



# Sejt- és Fejlődésbiológus *bulletin*

(1)

## Plenáris előadások

### Uher Ferenc: Az őssejtek világa

*Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház-Rendelőintézet, Budapest*

Az őssejtbiológia területén elért haladás, ezen sejtek biológiájának jobb megértése, alapvetően megváltoztatta az emberi szervezet biológiájáról és élettanáról alkotott elképzeléseinket. Világossá vált, hogy testünk jóval plasztikusabb, mint azt korábban gondoltuk. Az embrió fejlődésének korai szakaszában átmenetileg vannak jelen a szervezetben olyan őssejtek, amelyek még minden testi sejt irányába képesek differenciálódni, tehát *pluripotensek*. Belőlük tudunk - megfelelő tenyésztési feltételek mellett – *in vitro* kultúrában hosszú ideig fenntartható, úgynevezett embrionális őssejt (ES) vonalakat alapítani. Az egyes ES sejtvonalak között azonban jelentős különbségek vannak, attól függően, hogy milyen faj (egér vs. ember) embriójából, annak mely részéből (beágyazódás előtti blasztociszta vs. epiblaszt), a fejlődés pontosan melyik pillanatában izolált sejtekből hoztuk létre őket. A pluripotencia „mértékének” (vagy inkább mélységének) megfelelően beszélhetünk „naív” és „primed” ES sejtekről, valamint e két állapot közti átmenetéről – vagyis a pluripotencia mélységét leginkább egy folyamatos skála mentén kell elképzelnünk. A különböző szövetek, szervek kialakulása után viszont *multipotens* (szöveti) őssejtek biztosítják az adott szövet folyamatos megújulását, azaz pótolják az elpusztult testi sejteket, sérülés esetén pedig részt vesznek az érintett szerv regenerációjában. Az ilyen sejtmeújulási rendszerek felépítését és működését egészen a közelmúltig a vérképző rendszer vizsgálata során szerzett korábbi ismereteink alapján próbáltuk magyarázni, ami mára egyértelműen tarthatatlanná vált. Az új sejtfejlődési sor követési eljárások és sejtszintű molekuláris genetikai vizsgálatok rávilágítottak, hogy az egyes szövetek őssejt készlete is heterogén, általában egy „tartalék” és egy „aktív” sejtpopulációból áll. A tartalék őssejtek akár egész életünk során mély nyugalmi állapotban maradhatnak, csak súlyos szövetkárosodás után (esetleg idős korban) kezdenek osztódni, azaz egyértelműen a regeneráció a feladatuk. Az „aktív” populáció az, amely felnőtt korban fiziológiás körülmények között is folyamatosan működik, fenntartva a szöveti homeosztázist. A két populáció között azonban szükség esetén lehetséges az átmenet, sőt, ha mindkettő elpusztul, akkor megfelelő dedifferenciálódás után a korábban már érésnek indult sejtek egy része veszi át a helyüket. A lényeg, hogy elsősorban a mikrokörnyezet (*niche*) határozza meg, mely sejt viselkedik adott esetben őssejtként. (Előadásomban ezt néhány konkrét sejtmeújulási rendszer - a bélhám és a tüdő epitélium – példáján szeretném bemutatni). Kérdés tehát, hogy a szöveti őssejt fogalom inkább egy entitást, vagy funkciót takar? Hol a sejtek plaszticitásának határa *in vivo*, és ebből mit lehet esetleg gyakorlati (tarápiás) célokra felhasználni?

### Szatmári István: Sejtek tetszőleges átalakítása transzkripciós faktorokkal, álom vagy valóság?

*Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Debreceni Egyetem, Debrecen*

A már elkötelezett szomatikus sejtek visszaprogramozása, indukált pluripotens őssejteké új fejezetet nyitott a sejtbiológiában. Azóta további unortodox direkt sejtátalakítási protokollok kerültek publikálásra. Többek között sikerült fibroblasztokat közvetlenül átalakítani neuronokká, illetve szívizom sejtekké. A sejt fejlődési programjának újraindítása a létrehozni kívánt sejttypus fejlődésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktorok bekapcsolásával

történi, melyek bizonyos kombinációja úgy tűnik valóban képes a sejtidentitást megváltoztatni. Ezen áttekintő előadás keretében megpróbálom felvázolni a direkt sejtkonverzió eddigi legfontosabb eredményeit, külön kiemelve a módszer felhasználási lehetőségeit és korlátait.

-

## **Vilmos Péter, Kristó Ildikó, Bajusz Csaba, Borkúti Péter, Kovács Zoltán: Citoszkeletális fehérjék a sejtmagban**

*Drosophila sejtmagi aktin csoport, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged.*

Az eukarióta sejtmagban egyszerű mikroszkópos megfigyeléssel a kromatin, maghártya és a magvacska ismerhető fel. A sejtmag azonban ennél jóval bonyolultabb szerkezet, a benne zajló folyamatok feltételeznek egy, a citoplazmához hasonló ún. sejtmagmátrix létét, illetve az ehhez köthető, szigorúan szabályozott belső rendet. Ugyan a sejtmag belső szerkezetének és működésének részletes leírása máig várat magára, a közelmúlt eredményei azonban mégis több tekintetben áttörést ígérnek. Az evolúciósan konzervált, szövetspecifikus kromoszóma territóriumok, a sejtmagi citoszkeletális fehérjék vagy a LINC komplex felfedezése közelebb visz az eukarióta sejt egyik legfontosabb alkotórészének megismeréséhez. Az előadás célja a sejtmag vázelemeiről szerzett legújabb ismereteink bemutatása.

## **Sarkadi Balázs: Az őssejtek terápiás alkalmazásának kihívásai**

*MTA-TTK Enzimológiai Intézet*

Az őssejtek terápiás alkalmazása óriási ígéret az orvoslásban – a helyreállító gyógyítás súlyos betegségek kezelésében hoz várhatóan jelentős előrelépést. Ugyanakkor egyelőre csak néhány, szűkre szabott területen indult el eredményes kezelés, míg a csodatévő kuruzslás virágkorát éli. A 2009-ben életbe lépett, 1394/2007 sz. EU rendelet alapján az Európai Gyógyszerügynökség Fejlett Terápás Bizottsága (EMA-CAT) véleményezi és ajánlja engedélyezésre a fejlett terápiás, ezek között az őssejteket alkalmazó készítményeket. Ettől az időtől kezdve a sejt-szövet- és génterápiás módszerek, legalábbis hivatalosan, kizárólag központi engedély alapján kerülhetnek bevezetésre az EU tagállamaiban. Az egyik alapvető tézise ennek az engedélyezési folyamatnak, hogy valamennyi humán fejlett terápiás készítmény – kivéve a vérkészítményeket és a szervátültetés eseteit - a gyógyszerekéhez hasonló engedélyezés nyomán kerülhet csak alkalmazásra. Az EU rendelet és annak értelmezése rengeteg megoldandó szakmai kérdést vet fel, amellyel az EMA CAT folyamatosan küzd, míg ugyanakkor az egyre szaporodó terápiás készítmények engedélyezését is folyamatosan végeznie kell. Az emberben élő sejteket, így őssejteket, szöveteket, vagy éppen génmódosítást alkalmazó módszerek széles köre, az új gyógyítások hatalmas társadalmi igénye és jelentős veszélyei, mind a kutató, mind a “szabályozó” szakemberek számára igazi kihívást jelentenek. Nem csoda tehát, hogy az első években csak igen kevés ilyen készítmény került engedélyezésre, és azok közül is több már visszavonásra került. Az EMA-CAT folyamatosan tesz közzé a fejlesztőket tájékoztató kiadványokat, szakmai irányelveket, de pl. a szabályozatlan őssejt-terápiák veszélyeire felhívó közleményeket is. Kidolgozta az előzetes konzultációk lehetőségét, igyekszik folyamatos tanácsadásokat biztosítani, kiemelve a kisvállalkozások és kutatóhelyek szerepét. Az előadás a Bizottságban megjelenő izgalmas szakmai kérdésekről, az őssejtek felhasználásán alapuló új gyógyítási lehetőségekről és azok biológiai hátteréről igyekszik összefoglalót adni.

## **Sturm Ádám, Vellai Tibor: Az öregedési folyamat mechanizmusa**

*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Genetikai Tanszék, Budapest*

Az öregedést az élettartam során felhalmozódó sejtes károsodások okozzák. Eme károsodások (elsősorban aggregálódott, letekeredett és oxidálódott fehérjék) hatása az inzultált sejt pusztulását eredményezheti, amelynek tömeges mértéke egy olyan időskori degeneratív betegség kialakulásában nyilvánulhat meg, amely végül az egyed halálához vezet. Az intenzív kutatások ellenére a mai napig ismeretlen maradtak a sejtes károsodások kialakulása mögött meghúzódó elsődleges (genetikai) faktorok. Megközelítésünket a nem öregedő sejtek összehasonlító elemzésével kezdtük. Ezekben a potenciálisan immortális sejtekben (csírvonal sejtek, amelyek összekötik az egymást követő generációkat, a végtelen osztódási kapacitással rendelkező rákos őssejtek, és bizonyos alacsonyabb rendű állatok – pl. hidrák, planáriák – őssejt-szerű testi sejtjei) a PIWI-piRNS útvonal kizárólagosan működik. Az öregedő testi sejtekben az útvonal inaktív. A PIWI-piRNS szabályozó rendszer legfontosabb ismert funkciója a mobilis genetikai elemek („ugráló” gének) vagy transzpozabilis elemek (TEk) gátlása. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az aktív TEk mutagén hatása (genomi instabilitást okozó inszerciós mutációk) az öregedési folyamat elsődleges genetikai faktora. A fonalféreg *Caenorhabditis elegans* kompakt genomjában csupán 10% a TEk aránya, és az aktív TE családok viszonylag kis kópiaszámban (5-30 elem) vannak jelen. Aktív TE családok géncsendesítésével élettartam

növekedést tudunk előidézni. Bizonyos TEk hiperaktiválása progériát (felgyorsult öregedés) eredményezett. PIWI fehérjék ektopikus expressziója a szómában szintén lassította az öregedési folyamat rátáját. Végül igazoltuk, hogy TE szekvenciák mentén az életkorral arányosan történik meg bizonyos nukleotidok kémiai módosulása, ami a TEk transzkripcióját fokozza, így végül limitálja az élettartamot. Mindent összevetve eredményeink azt mutatják, hogy az TEk az öregedési folyamat egy új genetikai faktorát jelentik.

## **Homolya László: Sejtpolaritás és trafficking májsejtekben**

*MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Molekuláris Sejtbiológiai Kutatócsoport*

A májtömeg nagy részét kitevő hepatociták sajátos sejtpolaritást mutató epitél hámsejtek. A szomszédos hepatociták apikális membránjaikkal összefordulva egy csőszerű struktúrát, az epe kanalikulust alkotják, melyet tight junction fehérjék zipzár-szerűen kapcsolnak össze. Az egymás mellé sorakozó hepatociták együttesen hoznak létre egy egymásba fonódó kanalikuláris hálózatot, mely térrészbe történik az epe szekréciója, a koleszterin, a bilirubin, valamint a különböző endo- és xenobiotikumok kiválasztása. Ennek a speciális sejtpolaritásnak a létrehozása és fenntartása egy aktív folyamat, amelyben részt vesznek citoskeletális elemek, motorfehérjék, kis G fehérjék, tight junction komponensek, membránvezikulák és regulátor fehérjék. Számos trafficking esemény jól összehangolt eredményeképpen jön létre, hogy a meghatározott funkcióval bíró receptorok és transzporter fehérjék a megfelelő membránkompartimentbe kerülnek a szükséges mennyiségben, biztosítva ezzel a hepatocita sokrétű funkcióját. E folyamat szabályozásának egyik kulcsszereplője az eredetileg a sejtek energiaháztartásáért felelős kinázként azonosított AMPK (AMP-dependent kinase) és ennek upstream regulátora az LKB1 (liver-specific kinase B1). Nem elhanyagolható szereppel bír még a PKA is. Kutatásaink fókuszában az epesók transzportjára felelős BSEP (bile salt export pump) transzporter áll, amely a bioszintézist követően nem a „kanonikus” úton, a bazolaterális membránt megjárva transzcitózissal kerül a kanalikuláris (apikális) membránba, hanem közvetlen úton. A hepatocitákban lévő transzporter nagy része mégsem ebben a célkompartimentben helyezkedik el, hanem a folyamatosan reciklizáló vezikulákban. Ez a felállás egy igen gyors, az igényekhez igazodó szabályozást tesz lehetővé a transzportkapacitás tekintetében.

## **Informális prezentációk**

### **Az öregedés mechanizmusa: a transpozabilis elemek elsődleges szerepe a genom dezintegrációjában**

Körmendi Petra<sup>1</sup>, Sturm Ádám<sup>1</sup>, Saskői Évi<sup>1</sup>, Hotzi Bernadette<sup>1</sup>, Barna János<sup>1</sup>, Bodnár Ferenc<sup>1</sup>, Huszár Blanka<sup>1</sup>, Fenyvesi Dóri<sup>1</sup>, Ivics Zoltán<sup>2</sup> és Vellai Tibor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetikai Tanszék, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Pázmány Péter sétány. 1/C, H-1117, Budapest, Magyarország; <sup>2</sup>Paul Ehrlich Institute, D-63225 Langen, Németország

Az öregedés molekuláris alapjainak megértése továbbra is alapvető probléma a biológiában. A multicelluláris organizmusokban a szomatikus sejtek progresszív romlása figyelhető meg az életkor előrehaladásával, ugyanakkor a csírvonal – az a sejtvonal, amelyből a reprodukciós sejtek származnak - lényegében halhatatlan. A szóma sejtek genomi instabilitása az életkorral növekszik, amit (a felhalmozódó bizonyítékok azt mutatják) a mutagén transzpozabilis elemeknek (TE-k) nevezett szakaszok mobilizálása kísér. Mikor a transzpozonok mobilizálódnak megzavarhatnak kódoló vagy szabályozó szekvenciákat. Ezzel ellentétben a PIWI-piRNS-rendszer hatékonyan csendesíti a TE-eket a csírvonalban. Úgy gondoljuk, hogy a transzpozonok gátlásának ezen útvonalon keresztül szerepe van a tartós proliferációs kapacitás fenntartásában, és ezáltal a csírarsejt nem öregedő fenotípusában is. A Piwi-piRNS útvonal működik tumoros sejtvonalakban és bizonyos organizmusok szomatikus sejtjeiben - beleértve a hidrátokat, melyek ugyanúgy halhatatlanságot mutatnak. A szomatikus sejtekben Piwi-piRNS-útvonal hiányában azonban az életkorral fokozódó kromatin-dekondenzáció egyre inkább lehetővé teszi a TE-k, elsősorban az önreplikáló transzpozonok mobilizációját. Ez megmagyarázhatja, hogy a halálozási arány a legtöbb állatfajban felnőtt korban exponenciálisan növekszik, beleértve az embereket is.

## A caecum organizátor szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében

Nagy Nándor

*Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes Embryológia Laboratórium, Budapest.*

A bélidegrendszer (ENS) a perifériás idegrendszer legnagyobb önálló egysége, amely a gasztrointesztinális traktus számos funkcióját, beleértve a bél motilitását is szabályozza. Az ENS embrionális fejlődése során ganglionléc eredetű óssejtek cranio-caudalis irányba vándorolnak a bélcső mesenchymájában, ahol a myentericus és submucosalis plexusok neuronjait és gliasejtjeit hozzák létre. Ha az enterális ganglionléc-sejtek vándorlása zavart szenved, akkor a Hirschsprung-kór (*megacolon congenitum*) nevű születési rendellenesség jön létre, amit a belső anális sphincter felett változó hosszúságú aganglionális vastagbél szegment kialakulása jellemez. Ez a bélszakasz nem képes relaxációra, állandó tónusos kontrakcióban van. Korábbi vizsgálatok szerint a bélcső mesenchymában termelődő glia-eredetű neurotrop növekedési faktor [GDNF] és az Endothelin-3 [ET3] jelátvitelt érintő mutációk állnak a Hirschsprung esetek közel 50%-nak hátterében. A ganglionléc sejtekre a GDNF chemoattraktánsként hat, koncentrációgrádienszt hoz létre, ami biztosítja a ganglionléc sejtek bélfalban történő osztódását és vándorlását. Az ET3 szerepe kevésbé világos, feltehetőleg a GDNF hatását szabályozza. Mindkét molekula esetében azt találtuk, hogy a béltraktus fejlődése során expressziójuk először az 5 napos csirke embrió caecumkezdeményének mesenchymájában jelenik meg, ami megelőzi az utóbél ganglionléc sejtekkel történő kolonizációját. Ez megfigyelés vetette fel azt az elképzelést, hogy a caecum meghatározó szerepet játszik a vastagbél ENS-nek ontogenezisében. Az embrionális caecum vastagbél-ENS fejlődésében betöltött szerepét klasszikus embryomanipulációs technikák (caecum kimérák és transzgenikus GFP-csirke embryók alkalmazása, embrionális bélsatorna *ex vivo* caecum irtását követő tenyésztése) és molekuláris biológiai módszerek (*in situ* hybridizáció, RNAseq analízis) ötvözésével vizsgáljuk. Eddigi kísérleteinkkel azt igazoltuk, hogy: 1) A caecumon áthaladó ganglionléc sejtek intenzívebben osztódnak, mint a bél más szakaszaiban. 2) A caecum korai ablációja miatt, a ganglionléc-sejteket csökkent osztódási arány és korai neurális differenciálódás, az utóbelet pedig distalis aganglionozis jellemzi. 3) Az RNAseq analízis és *in situ* hybridizációs eredmények alapján feltételezzük, hogy a caecumban kifejeződő Wnt11 fehérjének nélkülözhetetlen szerepe van az utóbél ENS fejlődésében.

## Hemopoietikus nyúlványos sejtek a bélidegrendszer ganglionjaiban

Kovács Tamás, Dóra Dávid, Barad Csilla, Nagy Nándor

*Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes Embryológia Laboratórium, Általános Orvostudományi Kar, Semmelweis Egyetem, Budapest.*

A központi idegrendszert (CNS) neuroektodermális eredetű neuronok és gliasejtek, valamint a szikhólyag hemopoietikus prekursoraiból származó mikroglia sejtek alkotják. A bélidegrendszerben (enteric nervous system, ENS) jelenlegi ismereteink szerint csak ganglionléc eredetű neuronok és glia sejtek találhatók. Előzetes immuncitokémiai vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a csirke ENS ganglionjaiban hemopoietikus sejtekre jellemző, CD45+ nyúlványos sejtek is előfordulnak. Kisebb számban, de az egér ENS ganglionjaiban is találtunk nyúlványos CD45+CX3CR1+CD11b+ sejteket. Jelenleg ilyen sejtípust az enterális ganglionokban nem ismer a szakirodalom. Munkánk célja az volt, hogy az ENS-asszociált CD45+ nyúlványos sejteket karakterizáljuk és meghatározzuk az eredetüket. Az immuncitokémiai karakterizálás során kiderült, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtek chB6 és MHC-II antigént is expresszálnak, de makrofág és glia markereket nem. A chB6 antigén a madarak B-limfocitáira és a CNS mikroglia sejtjeire specifikus sejtfelszíni molekula. MHC II expressziójuk révén antigén prezentációra is képesek lehetnek. A CD45+chB6+MHC-II sejtek eredetét embrionális kiméra módszerrel tanulmányoztuk. A kísérlet során 8 napos csirke embrió vastagbél kezdeményét, együtt a Remak ganglionnal 9 napos GFP-(green fluorescent protein)- transzgenikus csirke embriók testüregébe transzplantáltuk, majd a kimérákat 8 napig tovább inkubáltuk. A kimérizmust GFP és sejt-specifikus monoklonális ellenanyagokkal ellenőriztük. Az eredmények azt mutatták, hogy a CD45+ véreredetű sejtek kolonizálják a fejlődő enterális ganglionokat, melyek letelepedésük után nyúlványos sejtekké differenciálódnak.

## **Cell-autonomous production of collagen 18 and agrin by enteric neural crest cells modifies their environment and regulates their migration during ENS development**

Csilla Barad<sup>1</sup>, Ryo Hotta<sup>2</sup>, Sukhada Bhawe<sup>2</sup>, Emily Arciero<sup>2</sup>, David Dora<sup>1</sup>, Allan M. Goldstein<sup>2</sup>, Nandor Nagy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

<sup>2</sup>*Department of Pediatric Surgery, Pediatric Surgery Research Laboratories, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114*

The enteric nervous system arises from neural crest cells that migrate, proliferate, and differentiate into enteric neurons and glia within the intestinal wall. Many extracellular matrix (ECM) components are present in the embryonic gut, but their role in regulating ENS development is largely unknown. Here, we identify heparan sulfate proteoglycan proteins, including collagen 18 (Col18) and agrin are important regulators of enteric neural crest cell (ENCC) development. In developing avian hindgut, Col18 is expressed at the ENCC wavefront, while agrin expression occurs later. Both proteins are normally present around enteric ganglia, but are absent in aganglionic gut. Using chick-mouse intestinal chimeras and enteric neurospheres, we show that vagal- and sacral-derived ENCCs from both species secrete Col18 and agrin. While glia express Col18 and agrin, enteric neurons only express the latter. Functional studies demonstrate that Col18 is permissive while agrin is strongly inhibitory to ENCC migration, consistent with the timing of their expression during ENS development. We conclude that ENCCs govern their own migration by actively remodeling their microenvironment through secretion of ECM proteins.

## **Az Ykt6, egy atipikus SNARE fehérje szerepe az autofágia során**

Szenci Győző<sup>1</sup>, Takáts Szabolcs<sup>1,2</sup>, Glatz Gábor<sup>1</sup>, Boda Attila<sup>1</sup>, Hegedűs Krisztina<sup>1</sup>, Kovács Attila Lajos<sup>1</sup>, Juhász Gábor<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*ELTE TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológia Tanszék*

<sup>2</sup>*MTA Prémium Posztdoktori Kutatói Program*

<sup>3</sup>*MTA SZBK, Genetikai intézet*

Az autofágia során a sejt károsodott vagy felesleges komponenseit autofagoszómákba csomagolja, melyek lizoszómával fuzionálnak. A keletkező autolizoszómákban megtörténik a felvett sejtalkotók lebontása, a felszabaduló monomereket pedig a sejt újrahasznosítja. Az eukarióta sejtek vezikula fúziós folyamataihoz pályvázó faktorok, valamint SNARE fehérjék jelenléte szükséges. A fúzió végrehajtásakor a szemben lévő membránokban található SNARE-ek egy transz-SNARE komplexet képeznek, mely 4 db helikális SNARE motívum egymásra csavarodásával jön létre. Az autofagoszóma—lizoszóma fúzióhoz szükséges négy SNARE motívumot ecetmuslicában a Syx17 és a Snap29 valamint a VAMP7 fehérjék biztosítják. Kutatásaink során azonban úgy találtuk, hogy e folyamathoz egy további, létszám feletti SNARE fehérje, az Ykt6 jelenléte is szükséges. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az Ykt6 és a Vamp7 verseng egymással a többi SNARE-rel való kölcsönhatásért. Ennek során az Ykt6 bizonyult a gyengébb félnek, melyről kimutattuk, hogy SNARE motívuma csak nagyon gyengén képes kötni a Syx17-et és a Snap29-et. Emellett azt is megfigyeltük, hogy az Ykt6 jelen van a lizoszómák felszínén és kölcsönhat a HOPS pályvázó komplex alegységeivel is. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az Ykt6 elsősorban nem konvencionális SNARE-ként, hanem inkább a fúzióhoz szükséges faktorok toborzásán keresztül vesz részt az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban.

## **Kis GTPázok szerepe az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban**

Takáts Szabolcs<sup>1,2</sup>, Lévy Luca<sup>1</sup>, Lőrincz Péter<sup>1</sup>, Juhász Gábor<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*ELTE TTK, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológia Tanszék*

<sup>2</sup>*MTA Prémium Posztdoktori Kutatói Program*

<sup>3</sup>*MTA SZBK, Genetikai intézet*

Az autofágia során a sejt, hibás fehérjéinek és organelleimainak lizoszómákban való lebontásával és újrahasznosításával képes megújítani önmagát. A lebontandó anyag először egy kettősmembránnal határolt vezikulába, autofagoszómába csomagolódik, mely később lizoszómával fuzionálva autolizoszómát hoz létre, ahol megtörténik a sejtalkotók emésztése. Bár az autofagoszóma-lizoszóma fúzió a folyamat kulcslépése, az ezt szabályozó fehérjékről keveset tudunk. Az eukarióta sejtek belsőmembránjainak forgalmát a Rab családba tartozó kis GTPáz fehérjék vezérik. A Rab-ok aktivitása szabályozó fehérjéiktől függ. Ezek közé tartozik a kutatásunk fókuszában lévő Rab3GAP2, melyről megállapítottuk, hogy hiányában gátlódik az autofág lebontás. Fény és elektronmikroszkópos vizsgálataink során pedig kimutattuk, hogy a Rab3GAP2 funkcióvesztéses sejtek lizoszomális rendszere fragmentálódik és fúzióképtelen autofagoszómák halmozódnak fel bennük. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a Rab3GAP2 a Rab3GAP heterodimer komplex tagjaként, aktiválja a Rab18-at. Kutatásaink során azt figyeltük meg, hogy a Rab18 csendesítése a Rab3GAP2 funkcióvesztéséhez hasonlóan gátolja az autofágiát. Így eredményeink arra utalnak, hogy a Rab3GAP-Rab18 modul egy új, eddig ismeretlen szabályozási lépést képvisel autofagoszóma-lizoszóma fúzió során.

## **A GM-CSF receptor internalizációja patkány mesothel sejtekben**

Zsiros Viktória, Katz Sándor, Dóczi Nikolett, L. Kiss Anna

*Semmelweis Egyetem, Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstan Intézet*

Az epitheliális-mesenchymális (EMT), illetve a mesenchymális-epitheliális átalakulás (MET) rendkívül összetett, kiemelt fontosságú biológiai folyamat. Szabályozzák a sejtek plaszticitását, és számos morfológiai, molekuláris változást létrehozva kialakítják az adott sejttípus fenotípusát. Fontos szerepet játszanak az embriogenezisben, a tumorigenezisben, és a gyulladásos folyamatokban is. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a Freund adjuváns indukálta gyulladás során a patkányok hashártyájának mesothel sejtjei elveszítve hám tulajdonságaikat mesenchymális jellegű sejtekké differenciálódnak (EMT II). Amellett, hogy jelentős morfológiai változásokon mennek keresztül (pl.: köb alakú sejtekké alakulnak, citoskeletonjuk átrendeződik, leválnak a bazális membránról, motilissé válnak, stb.), gyulladásos citokineket (TGF- $\beta$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) termelnek, receptoraikat expresszálják. Az ezt követő regeneráció során MET révén visszanyerik eredeti hám fenotípusukat. Előzetes vizsgálataink során kimutattuk, hogy a hám-mesenchyma átalakulás során a hámsejtek makrofág markereket (pl. ED1) expresszálják, jelezvén, hogy makrofág-szerű sejtekké differenciálódnak. *In vivo* eredményeinket *in vitro* kísérletekkel igazoltuk, amelyek során patkányból izolált hashártyákat TGF- $\beta$ -val, GM-CSF-el (granulocytamacrophag colony stimulating factor), és a két citokin elegyével különböző ideig inkubáltunk. Eredményeink alátámasztották, hogy 1) mindkét citokin hasonló fenotípusos átalakulást indukál a mesothel sejtekben, mint a Freund adjuváns; 2) a GM-CSF kezelés hatására fokozódik az ED1 expressziója; 3) a mesothel sejtek GM-CSF receptort ( $\alpha$  és  $\beta$ ) expresszálják (az irodalomban elsőként); 4) gyulladás hatására a mesothel sejtek GM-CSF-t is termelnek, amely egy autokrin (parakrin) szabályozásra utal. Előzetes vizsgálataink azt mutatták, a GM-CSF jelátviteli folyamatához a receptor-ligand internalizációja szükséges. Ennek igazolására dynasore kezeléssel gátoltuk a caveolin-és clathrin-mediált endocitózist, mivel a dynasore a vezikulák lefűződésében résztvevő dynamint gátolja. Azt tapasztaltuk, hogy a dynasore kezelés hatására a felszínnel összeköttetésben álló vezikulák száma drasztikusan megnőtt. A GM-CSF kezelés a sejtfelszínnel összeköttetésben álló vezikulák számát jelentősen lecsökkentette. A dynasore-GM-CSF kombinált kezelés után a plazmamembránnal összeköttetésben lévő vezikulák száma kismértékben megnőtt, és a sejtek nem expresszálták a makrofág ED1 markert. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a GM-CSF receptor internalizációja szükséges a mesothel-makrofág átalakulást szabályozó jelátviteli folyamatokhoz. A továbbiakban pedig arra keresünk választ, hogy a receptor caveolák közreműködésével internalizálódik-e, és, ha igen, milyen endocitotikus vezikulákban (korai, késői és reciklizáló endoszóma) mutatható ki a gyulladás különböző időpontjaiban.

## **Jelátviteli utak a vázizom glükózfelvételében és regenerációjában**

Keller-Pintér Anikó

*Szegedi Tudományegyetem ÁOK Biokémiai Intézet*

Fokozott fizikai igénybevételt, sérülést követően a vázizomzat regenerációra képes, melynek javításával a sportsérülések, mozgásszervi betegségek rehabilitációja gyorsítható. A regeneráció során az izomban jelen levő nyugvó szatellita (ős)sejtek aktiválódnak, a képződő myoblastok proliferálnak, migrálnak, differenciálódnak, majd csőszerű, sokmagvú myotubulusokká fuzionálnak. A syndecan-4 (SDC4) transzmembrán proteoglikán esszenciális

szerepet játszik a vázizom fejlődésében és regenerációjában. Mivel a SDC4 génkiütött egerekben megfigyelhető regenerációs zavar pontos mechanizmusa nem ismert, így célunk volt a SDC4 myoblast proliferációban, migrációban és differenciációban betöltött szerepének tanulmányozása. Eredményeink alapján a SDC4 expresszió shRNS-sel történő csendesítése csökkenti a myoblastok proliferációját, a sejtciklus G1/S átmenete gátlódik. A SDC4 csendesített sejtek kevésbé migrálnak, csökken a sejtek által megtett távolság, a maximális sebesség és az átlagsebesség értéke. A SDC4 csendesítés a myoblastok *in vitro* differenciációja során megemelte a MyoD myogenikus transzkripció faktor mennyiségét, fokozta a dezmin pozitív myotubulusok képződését, a sejtek fúzióját. A vázizom jelentős tömegének köszönhetően kiemelkedő szerepet játszik a szervezet anyagcseréjében. Az inzulin-rezisztencia miatt kialakuló 2-es típusú diabetes mellitus komoly népegészségügyi problémát jelent. Inzulin-rezisztencia esetén a GLUT4 glükóz transzporter inzulin stimulusra bekövetkező, citoplazmából a plazmamembránba történő transzlokációja zavart. Kimutattuk, hogy a myostatin (GDF-8; growth and differentiation factor-8) *Compact* mutációjának [*Mstn(Cmpt-d11Abc)*]hatására a mutáns egerekben a vázizom inzulinérzékenysége javul, fokozódik a vázizom glükózfelvétele. További vizsgálataink során egyes kis GTP-ázok szerepét tanulmányozzuk a vázizom glükózfelvételében.

Támogatások: GINOP 2.3.2-15-2016-00040, EFOP-3.6.2-16-2017-00006. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

## **Mi köze lehet a szekréciós útvonalnak egy lizoszómális tárolási betegség citopatomechanizmusához**

Jezsó Bálint<sup>1</sup>, Kobolák Júlianna<sup>2</sup>, Molnár Kinga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest

<sup>2</sup> BioTalentum Kft., Gödöllő

A Biotalentum kft. munkatársai egy lizoszómális tárolási betegség, a Hunter szindróma vizsgálatára egy iPSC alapú betegségmodellt fejlesztettek, amelynek ultrastrukturális jellemzését a mi csoportunk végezte. A pluripotens őssejtekből kismolekulás indukciós eljárással létrehozott neurális progenitor sejtekben (NPC) azonosítottuk a betegségre jellemző raktározó vezikulumokat, illetve elkülönítettük azok a szakirodalom által is ismert típusait. Hogy megállapítsuk, a sejtenyészetekben leírt egyes raktározó vezikulum típusok kapcsolatát az endoszómális rendszerrel, postembedding immunarany jelöléseket végeztünk olyan ismert lokalizációjú fehérjékre, mint a Rab5, a Rab7 és a Cathepsin D. A jelölések eredménye alapján kijelenthetjük, hogy a raktározó képletek legtöbb típusa - miként azt elvártuk - a kései endoszómákkal feleltethető meg. Az egyik vezikula típuson azonban a fenti antigének egyikét sem sikerült kimutatnunk. Az tiszta csupán, hogy ez a típus nem része az endo-lizoszómális rendszernek, de hogy honnét származik, arra vizsgálataink során eddig nem derült fény. Az NPC tenyészetek ultrastrukturájának vizsgálata során a sejtek egy bizonyos hányadánál szembeötlően tágult DER ciszternákra és ER-stresszre utaló jelekre lettünk figyelmesek. ER rezidens dajkafehérjéket (Grp78 és Calreticulin) célzó immunjelöléseket követően az ER stresszre való gyanakvásunk csak fokozódott. Mindezek alapján elgondolkozhatunk azon, hogy része-e a beteg fenotípusnak az ER-stressz, és ha igen, hogyan köthető a Hunter szindrómát okozó mutációhoz? Általános, vagy egyedi jelenségről van-e szó?

## **A novel mechanism for mitochondrial degradation during the regeneration of germline stem cells**

Tibor Kovács<sup>1</sup>, Fanni Szikszai<sup>1</sup>, Virginia Varga<sup>1</sup>, Kincső Bördén<sup>1</sup>, Kinga Tagscherer<sup>1</sup>, Anna Manzéger<sup>1</sup>, Viktor A. Billes<sup>1</sup>, Janka Szinyákovics<sup>1</sup>, Gina Puska<sup>2</sup>, Tibor Vellai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary.

Stem cells are undifferentiated cells of a multicellular organism which can differentiate into specialized cells during tissue regeneration. They have a special microenvironment and metabolism to maintain their self-renewal capacity. Stem cells normally reside in a hypoxic niche; the low oxygen tension actually contributes to the maintenance of their undifferentiated state. In the *Drosophila* testis, stress-eliminated germline stem cells can be restored from specialized spermatogonial cells by a process called dedifferentiation. Our aim was to uncover cellular degradative mechanisms underlying this regeneration paradigm. In eukaryotic cells, there are two major forms of lysosome-mediated cellular breakdown, autophagy (for the degradation of superfluous and damaged intracellular compounds) and endocytosis (for degrading extracellular materials). The two processes are intertwined by several ways. For example,

autophagosomes can be fused with early endosomes to generate amphisomes, which in turn can be merged with lysosomes, or late endosomes and lysosomes together, to produce autolysosomes, the final structures in which the sequestered materials are broken down by acidic hydrolases. We found that during dedifferentiation of spermatogonial cells into germline stem cells both autophagy and endocytosis become upregulated and elevated in the affected cells. We show that enhanced autophagy is specifically required for the elimination of mitochondria. This process may help to generate a hypoxic niche for the regenerating germline stem cells. Interestingly, mitophagy in germline stem cells strictly depends on endocytosis, but in somatic cells is largely independent from endocytosis. Thus, we suggest that the elimination of mitochondria from germ cells occurs by a novel mechanism that involves amphisome-like structures. Together, mitochondrial breakdown may be a key factor to establish a low oxygen tension for the dedifferentiation of stem cells.

## **Bélgyulladás modellezése *Drosophila melanogaster*-ben**

Sándor Gyöngyvér

*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésvirológiai Tanszék és Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet.*

A gyulladásszerű bélbetegségek kialakulásában gyakran szerepet játszik az Atg16L1, a Slit és a Rab19 gén mutációja, de ezen géneknek a mutációja közötti kapcsolat eddig ismeretlen volt. *Drosophila melanogaster*-ben végzett vizsgálataink során azt találtuk, hogy az Atg16 fehérje WD40 doménjának hiányában a pre-enteroendokrin sejtek felhalmozódnak, mivel nem tudnak érett enteroendokrin sejtekké alakulni. Atg16 fehérje vagy kötőpartnere, a Rab19 fehérje hiánya esetén csökken a Slit expressziója, ami a Robo jelátvitel aktiválása révén a bélőssejtekben gátolná az enteroendokrin differenciálódási útvonalat. Továbbá bizonyítottuk, hogy az Atg16 hiánya vagy a Slit/Robo jelátvitel csökkenése gyulladási folyamatokat indít el a bélben. Meglepő módon a Rab19 és az Atg16 WD40 domén specifikus mutációja az autofágiától függetlenül változtatja meg az őssejt niche-t. Munkánkban megmutatjuk, hogy ezeknek a géneknek a mutációja hogyan járulhat hozzá a gyulladásszerű bélbetegségek kialakulásához.

## **Generation and study of biotinylated transcription factors in murine pluripotent stem cells**

Tamas Imre Csuth and István Szatmári

*Stem Cell Differentiation Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary*

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells which play a critical role in the regulation of the adaptive immune response. The main aim of our research group is to optimize the embryonic stem (ES) cell-derived DC development using transcription factor-mediated cell programming. My work focuses on two members of the Runx transcription factor family: Runx1 and Runx3. Mouse ES cell lines were generated which express a biotin-tagged version of these transcription factors in an inducible way by a tetracycline analogue, doxycycline. The goal of this study was to test the impact of these biotin-tagged proteins on ES cell-derived DC progenitors. Our results indicated that, biotin-tagged Runx1 and Runx3 expressing inducible ES-cell lines were successfully generated because elevated Runx1 and Runx3 expression was detected in the presence of doxycycline. To probe the effects of these modified proteins (Bio-Runx), the transgenic ES cells were differentiated with or without doxycycline to myeloid progenitors. On the 5th day of differentiation, the percentage of early mesodermal cell surface marker (PDGFRa) positive cells decreases upon induction of either Bio-Runx1 or Bio-Runx3. On day 11, the ratio of the CD11b and CD45 positive myeloid cells increased upon the overexpression of Bio-Runx3. These results are very similar with our previous data when non-tagged Runx3 was induced. Interestingly, our preliminary data revealed that, overexpression of Bio-Runx1 elicited the opposite effect: decreased percent of CD11b/CD45 positive cells were detected in the presence of this transgene. Of note, this impaired myeloid development was also detected in the presence of the non-biotinylated Runx1.

In conclusion, biotin-tagged Runx1 and Runx3 inducible ES-cell lines were successfully generated. The tagged Runx1 and Runx3 primed a similar phenotypic changes compared with the non-modified transgenic Runx proteins in ES cell derived-myeloid progenitors. These data suggest that biotin-tagged Runx proteins are suitable research tools to probe the genomic impact of these master regulators.

## **STAT6-mediated direct repression of inflammatory enhancers limits inflammasome activation in alternatively polarized macrophages**

Zsolt Czimmerer<sup>1</sup>, Bence Daniel<sup>2, 15</sup>, Attila Horvath<sup>1, 15</sup>, Dominik Ruckerl<sup>3, 15</sup>, Gergely Nagy<sup>1</sup>, Mate Kiss<sup>1</sup>, Matthew Peloquin<sup>2</sup>, Marietta M. Budai<sup>4</sup>, Ixchelt Cuaranta-Monroy<sup>1</sup>, Zoltan Simandi<sup>2</sup>, Laszlo Steiner<sup>5</sup>, Bela Nagy Jr.<sup>6</sup>, Szilard Poliska<sup>7</sup>, Csaba Banko<sup>8</sup>, Zsolt Bacso<sup>8</sup>, Ira G.



Schulman<sup>9</sup>, Sascha Sauer<sup>10, 11, 12</sup>, Jean-Francois Deleuze<sup>13</sup>, Judith E. Allen<sup>3</sup>, Szilvia Benko<sup>4</sup> and Laszlo Nagy<sup>1, 2, 14</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>2</sup>Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, 6400 Sanger Road, Orlando, FL 32827 USA

<sup>3</sup>Faculty of Biology, Medicine and Health, School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

<sup>4</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>5</sup>UD-Genomed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen, Hungary

<sup>6</sup>Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>7</sup>Genomic Medicine and Bioinformatic Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>8</sup>Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>9</sup>Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, USA

<sup>10</sup>Otto Warburg Laboratory, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

<sup>11</sup>CU Systems Medicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany

<sup>12</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (BISMB and BIH), Berlin, Germany

<sup>13</sup>Centre National de Génotypage, Institut de Génomique, CEA, Evry, France

<sup>14</sup>MTA-DE „Lendület” Immunogenomics Research Group, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Cellular response to environmental cues requires reorganization of the transcriptional program by activating novel pathways and turning off unneeded ones. The molecular basis of signal-dependent transcriptional activation has been extensively studied in macrophage polarization, however our understanding remains quite limited regarding the relevance and molecular determinants of repression. Here we show that IL-4-activated STAT6 is required for the direct transcriptional repression of a large number of genes during *in vitro* and *in vivo* alternative macrophage polarization. IL-4/STAT6 signaling pathway-mediated repression results in the attenuation of H3K27 acetylation and chromatin accessibility, decreased recruitment of lineage-determining transcription factors, coactivator p300 and RNA polymerase II as well as reduced enhancer RNA expression. We demonstrate that the repressive activity of STAT6 is HDAC3-dependent on a subset of IL-4-repressed genes. In addition, STAT6-repressed enhancers show extensive overlap with the NF- $\kappa$ B/p65 cisome and exhibit decreased responsiveness to LPS following IL-4 stimulus. As a consequence, IL-4/STAT6-mediated transcriptional repression reduces the inflammatory responsiveness of macrophages including diminished inflammasome activation, decreased IL-1 $\beta$  production and pyroptosis. Collectively, these findings reveal a novel molecular circuit and biological activity of IL-4/STAT6 signaling in establishing and maintaining the alternative polarization-specific epigenetic signature and rendering macrophages less responsive to inflammatory stimuli.

## A P-glikoprotein (ABCB1) katalitikus ciklusának vizsgálata A-loop és Walker-B mutáns fehérjék segítségével

TARAPCSÁK SZABOLCS<sup>1</sup>, GYÖNGY ZSUZSANNA<sup>1</sup>, ÁGICS BEATRIX<sup>1</sup>, TÜRK DÓRA<sup>2</sup>, SZABÓ GÁBOR<sup>1</sup>, SZAKÁCS GERGELY<sup>2</sup> ÉS GODA KATALIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Enzimológiai Intézet

A P-glikoprotein (Pgp, ABCB1) az ATP-kötő kazettás (ABC) transzporterek fehérjecsaldjának tagja. A Pgp két transzmembrán doménből (TMD) és két nukleotid-kötő doménből (NBD) épül fel. A TMD-k felelősek a szubsztrátok megkötéséért, míg az NBD-k ATP kötése és hidrolízise biztosítja az energiát a szubsztrátok transzportjához. Az ismert ABC-transzporter kristályszerkezetek alapján feltételezhető, hogy a Pgp egy nagy affinitású befelé-nyitott és egy alacsony affinitású kifelé-nyitott konformáció között alternál. Az UIC2 konformáció-érzékeny antitest szelektíven, nagy affinitással kötődik a befelé-nyitott konformerhez. A nagy mennyiségű strukturális és funkcionális információ ellenére továbbra se ismert pontosan, hogy az NBD-k ATP kötése és hidrolízise hogyan kapcsolódik a TMD-kben lejátszódó konformáció változásokhoz. Munkacsoportunk az UIC2 antitest felhasználásával olyan Pgp molekulák transzport ciklusát vizsgálja, melyekben az ATP kötésben és hidrolízisben szerepet játszó szekvencia motívumok mutációt hordoznak egy- vagy mindkét NBD-ben. Habár az NBD-k konzervált aminosavait érintő mutációk, pl. a Walker B (D555A/D1200 vagy E556Q/E12001Q) vagy az A-loop (Y401A/Y1044A) motívumok mutációi a katalitikus ciklus különböző lépéseit érintik, korábbi vizsgálatok alapján mind az egyoldali-, mind a kétoldali mutáns fehérjék inaktívnak bizonyultak heterológ expressziós rendszerekben vagy tisztított fehérjék

alkalmazása esetén. Kísérleteinkben olyan emlős sejt vonalakat hoztunk létre, melyek nagy mennyiségben fejezik ki a mutáns fehérjét és így természetes membrán környezetükben vizsgálhatóak. Calcein-AM akkumulációs és citotoxicitási vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az egyoldali A-loop mutáns fehérjék részleges drog transzport aktivitással rendelkeznek, míg a kétoldali A-loop mutáns inaktív. Az A-loop mutáns fehérjék intakt sejtekben elsősorban az UIC2 reaktív konformációban találhatóak, akárcsak a D555N/D1200N egy- és kétoldali Walker B mutánsok, és nukleotidok vagy foszfát-analógok (pl. vanadát) jelenlétében váltanak az UIC2-t nem kötő konformációra. Ezzel szemben az E556Q/E1201Q egy- és kétoldali mutánsok, a vad-típusú fehérjéhez hasonlóan, intakt sejtekben UIC2-nem kötő állapotban vannak, és modulátorok jelenlétében váltanak az UIC2-reaktív konformációba. Eredményeink azt mutatják, hogy habár a vizsgált egyoldali mutáns fehérjék mindegyike képes konformáció változtatásra, egyedül az egyoldali A-loop mutánsok képesek drog transzportra.

Köszönetnyilvánítás

TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001; PD75994 and K72762 OTKA pályázatok; TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 "VÉD-ELEM" project és MTA Lendület pályázat (Szakács Gergely)

Irodalom

- 1 Barsony, O. *et al.* A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein. *Scientific reports* **6**, 24810, doi:10.1038/srep24810 (2016).

## **H2A.Z: stabil vagy nem stabil, ez itt a kérdés**

**IMRE LÁSZLÓ<sup>1</sup>, JUAN AUSIO<sup>2</sup>, NÁNÁSI PÉTER<sup>1</sup>, KALLÓ GERGŐ<sup>3</sup>, CSŐSZ ÉVA<sup>3</sup>, HIROSHI KIMURA<sup>4</sup> ÉS SZABÓ GÁBOR<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

<sup>2</sup> University of Victoria, Department of Biochemistry, Victoria, BC, V8W 3P6, Canada

<sup>3</sup> Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

<sup>4</sup> Cell Biology Unit, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, 226-8501, Japan

A kromatin nukleoszómális szerkezete a transzkripcióban represszált állapotban kedvez, a génexpresszió szabályozásában ezért kulcsszerepe van a nukleoszómák stabilitását befolyásoló faktoroknak, mechanizmusoknak. Transzkripció során a promotereken nukleoszóma mentes régió (Nucleosome Free Region, NFR) jön létre, melyet nagy kicserélődési rátával jellemezhető és meghatározott hiszton variáns összetételű nukleoszómák határolnak, utóbbiak közé tartozik a H2A.Z hiszton is. A H2A.Z jelenlétének hatása a nukleoszóma stabilitására nem tisztázott.

Kifejlesztettünk egy *in situ* mérési eljárást a nukleoszómák ionerősség függő, illetve szuperhelicitás függő stabilitásának mérésére, mellyel kimutattuk, hogy az NFR régiót közvetlenül határoló +1 és -1 nukleoszómákban a H3K4me3 hiszton módosítást hordozó tetramerek destabilizáltak. Irodalmi adatok alapján az aktív promotereken a H2A.Z hisztonok is az NFR régiót közvetlenül határoló +1 és -1 nukleoszómákra jellemzőek, ezért azt feltételeztük, hogy a H2A.Z tartalmú dimerek stabilitása a H3K4me3-at hordozó tetramerekhez hasonlóan csökkenni fog. Vizsgálatainkban különböző gyártóktól származó H2A.Z-specifikus antitesteket, valamint fluoreszcens fehérjéhez (GFP, CFP) kötött H2A.Z hisztonokat kifejező plazmid konstrukciókkal transziensen transzfektált sejteket használtunk.

Méréseink során nem tapasztaltunk destabilizációt a H2A, vagy H2A.X hisztonokat hordozó dimerekhez képest, azonban meglepő módon egy olyan stabilitásnövekedést mutattunk ki a H2A.Z dimerek esetén, ami függött a H2A.Z jelölésére használt antitesttől. Adataink alapján azt valószínűsítjük, hogy a H2A.Z hisztonoknak van egy stabilabb nukleoszómákra jellemző alpopulációja, melyet az általunk használt egyik antitest ismer fel. Kimutattuk, hogy a megnövekedett stabilitású H2A.Z nukleoszómák rezisztensek az interkaláció hatására bekövetkező DNS szuperhelicitás változás nukleoszóma destabilizáló hatására. Vizsgáltuk a H2A.Z egyes poszt-transzlációs módosításainak hatását, összehasonlítottuk a H2A.Z izotípusainak a stabilitását – nem találtunk szignifikáns különbségeket, melyek megmagyarázhatnák a nukleoszómák egy szubpopulációjára jellemző interkalátor-rezisztenciát. Jelenleg tömegspektrometriás eljárással vizsgáljuk az interkalátor kezelésre rezisztens, de sóval eluálható H2A.Z frakció fehérje összetételét.