

**Elemi kutatási témák a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KMR-2010-0003
Kutatóegyetemi pályázat 2. alprojektje keretében zajló
„Multiparaméteres Fluoreszcencia Aktivált Sejtanalízis és Szortírozás”
(FACS) 2.4. részprojektben(2011-02-05 - 2011-09-24):**

A FACS berendezés installálásától és az operátorok Brüsszeli kiképzésétől kezdve (2011-02-05) 16 elemi kutatási téma indult el és van folyamatban, a technológia különleges adottságainal kihasználásával. Ezek nagy része az ELTE intézeteinek kutatócsoportjaiban zajlik, viszont a jelek szerint komoly igény van a berendezés alkalmazására a régió társegyetemei és akadémiai kutatóintézetei részéről is. Ezen beindult projektek egy része még kezdeti, beindulási (beállítási) stádiumban van, viszont néhány elemi téma esetében már jelentős, regisztrálható eredmények is születtek.

1.) A téma megnevezése: FcRn expressziós vizsgálatok bFcRn transzgen egerek lépsejt populációin.

Témavezető: Dr. Kacs Kovics Imre (Immunogenes Kft/Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Farkas Anita PhD hallgató, Végh Attila PhD hallgató (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Egér lépből makrofág, granulocita, DC sejtek, és T/B limfociták szelektív izolálása (FACS-al) mRNS (PCR) analízishez. A transzgen egérből származó hasüregi makrofágok és csonvelői eredetű dendritikus sejtek fagocitáló ill. antigén-bemutató képességének összehasonlító áramlási citofluorimetriás analízise vad típusú egerek hasonló sejtjeivel.

Eredmények: Fluoreszcens immuncitokémiai jelzéssel sikeresen szortíroztunk különféle sejtpopulációkat a PCR analízis céljára, melyek alkalmasnak bizonyultak az mRNS szintű expressziók kimutatására.

Megjelent publikáció:

1.) Farkas Anita, Dorottya Kövesdi, Glória László, János Matkó, Imre Kacs Kovics (Eötvös Loránd University, Pázmány Péter sétány 1/C, Budapest, H-1117, Hungary) Enhanced IgG-immune complex phagocytosis and antigen presentation in macrophages and dendritic cells isolated from Tg mice that overexpress FcRn. *IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY 2011.09.03-06.*

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

2.) A téma megnevezése: Sejtmagi transzportot kontrolláló lineáris motívumok: celluláris vizsgálatok transzfekciós modellrendszerekben.

Témavezető: Dr. Reményi Attila (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Garay Ágnes PhD hallgató (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Különböző kinázok hatásának vizsgálata GFP-vel jelölt transzkripció faktor foszforilációjára, vándorlására a sejtmagból a citoplazmába, valamint a citoplazmából a sejtmagba. Kérdés, hogy a különböző kinázok milyen irányú mozgást/átrendeződést indukálnak.

Eredmények: Sikeresen szortíroztuk a GFP+-sejteket további vizsgálatok céljára. Ezen vizsgálatok jelenleg folyamatban vannak.

Megjelent publikáció: -

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

3.) A téma megnevezése: Komplement receptor expressziójának és funkciójának vizsgálata T sejteken: T limfocita populációk szortírozása (FACS) humán mandulából.

Témavezető: Dr. Erdei Anna (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Török Katalin PhD hallgató, Kremlitzka Mariann (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: A CR1 (Complement Receptor Type 1/CD35) expressziót áramlási citometriával, fluoreszcensen jelölt monoklonális anti-CD35 segítségével követjük frissen szeparált, illetve 3 napig anti-CD3-mal aktivált, vérből, illetve mandulából származó T-sejteken. A T-sejtek izolálása negatív elválasztással, cell-sorterrel történik (FACS Aria III): vérből monoklonális anti-CD19-APC, illetve anti-CD16-PE Ab hozzáadásával a mononukleáris sejtekhez, illetve mandulából anti-CD19-APC Ab segítségével.

Eredmények: Sikeresen szortíroztunk a FACS Aria III segítségével mandula eredetű sejt populációkat funkcionális vizsgálatok céljára.

Megjelent publikáció:

1.) Katalin Török, Noémi Sándor*, Marianna Kremlitzka, Zsuzsa Bajtay, Anna Erdei* (Department of Immunology, *Research group of the Hungarian Academy of Sciences, Eötvös Loránd University, Pázmány Péter s. 1/C, H-1117 Budapest, Hungary)

Expression and function of Complement Receptor type 1 (CR1, CD35) on human T cells

IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY, 2011.09.03-06.

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

4.) A téma megnevezése: Az intracelluláris kalcium szint és az F aktin átrendeződése limfocitákban. F-aktin szint mérése különböző Ca^{2+} -szintek mellett B limfocitákban.

Témavezető: Dr. Sármai Gabriella, Dr Matkó János (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Dr. Maus Máté PhD (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Az F-aktin szintjének áramlási citometriás mérése fluoreszcens jelzés használatával különböző Ca^{2+} -szintek mellett B limfocitákban. Az inverz korreláció hipotézisének megerősítése képzőcitometria segítségével, valamint az aktinátrendeződését kiváltó jelátviteli lépések azonosítása a limfocita „spreading” folyamatában.

Eredmények: Az F-aktin celluláris szintje szoros inverz összefüggést mutat a sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -szintjével. A kalcium csökkenése aktin polimerizációt vált ki, míg a kalcium szint növekedése az aktin hálózat leépülését (depolimerizáció) váltja ki.

Megjelent publikáció:

1.) Máté Maus*, David Medgyesi[§], Endre Kiss*, Ágnes Enyedi[†], Nóra Szilágyi^{||}, János Matkó*, Gabriella Sármai* :

Alterations in the cytoplasmic calcium level mediate actin cytoskeleton rearrangements and are indispensable for B cell spreading

*Department of Immunology, Eötvös Lóránd University, Budapest, Hungary,

[§]Department of Molecular Immunology Max Planck Institute of Immunology, Freiburg, Germany, [†]Department of Molecular Cell Biology, National Blood Center, Budapest, Hungary,

^{||}Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Loránd University Budapest, Hungary

Submitted to: *Molecular and Cellular Biology* (2011-09-20)

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

Department of Molecular Immunology Max Planck Institute of Immunology, Freiburg, Germany; NYU Langone Medical Center and School of Medicine, New York, NY, USA

5.) A téma megnevezése: Humán trofoblaszt modell sejtvonalak fenotípusának karakterizálása differenciálódást követően.

Témavezető: Dr. Matkó János (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Dr. Balogh Andrea tud. munkatárs (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: a BEWO sejtvonal, mint trofoblasztá differenciálható sejt fenotipikus karakterizálása a placentával (terhességgel) kapcsolatos immun-eredetű betegségek (Preeclampsia, HELLP szindróma) modellrendszerének beállítása és patomechanizmusainak felderítése céljából.

Eredmények: A karakterizált BEWO sejt segítségével jelentős, új adatokat nyertünk a PP13 galektin celluláris hatásmechanizmusával és különféle stressz szignálok valamint a PP13 szekréció összefüggéseivel kapcsolatban, mely vélhetően a Preeclampsia kórkép egyik fontos eleme.

Megjelent publikáció:

1.) Andrea Balogh, Judit Pozsgay, János Matkó, Zhong Dong, Chong Jai Kim, Tibor Várkonyi, Marei Sammar, János Rigó Jr, Hamutal Meiri, Roberto Romero, Zoltán Papp, Nándor Gábor Than

Placental protein 13 (PP13/galectin-13) undergoes lipid raft-associated subcellular redistribution in the syncytiotrophoblast in preterm preeclampsia and HELLP syndrome.

Am J Obstetr Gynecol 2011. Vol. 205, Issue 2, Pages 156.e1-156.e14

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

Dr. G.N. Than, Wayne State University, Detroit, Michigan (USA)

6.) A téma megnevezése: Antigen-specifikus B limfociták detektálása és szortírozása autoimmun betegek véréből funkcionális vizsgálatok céljára.

Témavezető: Dr. Sármay Gabriella (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Pozsgay Judit PhD hallgató, Szili Dániel PhD hallgató, Szarka Eszter PhD hallgató (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Autoreaktív B sejtek szelektív depléciója rheumatoid arthritis-ben. A cél anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyagokat termelő autoreaktív B sejtek megtalálása különböző citrullinált fibrin epitópokkal, valamint feldúsításuk a sejtiszorter (FACS Aria III) segítségével. Feladatok: fibrin epitópokra specifikus B-sejtek tenyésztése, karakterizálása, komplement dependens elpusztításuk, ill. ADCC-vel való eliminálásuk módjának kidolgozása.

Eredmények: biotinált, citrullint tartalmazó fibrin epitóp peptidekkel fedett gyöngyök segítségével a rheumatoid arthritises betegek véréből izolálunk B sejteket. A módszer beállítás alatt áll. A további részfeladatokhoz szükséges, receptorokhoz kötődő peptidek ill. komplement-aktiváló peptidek jellemzése a FACS Aria III segítségével folyamatban van. Eddig három FcγRI-hez feltételezetten kötődő és egy komplementaktiváló peptidek vizsgáltunk. A három peptid közül egy kötődött megfelelően THP1 és U937 sejtekhez, a kötődést éppúgy, mint az FcγRI expressziót az INF előkezelés növelte. Ez a peptid fokozta a petiddel fedett gyöngyök fagocitózist is. Áramlási citometriás módszert állítottunk be a komplementet aktiváló peptid citotoxikus hatásának mérésére is.

Megjelent publikáció:

Eszter Szarka*, Zsuzsa Neer*, Péter Balogh, Monika Ádori, Adrienn Angyal, József Prechl, Endre Kiss, Zsuzsa Barad, Dorottya Kövesdi, and Gabriella Sármay:

Modulation of collagen-induced arthritis by targeting FcγRII/III: enhanced synthesis of the collagen peptide-specific IgG2a and altered cytokine and chemokine secretion

Manuscript submitted to: **International Immunology, 2011.**

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

RAPEP_09: NFÜ (NKTH)- ANR francia-magyar kétoldali együttműködési szerződés által támogatott kutatás. A franciaországi partner: G.Serre, Laboratory of "Epidermis Differentiation and Rheumatoid Autoimmunity", UMR 5165 CNRS-Toulouse III University, Purpan Hospital, Place du Dr Baylac, TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9, France

7.) A téma megnevezése: Komplement receptor expressziós mintázat vizsgálata autimmun betegekben. B limfocita populációk detektálása és szortírozása humán vérből és mandulából és azok jellemzése.

Témavezető: Dr. Erdei Anna (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Kremlitzka Mariann PhD hallgató (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Nyugvó és memória B-sejtek szeparálása az 1-es típusú komplementreceptor funkciójának vizsgálatához.

Eredmények: A BD FACSAria készülék használat során a CR1 és CR2 komplementreceptorok expresszióját vizsgáltuk CD27-CD19+ naív, CD27+CD19+ memória B-sejteken, valamint CD27^{high}CD19^{low} plazmablasztokon. Méréseinket autoimmun és egészséges egyedek vérből izolált sejteken végeztük, hogy megvizsgáljuk az autoimmun folyamatok során esetlegesen bekövetkező változásokat. Eredményeink alapján a komplementreceptorok eltérő mértékben expresszálódnak az egyes B-sejt alpopulációkon. A beteg egyedek a komplementreceptorokat alacsonyabb mértékben expresszálják. A FACSAriaIII berendezés segítségével naív és memória B-sejteket szeparáltunk egymástól egészséges egyedek vérből. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a CR1 hatását a komplementreceptort eltérő mértékben expresszáló populációk között. Funkcionális eredményeink alapján a naív és memória B-sejtek eltérő mértékben reagálnak a CR1 keresztkötésére, ami összhangban áll expressziós eredményeinkkel.

Megjelent publikáció:

1.) KREMLITZKA, Mariann, Bernadett Valent, Anna Erdei *Eötvös Lóránd University, Department of Immunology, Budapest, Hungary*. Crosslinking Complement receptor type 1 (CR1, CD35) mediates inhibitory signals in human B cells. **IMPULSE 2011, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY 2011.09.03-06.**

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

8.) A téma megnevezése: A Protein kináz D neuroprotektív szerepének vizsgálata

Témavezető: Dr. Schlett Katalin (Biológiai Intézet, Élettani és Neurobiológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Dr. Tárnok Krisztián tud. munkatárs, Liliom Hanna, Bencsik Norbert hallgatók (Biológiai Intézet, Élettani és Neurobiológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: A protein kináz D (PKD) enzim a szerin-threonin kinázok közé tartozó, alternatív diacil-glicerol receptor, mely igen sokféle sejtszintű folyamat szabályozásában vesz részt. Nem-neuronális sejtekben kimutatták, hogy oxidatív stressz alatt a PKD aktivitás az NF- κ B szignalizációs útvonalon keresztül segíti a sejt reaktív szabadgyököktől való megtisztítását és a sejtek túlélését. Ebben az értelemben a PKD a mitokondriumokban keletkező, reaktív oxigén-származékok semlegesítésére szolgáló, a túlélést segítő kulcsmolekulaként is funkcionál. Idegsejtekben eddig arról van adat, hogy a lipopoliszacharid (LPS) kiváltotta gyulladási folyamatok vagy a DNS károsodása egyaránt fokozott PKD aktivitáshoz vezet. Saját eddigi kutatásaink bizonyították, hogy az idegsejtekben termeltetett, domináns-negatívan ható, mutáns PKD termeltetése az endogén PKD aktivitást gátolja és az érintett idegsejtek pusztulását okozza. Mindezek alapján okkal feltételezhetjük, hogy az endogén PKD aktivitás az idegsejtekben neuroprotektív hatást tölt be. In vitro vizsgálatainkat egér embrionális kortikális és hippocampális idegsejttenyészeteken végezzük, amelyekben a sejtpusztulást oxidatív stressz, ATP megvonás vagy szérum elvonással váltjuk ki. Az endogén PKD aktivitást a sejtenyészetekben farmakológiai (pl. PKD-specifikus inhibitorok, PKC aktivátorok alkalmazása) vagy genetikai eszközökkel (géncsendesítés vagy adott konstrukciók túltermeltetése, PKD mutáns transzgen állatokból előállított tenyészetek vizsgálata) befolyásoljuk, majd vizsgáljuk, hogy a PKD aktivitás módosítása milyen hatással van az idegsejtek túlélésére és a neuroprotektív szignálok aktiválódására.

A FACS berendezéssel tervezett vizsgálatokat szuszpenzióba vitt, disszociáltatott idegsejteken végezzük. Az idegsejteket ért oxidatív károsodás mértékét a mitokondriális membránpotenciál mérésével követjük, DiOC₆(3) festék és propidium-jodid kontroll alkalmazása mellett. A mutáns PKD konstrukciók idegsejtekbe juttatását Amaxa/Lonza nukleofector készülék segítségével végezzük, majd a fluoreszcensen is jelzett konstrukciókat expresszáló idegsejteket a FACS-sal el tudjuk különíteni. Az így elkülönített sejtpopulációkban pl. a mitokondriális membránpotenciál változását szelektíven tudjuk vizsgálni. A steril sorting-ra a mutáns PKD izoformát expresszáló transzgen állatokból készített tenyészeteknél van különösen szükség. Ezekben az állatokban a PKD enzim domináns-negatív, EGFP-vel taggelt mutáns formája doxiciklinnel indukálható módon termelődik, így a doxiciklinnel kezelt transzgen embriókban a mutáns PKDtermelése már az izolálást megelőzően is elindítható. Így a kiültetés időpontjában ki tudjuk válogatni a mutáns PKD formát expresszáló, fluoreszcens sejteket, ami viszonylag homogén tenyészeteket eredményez.

Eredmények: A mitokondriális membránpotenciál (MMP) mérését DiOC₆(3) festékkel feltöltött, disszociáltatott kortikális és hippocampális idegsejteken végeztük, ahol a disszociáltatást megelőzően a sejtek különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezelésen estek át. A tenyészetek egy részében PKD-specifikus inhibitorok is jelen voltak. Eredményeink szerint 24 órás 100 μ M H₂O₂ kezelés a megnövekedett MMP-ú sejtek arányát már jelentősen (~50%) megnövelte, amit a PKD-specifikus inhibitorok 1 μ M-os koncentrációban részben ki tudtak védeni. A GFP-vel jelzett konstrukciók nukleofekcióval történő bejuttatását és expresszióját szintén a FACS segítségével követjük: az optimális feltételek beállításáért a nukleofekciót követő napokon szuszpenzióba visszük a tenyészeteket és ellenőrizzük a GFP+ sejtek arányát.

Megjelent publikáció: -

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

OTKA K81934 "Analysing Protein Kinase D mediated protective functions during neurodegeneration" témavezető: Schlett Katalin; résztvevők: Vellai Tibor, Sass Miklós (ELTE Biológiai Intézet) DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) "RIN1 as a potential mediator of PKD-regulated dendritic maturation and maintenance in hippocampal neurons" közös pályázat a Stuttgarteri Egyetem Sejtbiológiai és Immunológiai Intézetével (Prof. Klaus Pfizenmaier) Vántus Tibor (MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport; Vichem Kft): PKD specifikus inhibitorok tesztelése

9.) A téma megnevezése: Gyulladásgátló terápiás célpontok azonosítása in vivo autoimmun modellekben: Src-kinázok szerepe arthritisben

Témavezető: Dr. Mócsai Attila (Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Dr. Kovács Miklós PhD hallgató (Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet)

A téma feladatainak leírása: Egérmodellekből származó izületi folyadékok sejtjeiből granulociták szelektív szortírozása a FACS Aria III készülékkel, további PCR expressziós analízis céljára.

Eredmények:

Megjelent publikáció:

¹KOVÁCS Miklós , ¹Edina Simon, ¹Zoltán Jakus, ²Clifford A. Lowell, ¹Attila Mócsai *Src-family kinases are required for the development of autoimmune arthritis*¹Semmelweis University School Of Medicine, Department of Physiology, Budapest, Hungary; ²University of California, San Francisco, CA, USA

IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY, 2011.09.03-06.

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések: University of California, San Francisco, CA, USA

10.) A téma megnevezése: Leukocytá populációk izolálása Toll-receptor expressziós vizsgálatokhoz. Egér csontvelői DC sejtek szortírozása.

Témavezető: Dr. Prechl József (MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Herbáth Melinda PhD hallgató (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: A FACS Aria III készüléken egér csontvelőből differenciáltatott DC kultúrát szortíroztunk (MHCII expresszió alapján). Így elkülönítettük a BMDC-eket a többi sejtípustól, melyek a differenciáció során keletkeztek. A BMDC-k TLR9 expressziójának más immunsejt típusokkal (T sejt, B sejt) történő összehasonlító vizsgálata az elsődleges cél a projekt során.

Eredmények:

Megjelent publikáció:

1.) ¹HERBÁTH Melinda, ²Zsuzsanna Szekeres, ^{1,2}Anna Erdei, ²József Prechl:
Improved cellular uptake significantly enhances immunogenic properties of CpG-antigen conjugates.

¹Eötvös Loránd University, Department of Immunology, ²ELTE-MTA Hungarian Academy of Sciences, Immunology Research Group, Budapest, Hungary

IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY, 2011.09.03-06.

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

11.) A téma megnevezése: Melanoma sejtek apoptózisának vizsgálata a DYNLL-Bmf fehérje kölcsönhatás befolyásolásával.

Témavezető: Dr. Nyitrai László (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Rapali Péter és Bakos Anita tud. smts. és Biri Beáta MSc hallgató (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: A melanomákban leggyakrabban a Ras szignalizációs út egyes komponenseinek mutációi (N-Ras, B-Raf) vezetnek a kontrolálatlan sejt szaporodáshoz. Bár MAP-kináz inhibitorokkal a szignál túlműködés gátolható, a melanoma sejt vonalak mintegy fele rezisztens erre a kezelésre. A feltehető ok, hogy DYNLL (LC8 dinein könnyűlánc) csomóponti fehérje a citoskeletonhoz szekvesztrál több "BH3-only" családba tartozó proapoptotikus fehérjét (Bmf, Bim), megakadályozva ezzel az apoptózis beindulását. Munkánk során in vitro irányított evolúcióval (fág bemutatás) kifejlesztett peptidekkel, amelyeket transzfektálással illetve penetrációval juttatunk be a sejt vonalakba, megpróbáljuk meggátolni a DYNLL-Bmf kölcsönhatását. Az apoptózis során lejátszódó DNS-fragmentációt és foszfatidilszerin transzlokációt FACS készülék segítségével detektáljuk.

Eredmények: Az apoptózis tesztrendszer beállítottuk, s az eddig megvizsgált hat melanoma sejt vonal közül (amelyek a SE Patológiai Intézetből származnak) hármat rezisztensnek találtunk a CI-1040 MEK inhibitor jelenlétében is. Sikerült a sejt vonalak transzfektálását is optimalizálni GFP konstrukciók segítségével. Elkészültek az első penetráló peptidek is, ahol a kompetitív DYNLL-kötő peptide(ke)t oligo-Arg vázhoz kapcsoltuk.

Megjelent publikáció:

P. Rapali, Á. Szenes, L. Radnai, A. Bakos, V. Grolmusz, G. Pál, L. Nyitray (2011)
DYNLL/LC8: A Light Chain Subunit Of The Dynein Motor Complex And Beyond
4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, 2011 (előadás)

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

hazai: Grolmusz Vince, ELTE TTK Matematikai Intézet, Hudecz Ferenc és Bánóczi Zoltán, ELTE TTK Kémiai Intézet, Hegedűs Balázs, SE II. sz. Patológiai Intézet;
Gergely Katona, Department of Chemistry, University of Gothenburg, Sweden

12.) A téma megnevezése: Autoimmun és normál limfociták membrán gangliozid és koleszterin szintjének összehasonlító analízise.

Témavezető: Dr. Matkó János (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában a témavezetőkön kívüli résztvevők: Dr. Balogh Andrea tud. Mts, Izsépi Emese tud. smts, Csala Anna MSc hallgató (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: A limfocita sejtek (alpopulációk) membrán gangliozid és koleszterin tartalmának összehasonlító analízise normál és autoimmun T ill. B sejtpopulációkban. A sejtpopulációk elkülönítése és az expressziók kvantitatív jellemzése szelektív fluoreszcens citokémiai jelzések alapján.

Eredmények: Az eddigiek során sikerült meggyőzően kimutatnunk, hogy az autoimmun betegekben (RA) származó T limfociták magasabb membrán gangliozid (GM1) és koleszterin szintet mutatnak és ez függvénye a betegség státusának is (aktív ill. progresszív állapot).

Megjelent publikáció:

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

OTKA-NFÜ támogatott célzott kutatási pályázat: Semmelweis Egyetem-MTA Lipidanyagcsere Kutatócsoport, Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet.

13.) A téma megnevezése: Tanicita sejtek szortolása GFP-pozitivitás alapján.

Témavezetők: Dr. Fekete Csaba (MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet/Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport), Dr. Gereben Balázs (MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet / Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport)

A téma munkájában a témavezetőkön kívüli résztvevők: Dr. Zeöld Anikó (MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet / Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport)

A téma feladatainak leírása: Vizsgálatainkhoz olyan transzgenikus egereket használunk, melyek nestin promóter alatt expresszálják a GFP-t. Mikrodisszekcióval

(mikroszkóp alatt) kivágjuk ezen egerek *eminentia mediana* nevű agyterületét; célunk a harmadik agykamra körül elhelyezkedő speciális gliasejtek elkülönítése a szövetdarab többi sejtjeitől az alapján, hogy a transzgenikus állatokban a nestint expresszáló sejtek GFP-t is termelnek, így zölden világítanak. A 4-8 egerből kivágott kis szövetdarabokat papainnal disszociáltatunk, majd a sejteket PBS-ben vesszük fel és megfelelő szűrés után próbáljuk meg a tanicita sejteket sejtiszortírozás során feldúsítani/izolálni.

Eredmények:

Megjelent publikáció:

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

14.) A téma megnevezése: Citrullinált peptidok hatásmechanizmusának vizsgálata az immunrendszer adaptív ágában.

Témavezető: Dr. Sármay Gabriella (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Szarka Eszter, Szili Dániel PhD hallgatók (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása:

- a) B sejtek citrullinált peptid felvételének áramlási citometriás analízise.
- b) A B-sejteket érő szignálok integrációjának vizsgálata flow-citometriás módszerekkel (HTS assay módszerek beállítása a tirozin-foszforilációs mintázatok és citokin termelés analízisére).

Eredmények: a) Azonosítottunk egy 5 tagú, citrullint tartalmazó filaggrin peptidet, amelyet az anti-citrullinált fehérje/peptid ellenanyag (ACPA) pozitív betegek egy csoportjának szérum mitája felismer. A felismerés specificitása 98% szenzitivitása 50 % körüli. A peptid alkalmas RA betegek diagnózisára/prognózisára alkalmas eljárás kifejlesztésére. RA betegek in vitro sejttenyészetében is kimutattunk a citrullinált filaggrin epitópra specifikus ellenanyagot, amely mennyiségét a TLR9-on keresztüli stimuláció jelentősen fokozta. A peptid segítségével lehetővé válik az ACPA termelést szabályozó faktorok vizsgálata sejttenyészetben.

b) Beállítottuk a foszfo-flow HTS módszert, amelynek segítségével összehasonlítottuk egészségesek és RA betegek B sejtjeiben a BCR és TLR9 ko-szignál hatására aktiválódó néhány kinázt és transzkripciós faktort. RA mintákban a CREB transzkripciós factor aktivitása BCR stimulus hatására magasabb volt mint az egészségesekben. Aktív RA betegek naiv B-sejtjeiben a kontrollokéhoz képest BCR stimulus hatására a p38 MAPK és CREB transzkripciós factor aktivitása is emelkedett.

B sejtek citokin termelését FlowCytomix Multiplex rendszer segítségével vizsgáltuk. Az anti-Ig által kiváltott stimulus indukálta a IL-6, és IL-10 termelését, amelyet a CpG (TLR9 agonista) kisebb mértékben váltott ki. A két szignál együttes hatása additívnek tűnik. Tak1 kináz inhibitorral a citokin termelést minden esetben gátolni lehetett.

Megjelent publikáció:

1.) Eszter Szarka, Monika Adori, Fruzsina Babos, Anna Magyar, Ferenc Hudecz, György Nagy, Judit Pozsgay, Gabriella Sármay:
SHORT CITRULLINATED EPITOPE OF FILAGGRIN IS RECOGNISED BY SERA AS WELL AS ANTIBODIES PRODUCED IN VITRO BY B CELLS OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS. Annals of the Rheumatic Diseases, 2011; 70, (Suppl 2) A64. (poster abstract). 31st European Workshop of Rheumatology Research March 3-6 2011 Amsterdam, The Netherlands

2.) G. Sármay, E. Szarka, J. Pozsgay, D. Szili, F. Babos, Gy. Nagy, B. Rojkovich, A. Magyar, F. Hudecz: *Citrullin containing peptides as B-cell epitopes. 4th European Conference of on Chemistry for Life Sciences*, August 31-September 3., 2011. Budapest. (Előadás+ rövid közlemény konferencia kiadványban, *Medimond, International proceedings, Bologna, Italy, 2011.*)

3.) ¹SZARKA Eszter, ¹Judit Pozsgay, ²Fruzsina Babos, ³Zsuzsanna Baka, ²Anna Magyar, ²Ferenc Hudecz, ³György Nagy, ¹Gabriella Sármay: *New, citrullin containing filaggrin peptide that could be adapted for diagnosis of RA and for characterization of RA B-cells* ¹Eötvös Loránd University, Department of Immunology, Budapest, Hungary; ²HAS-ELTE, Research Group of Peptide Chemistry, Hungary; ³Semmelweis University, Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Hungary
IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY, 2011.09.03-06.

4.) Daniel Szili, Anikó Hancz, Zoltán Hérincs, Melinda Simon, Gábor Koncz, Gabriella Sármay: *Cooperation between signaling pathways leading to survival, proliferation or death of human B-cells*
Annals of the Rheumatic Diseases, 2011; 70, (Suppl 2) A15. (poster abstract)
31st European Workshop of Rheumatology Research March 3-6 2011 Amsterdam, The Netherlands

5.) Szili Dániel: Signal integration in B-cells (előadás); Sármay Gabriella: Receptor cross-talk: nodes of coordination in B-cell signaling (előadás), **Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlése, 2011. Kecskemét, Október 12-14.**

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

OTKA-NFÜ által támogatott célzott kutatás, partnerek: Budai Irgalmasrendi Kórház, MTA –ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

15.) A téma megnevezése: Az ösztrogén hormon immunmoduláló hatásainak (membrán ösztrogén receptorok) vizsgálata limfocitákon.

Témavezető: Dr. Matkó János (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Schneider Andrea PhD hallgató, Schuszter Kitti MSc hallgató (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék)

A téma feladatainak leírása: Lépsejtek ill. szeparált lép T és B limfociták aktivációjára, proliferációjára gyakorolt hatások vizsgálata. Az ER expressziós mintázat feltárása különböző immunszervekben. A receptor által közvetített jelátvitel karakterizálása.

Eredmények: Az eddigi vizsgálatok során új membrán ösztrogén-receptorokat mutattunk ki limfocitákon. Ezek azonosítása folyamatban van, valamint a receptor feltérképezése is különböző T sejt tartalmú szervekben, mint pl. tímusz, lép, nyirokcsomók, az egyes T-sejt alpopulációkban.

Megjelent publikáció:

1.) SCHNEIDER Andrea, Kitti Schuszter, Endre Kiss, Glória László, János Matkó:
Eötvös Lóránd University, Department of Immunology, Budapest, Hungary
Membrane estrogen receptor(s) on lymphocytes: Who are they and can they regulate the immune responses? **IMPULSE, International EFIS Symposium, Visegrád, HUNGARY, 2011.09.03-06.**

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:

16.) A téma megnevezése: A reprodukció centrális szabályozásában kulcsszerepet játszó GnRH-1 neuronok génexpressziós mintázatának feltérképezése.

Témavezető: Dr. Liposits Zsolt (MTA-KOKI)

A téma munkájában résztvevő kutatók: Hrabovszky Erik (MTA-KOKI), Sárvári Miklós (MTA-KOKI), Vastagh Csaba (MTA-KOKI)

A téma feladatainak leírása:

GnRH neuronok felnőtt korú GnRH-1/GFP transzgenikus egerekből történő izolációjának módszertani kidolgozása: Proteolitikus (papainos) szöveti disszociációt követő FACS eljárás révén lehetővé válik GnRH/GFP transzgenikus egerek GnRH-1 neuronjainak elkülönítése a hipotalamusz egyéb alkotóelemeitől. A szortolt sejtek minőségi jellemzését GnRH-1, neuronális és glia markerek kimutatásával, PCR és immuncitokémiai módszerekkel végezzük. A sejtekből RNS-t izolálunk, amelynek mennyiségét és minőségét Bioanalyzer készülékkel határozzuk meg. Megfelelő mennyiségű és minőségű RNS izolátum megléte további vizsgálatok és eljárások – pl. *next generation sequencing* – elindítását teszi lehetővé.

Eredmények:

Egy előkísérlet kapcsán ~3000 GFP-pozitív sejtből magas integritású (RIN 6.1) RNS-t sikerült izolálnunk.

Megjelent publikáció:

A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések: