztosított, mivel a MedinProt Műszerpályázatának terve, és az itt elnyert műszer képezte az alapját annak az OTKA pályázatnak (NKFI K115623), amit a három résztvevő közösen nyújtott be, és 2016.01.01-i kezdési időponttal megnyert.

Statikus (fent) és áramlási (lent) körülmények között tartott endotélsejtek morfológiája. A fekete nyilak az áramlás hatására megnyúlt sejteket mutatják.



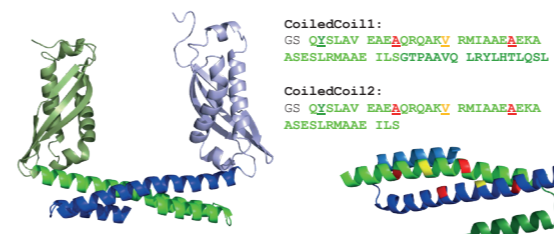
Ultramélyhűtő használata a podocin szerkezetvizsgálatában

Harmat Veronika
ELTE Kémiai Intézet,
MTA-ELTE Fehérje-modellező Kutatócsoport



Tory Kálmán
SOTE I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika
Genetika Munkacsoport

A podocin a vese glomeruláris filtrációs rendszerének fontos alkotóeleme. Mutációi autoszomális recesszíven öröklődő nefrózist okoznak. Együttműködésünk egyik célja a podocin variánsok eltérő működését magyarázó szerkezeti alapok megértése. Az ultramélyhűtő lehetővé teszi az NMR és CD spektroszkópiai és kristallográfiai vizsgálatok számára előállított nagyszámú fehérjeminta, valamint a DNS-konstrukciók és fehérjeminták előállításához nélkülözhetetlen baktériumsejtek tárolását.



A podocin-homodimer globuláris SPFH doményének (szürkészöld és szürke) és coiled-coil (zöld és kék) doményének homológiamodellje

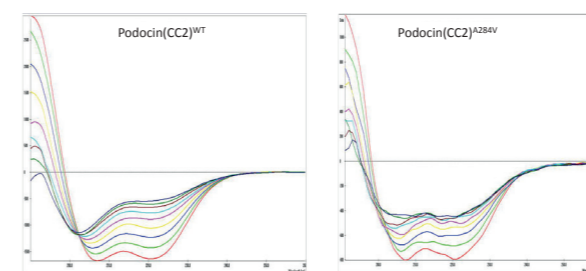
Az első vizsgált mutációk (piros: patogén, sárga: ártalmatlan) helye a coiled-coil régióban

Az előállított fehérjekonstrukciók: globuláris (SPFH) domén, SPFH-CC1, SPFH-CC2, CC1, CC2
Felhasznált fúziós rendszerek: lizozim, MBP és GST



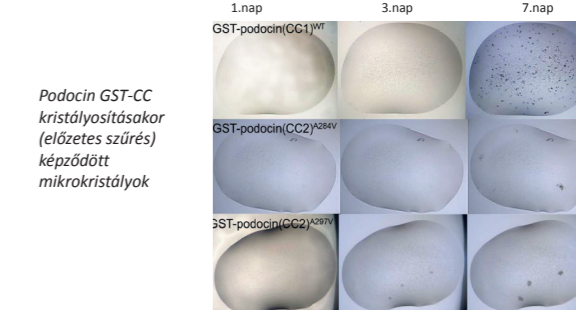
Vizsgálati módszerek: CD és NMR spektroszkópia, kristallográfia

A CC domén hőstabilitásának ECD spektroszkópiai vizsgálatával kimutattuk, hogy az A284V, A297V, V290M mutációk jelentős hőstabilitás-csökkenést okoznak.



A vad típusú és A284V podocin CC2 278K (piros) és 318K (sötétkék) között mért hőmérsékletfüggő ECD spektrumai

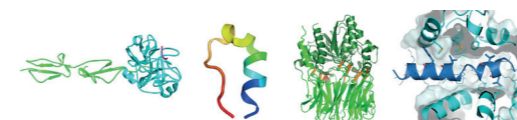
A vad típusú, A284V és A297V podocin CC doménye fehérjekristallográfiai vizsgálatát a kristályosodási hajlam növelése érdekében GST fúziós partnerrel végezzük.



Podocin GST-CC kristályosításakor (előzetes szűrés) képződött mikrokristályok

Tervek, folyamatban lévő további vizsgálatok

- Az NMR vizsgálatok kiterjesztése más konstrukciókra.
- További mutációk hatásának vizsgálata
- A globuláris domént is tartalmazó fragmentumok kristályosítása



Az ultramélyhűtő használata más együttműködésekben (DNS konstrukciók, sejtek és/vagy tisztított fehérjeminták tárolása)

- A GLP-1 receptor és kölcsönható peptidok (exendin-4 származék minifehérjék) szerkezetvizsgálata
- Malária és emlős kalmodulin komplexének szerkezetvizsgálata (Liliom Károly, MTA TTK)
- MASP-2 peptid inhibitoraival alkotott komplexek szerkezetvizsgálata (Gál Péter, MTA TTK, Pál Gábor, ELTE Biokémiai Tanszék, Mező Gábor, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)
- Oligopeptidázok szerkezetvizsgálata

KIS ESZKÖZTÁMOGATÁS



Live cell confocal fluorescence microscopic (LC-CLSM) imaging of tunnelling nanotube networks (TNTs) between B lymphocytes and the neutrophil extracellular traps (NETs)*



Group of Prof. Dr. János Matkó
Eötvös Loránd University, Faculty of Science, Institute of Biology, Department of Immunology, Budapest, Hungary

Anikó Molnár, Eszter Angéla Tóth, Ádám Oszvald



Group of Dr. Mihály Józsi
MTA-ELTE Lendület Complement Research Group at Eötvös Loránd University, Institute of Biology, Budapest, Hungary

Andrea E. Schneider, Éva Kárpáti

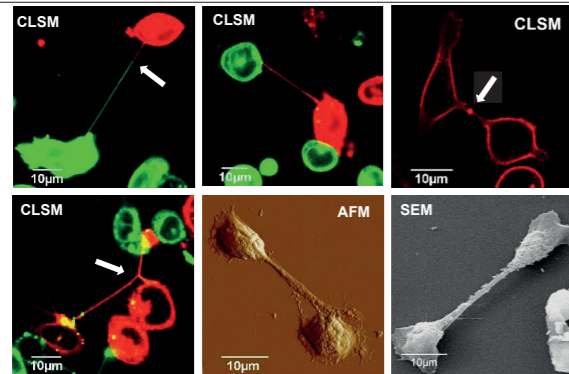
The aim of the MedInProt 2014 project was to set up a flexible, temperature controlled gas incubation system to our confocal laser scanning fluorescence microscope (CLSM) in order to be able to monitor various special processes between cells of the immune system and/or the complement system, such as intercellular communication of lymphocytes through tunnelling membrane nanotubes (TNTs) or formation of neutrophil extracellular traps (NETs) and their regulation by the complement factors under live cell conditions.



The system: *Ibidi (Germany)* can receive different formats of sample holders, such as borosilicate bottomed microplate chambers or Petri dishes, controls the temperature in the holder with $\pm 0,1$ °C precision and provides controlled gas atmosphere (e.g. 5% CO₂ or hypoxic conditions) at controlled humidity. The system was attached to an Olympus FluoView 500, inverted IX81 microscope based CLSM workstation (see figure). Nanotube and NET formation was monitored and analysed with the above Olympus CLSM system using 60x oil immersion objective (N.A.:1.1) or occasionally Structured Illumination Microscopy (SIM) (Zeiss Elyra S1) at PTE Biophysics Dept. Pécs. Statistical analysis: the occurrence frequencies were calculated from 200-400 cells/sample and analyzed by SigmaPlot software.

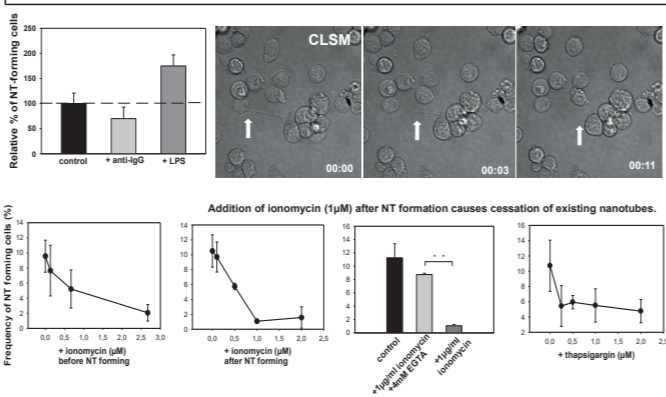
RESULTS:

1. We have shown that 10-15% of mature murine B cells spontaneously form long and relatively wide membrane nanotubes with different mechanisms (e.g. following cell division), under live cell conditions (fibronectin coat, 37°C, 5%CO₂). NT growth was critically depended on the fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction. We could first detect two way transport of membranous microvesicles between adjacent B cells through the nanotubes, which in antigen-presenting B cells may represent a novel immunoregulatory pathway.

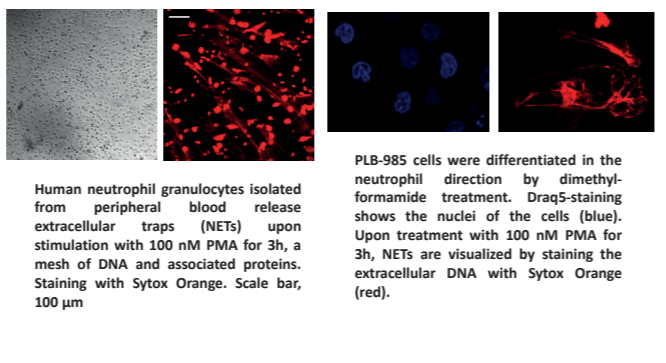
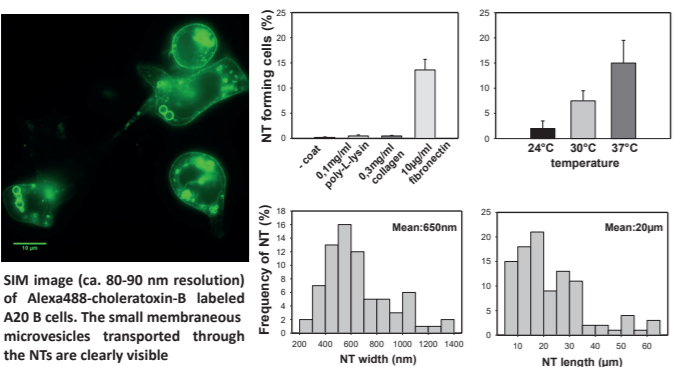


Cells were stained with DiI/DiO dyes for live cell CLSM imaging.

2. Local cytoplasmic free Ca²⁺ level controls the formation-collapse equilibrium of B cell nanotubes



3. Visualization of neutrophil extracellular traps



SUMMARY:

- > We have shown that under closely physiological conditions about 10-15% of B cells spontaneously form membrane nanotubes (5-65 µm long and 200-1400 nm wide) connecting two or sometimes multiple B cells that can be differentially modulated by various stimuli of B cells.
- > The nanotubes contain F-actin, the integrity of which seems essential in nanotube growth and also microtubules that might be important in transport processes of membrane vesicles across the TNTs.
- > The cytoplasmic Ca²⁺ level of B cells also has high impact on the growth vs. retraction equilibrium of nanotubes, presumably through activating actin-regulatory proteins cofilin and gelsolin. The exact connection between their regulation roles in nanotube formation of lymphocytes still remained open question. Thus, further investigations are running currently in our lab.
- > Neutrophil extracellular traps can be visualized and activation events, such as change in cytoplasmic Ca²⁺ level and cell spreading, can be followed. Our results show that complement factor H can inhibit PMA-induced NET formation. Further studies regarding the mechanism of this effect are underway.

*This work was supported by grants K-104971 from Hungarian National Research Fund (OTKA), the European Social Fund under the grant agreement no. TAMOP 4.2.1./B-09/1/KMR-2010-0003, and the Lendület Program (no. LP2012-43) and MedInProt Program of the Hungarian Academy of Sciences.



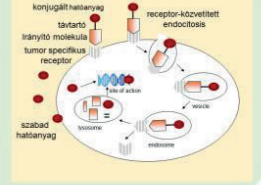
Céltzott tumorterápiában fontos receptor fehérjék és azok jelátviteli változásának vizsgálata peptid-hatóanyag-polimer nanorendszer segítségével

Dr. Mező Gábor¹, Dr. Iván Béla², Dr. Kóhidai László³

¹ MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ² MTA TTK AKI Polimer Kémiai Kutatócsoport, ³ Semmelweis Egyetem, GSI, Kemotaxis Munkacsoport

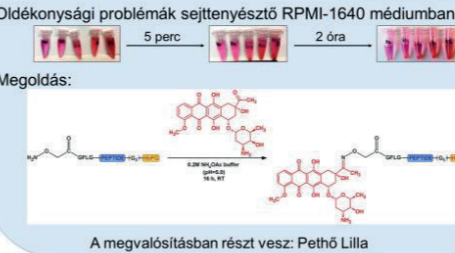


A tumorsejteken megjelenő sejtspecifikus vagy túltermelődött receptor fehérjéknek óriási jelentősége van a céltzott, személyre szabott tumorterápiában. A terápia hatékonysága növelhető, ha egyszerre több receptor-típuson keresztül juttatunk különböző hatóanyagokat a tumorsejtekbe, amelyek így additív vagy szinergista módon fejthetik ki hatásukat. A peptidligandumok kötődése után a receptorok azonban különböző jelátviteli útvonalakon és komplex folyamatokon át befolyásolhatják egymás expresszióját, szerkezetét (pl. foszforiláltság), jelátviteli képességüket és endocitózisa való hajlamukat. Ezeknek a folyamatoknak az ismerete elengedhetetlen a megfelelő kombinált kezelés kidolgozásához. A kombinált céltzott tumorterápia hatékonyságát befolyásoló fehérjeszintű változások feltérképezésére tesz kísérletet kutatócsoportjainkból létrehozott konzorcium egy peptid-hatóanyag-polimer nanorendszer segítségével.



Dr. Mező Gábor
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Két kiválasztott EGFR-hoz kötődő peptid konjugátuma:
Dau=Aoa-GFLG-LARLLT-NH₂ (Dau=Aoa-GFLG-D4)
Dau=Aoa-GFLG-YHWYGYTPQNV-NH₂ (Dau=Aoa-GFLG-GE11)

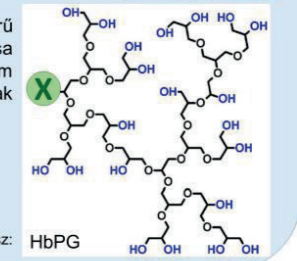


Dr. Iván Béla
MTA TTK AKI
Polimer Kémiai Kutatócsoport

Polihidroxil karakterű makromolekula előállítására a komplex biokonjugátum megfelelő oldhatóságának elérése céljából

Feladatok:
• Polimer szintézis és karakterizálás
• Funkcionalizálás

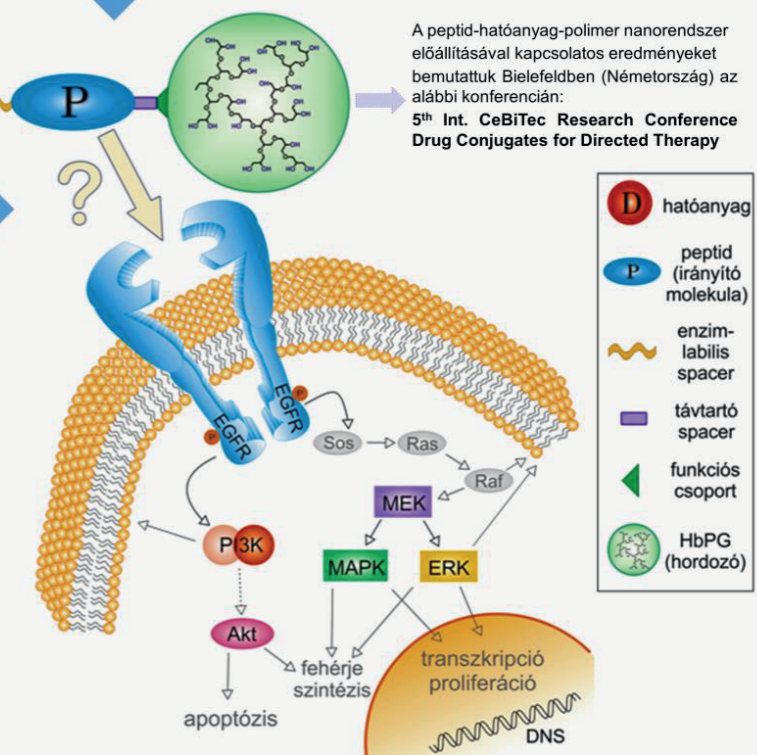
A megvalósításban részt vesz: Kasza György



Dr. Kóhidai László
Semmelweis Egyetem, GSI,
Kemotaxis Munkacsoport

Kísérleteinkben a fent ismertetett módon szintetizált, EGF receptorhoz kötődni képes peptid konjugátumok sejtbiofiziológiai paraméterekkel mérhető hatásait vizsgáljuk. Ezek két fő útvonalát a (i) jelátviteli utakat is érzékenyen érintő receptor-moduláció (ld. monoklonális antitestek; tirozin kináz gátlók; kemopreventív anyagok alkalmazása) és a (ii) receptor internalizáció (pl. EGFR-STAT3-E2P1 komplex génszintű hatásai ciklin vagy iNOS termelésére) multidimenziális szignalizációi képviselik. Modellül a tumorok sejtleletleni jellemzőit (egészséges sejtektől eltérő kitérés, sejtmozgás, osztódó képesség) jól reprezentáló, a hazai populációban magas incidenciával előforduló két daganatnak megfelelő sejtvonalat (HT-29 – colon adenocarcinoma; MCF7 – emlőrák) használunk. Vizsgálataink során az előállított konjugátumokkal (i) az EGFR jelátvitelére jellemző, csomóponti elemek (MEK-ERK, PI3K-AKT) aktivitását vizsgáljuk immuncitokémia/FACS elemzéssel; (ii) a sejtek adhézióját, migrációját és proliferációját mérjük impedimétriai úton, valósídejű rendszerben.

A megvalósításban részt vesz: Láng Orsolya és Lajkó Eszter



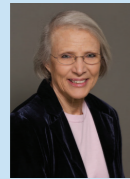
Megválaszolandó kérdések:

- > A HbPG oldékonyságot növelő hatása és a biohasznosulásra valamint tumornövekedésre gyakorolt hatása összevetve a PEG-alapú konjugátumokkal.
- > A konjugátummal történő kezelés hatására bekövetkező fehérje szintű változások megállapítása, különös tekintettel a jelátviteli csomópontok aktivitására és más a céltzott tumorterápiában hasznosítható receptorok (pl. GnRH-R) kifejeződésére.

UV munkaállomás fehérjeanalitikai és proteomikai mérésekhez

MedInProt Műszervásárlási pályázat

A pályázókról:



Sármy Gabriella, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár
Immunológiai Tanszék, ELTE Biológiai Intézet

Kutatási területe a B sejt immunválasz szabályozása, a B sejteken kifejeződő receptorok által stimulált jelátviteli folyamatok és a receptorok közötti "párbeszéd" tanulmányozása. B sejt funkciók és autoreaktív ellenanyagok vizsgálata rheumatoid arthritisben.



Schlosser Gitta, Ph.D.

tudományos munkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet

Kutatási területe a tömegspektrometriás módszerek kidolgozása és alkalmazása fehérjék és peptidok szerkezetvizsgálatára, fehérjék poszttranszlációs módosításainak meghatározása, proteomikai és klinikai diagnosztikai kutatások.

A beszerzett műszer:

Jasco UV-2075 UV/VIS detektor monokromátorral (190-600 nm), ChromNAV kromatográfiai adatállomás, Jasco LCNetII interfész:

- Manuálisan és számítógéppel is vezérelhető, független UV detektálási munkaállomás.
- Tetszőleges HPLC berendezéshez csatlakoztatható.
- Közvetlenül, vagy folyadékmegosztással csatlakoztatható tömegspektrométerhez.

A műszer elhelyezése és használata:

- MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, Budapest, 1117, Pázmány Péter sétány 1A, 346-os laboratórium. Kapcsolattartó személy: Dr. Schlosser Gitta, sch@chem.elte.hu
- A laboratóriumban rendelkezésre álló analitikai HPLC berendezéshez és tömegspektrométerekhez* csatlakoztatható.
- Fő felhasználási területe peptid- és fehérjeanalitikai, proteomikai mérések, módszerfejlesztés, fehérjeizolálás.

Kutatási témák, publikációk:

Magyar A, Gyulai G, Pozsgay J, Schlosser G, Uray K, Szarka E, Rojkovich B, Nagy Gy, Kiss É, Sármy G and Hudecz F: Identification and targeting by citrulline containing B-cell epitope peptides related to rheumatoid arthritis as recognition unit with nanoparticles. 23rd Polish Peptide Symposium, Spala, Lengyelország, 2015. augusztus 30.-szeptember 3.

Sármy G, Pozsgay J, Magyar A, Uray K, Gyulai G, Kiss É, Rojkovich B, Nagy Gy, Hudecz F: Rheumatoid arthritis betegek citrullinált fehérjékre specifikus autoreaktív B sejtjeinek szelektív elpusztítása citrullin tartalmú és komplement aktiváló peptidokkal fedett nanorészecskék segítségével. Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2015. május 20.

Gyulai G, Magyar A, Schlosser G: Peptidokkal módosított felületű nanorészecskék szintézise, tömegspektrometriás analízise. Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2015. május 20.

Pozsgay J, Magyar A, Gyulai G, Babos F, Uray K, Rojkovich B, Hudecz F, Nagy Gy, Kiss É, Sármy G: Selective depletion of citrullinated protein specific B cells in rheumatoid arthritis by an auto-epitope peptide and a killing peptide coupled together to the surface of biodegradable nanobeads. 4th European Congress of Immunology, Vienna, 2015. szeptember 6-9.

Pozsgay J, Magyar A, Hudecz F, Uray K, Gyulai G, Kiss É, Rojkovich B, Nagy Gy, Sármy G: Targeted in vitro eradication of citrullinated protein specific B lymphocytes of rheumatoid arthritis patients by bifunctional nanoparticles covalently coupled to an epitope peptide and a complement activating peptide. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence, 2015. október 14-16.

Pozsgay J, Babos F, Uray K, Magyar A, Gyulai G, Kiss É, Nagy Gy, Rojkovich B, Hudecz F, Sármy G: In vitro eradication of citrullinated protein specific B-lymphocytes of rheumatoid arthritis patients by targeted bifunctional nanoparticles. Közlésre benyújtva (Rheumatology, 2015).

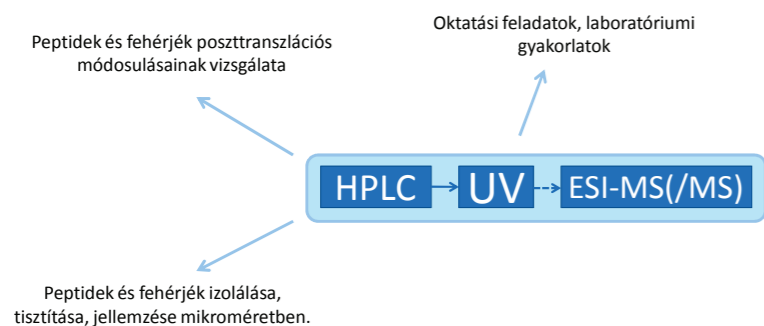
Thangaraju K, Biri B, Sivadó É, Schlosser G, Kiss B, Nyitrai L, Fésüs L, Király R: Development of protein and cell based systems to study isopeptidase activity of transglutaminase 2. Hungarian Molecular Life Sciences (Molekuláris Élettudományi Konferencia), Eger, 2015. március 27-29.

Biri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Köhida L, Fésüs L, Nyitrai L: Metastasis-associated S100A4 serves as a specific amine substrate for tissue transglutaminase-2. Hungarian Molecular Life Sciences (Molekuláris Élettudományi Konferencia), Eger, 2015. március 27-29.

Schlosser G, Knapp K, Majer Zs: Szulfhidril-csoportok azonosítása peptidokban fluoreszcens jelzés és tandem tömegspektrometria kombinálásával. MKE II. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, 2015. augusztus 31.- szeptember 2.

Lőrincz Anna: Az Aoa-TKPKG-OH peptid melléktermék-profiljának vizsgálata HPLC-UV-ESI-MS/MS technikával. Szerves kémiai speciális labor B beszámoló, 2015, ELTE Szerves Kémiai Tanszék

Munkában: egy Jasco szemimikroanalitikai HPLC-vel, majd az UV detektor után folyadékmegosztással csatlakoztatva egy Bruker Esquire 3000+ tömegspektrométerhez.



Köszönetnyilvánítás:

Schlosser Gitta munkáját a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.
*A laboratóriumban üzemelő Jasco HPLC pumpákat és Thermo Finnigan ionscspadás tömegspektrométert a Macasoft Bt. biztosítja.

Kedves kolléga, kedves érdeklődő kutatótársunk!

Nagy örömünkre szolgál, hogy konferenciánk résztvevői között üdvözölhetjük. Kérem, a MedInProt III. konferenciáját követően szánjon arra pár percet, hogy megossza velünk véleményét, tapasztalatait és gondolatait kiválósági együttműködési programunkról. Írja meg nekünk, hogy

- Melyik előadás és miért tetszett Önnek a legjobban?
- Mely témákról hallott volna többet szívesen?
- Mi az a része a konferenciának, illetve a rendezvénysorozatnak, amellyel nem teljesen elégedett, amit Ön másképp szervezne, alakítana?

Véleményét, ötleteit előre is köszönettel várjuk a medinprot@chem.elte.hu címre.

S ha pedig kedve támadt csatlakozni is programunkhoz, kérjük szintén a fent megadott e-mail címen jelezze. Ezt követően regisztrálhat tagként honlapunkon, melynek köszönhetően még jobban megismerheti ezt a kutatói közösséget, társakra és érdekes kutatási potenciálokra bukkanhat. Mert kutatni öröm!
Ezúton is ajánljuk szíves figyelmébe a 2016 januárjától induló programjainkat (lásd honlap), valamint az elérhető kutatási támogatásokat.

A MedInProt kuratóriuma nevében kívánok sikeres és eredményekben gazdag kutatómunkát:

Perczel András
a kuratórium elnöke

medinprot.chem.elte.hu



MEDINPROT.CHEM.ELTE.HU