

**Elemi kutatási témák a „Multiparaméteres Fluoreszcencia Aktivált Sejtanalízis és Szortírozás” (FACS) 2.4. TÁMOP részprojekt keretében:  
2011-02-05 és 2011-07-07 között**

**1. EGFP transzfektált HEK sejtek sortolása NFAT jelátviteli vizsgálatokhoz.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Garai Ágnes (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** Különböző kinázok hatásának vizsgálata GFP-vel jelölt transzkripciófaktor 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.

**2. FcRn expressziós vizsgálatok egér lépsejt populációkon.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Farkas Anita (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék), Végh Attila (Immunogenes Kft).

**A téma feladatainak leírása:** Egér lépéből makrofág, granulocita, DC sejtek, limfocita sortolása PCR analízishez.

**Eredmények:** Sikeresen szortíroztunk különféle sejtpopulációkat a PCR analízis céljára, melyek alkalmasnak bizonyultak az mRNS szintű expressziók kimutatására.

**3. Komplement receptor expresszió vizsgálata T sejteken: humán mandulából T limfocita szortírozása.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Török Katalin (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.

#### **4. Receptor jelátviteli párbszéd B limfocitákban. F-aktin szint mérése különböző $Ca^{2+}$ -szintek mellett B limfocitákban.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Dr. Maus Máté (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** Az F-aktin szintjének áramlási citometriás mérése fluoreszcens jelzés használatával.

**Eredmények:** Az F-aktin szintje szoros összefüggést mutat a sejtek citoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -szintjével. A kalcium csökkentése aktin polimerizációt vált ki, míg a kalcium növelése az aktin hálózat leépülését (depolymerizáció) váltja ki.

**A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:**  
Dr. Stefan Feske, NYU Langone Medical Center and School of Medicine  
550 First Avenue, New York, NY 10016.

#### **5. Humán trofoblaszt modell sejtvonalak fenotípusának karakterizálása differenciálódást követően.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Dr. Balogh Andrea (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék)-

**A téma feladatainak leírása:** a BEWO sejtvonal, mint trophoblasttá differenciálható sejt fenotipikus karakterizálása a placentával (terhességgel) kapcsolatos immun-eredetű betegségek (Preeclampsia, HELLP szindróma) patomechanizmusainak felderítése kapcsán.

**Eredmények:** A karakterizált BEWO sejt segítségével jelentős, új adatokat nyertünk a PP13 galektin hatásmechanizmusával kapcsolatban.

**Megjelent publikáció:**

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

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

Am J Obstet Gynecol 2011;205:x - doi: 10.1016/j.ajog.2011.03.023.

**A témához csatlakozó nemzetközi, vagy hazai együttműködések:**

Nemzetközi együttműködés: Dr. Gabor N. Than, Wayne State University, Detroit, Michigan (USA)

**6. Antigén-specifikus B limfociták sortolása humán autoimmun vérből funkcionális vizsgálatok céljára.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Pozsgay Judit PhD hallgató, Szili Dániel PhD hallgató (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** Autoreaktív B sejtek szelektív depléciója rheumatoid arthritis-ben. A cél anticitrullinált ellenanyagokat termelő autoreaktív B sejtek megtalálása különböző citrullinált fibrin epitópokkal, valamint a sejtorter (FACS Aria III) segítségével. Feladatok: tenyésztés, karakterizálás, komplement dependens elpusztításuk, ADCC-vel való eliminálásuk. A B sejteket érő szignálok integrációjának vizsgálata flow-citometriás módszerekkel (HTS assay módszerek beállítása a tirozin-foszforilációs mintázatok analízisére).

**Megjelent publikáció:**

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

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

Manuscript submitted to: **Clinical Immunology**

*COOPERATION BETWEEN SIGNALLING PATHWAYS LEADING TO SURVIVAL, PROLIFERATION OR DEATH OF HUMAN B CELLS*

Daniel Szili, Anikó Hancz, Zoltán Hérincs, Melinda Simon, Gábor Koncz, Gabriella Sármai

**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.

**7. Komplement receptor expressziós mintázat vizsgálata autimmun betegekben. Humán vérből és mandulából B limfocita sortolása.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Kremlitzka Mariann (Biológiai Intézet/Immunológiai Tanszék).

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

**Eredmények:** A BD FACSCalibur készülék használat során a CR1 és CR2 komplementreceptorok expresszióját vizsgáltuk CD27-CD19+ naív, CD27+CD19+ memória B-sejteken, valamint CD27<sup>high</sup>CD19<sup>low</sup> plazmablasztokon. Méréseinket autoimmun és egészséges egyedek véréből 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-n végzett méréseink során naív és memória B-sejteket szeparáltunk egymástól egészséges egyedek véréből. 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.

## **8. A Protein kináz D neuroprotektív szerepének vizsgálata.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Dr. Tárnok Krisztián, Liliom Hanna, Bencsik Norbert (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- $\kappa$ 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 transzgén állatokból előállított tenyészetek vizsgálata) befolyásoljuk, majd vizsgáljuk, hogy a PKD aktivitás módosítása milyen hatással van az idegsejtek túlélésére és a neuroprotektív szignálok aktiválására.

A FACS berendezéssel tervezett vizsgálatokat szuszpenzióba vitt, disszociáltatott idegsejteken végezzük. Az idegsejteket ért oxidatív károsodás mértékét a mitokondriális membránpotenciál mérésével követjük, DiOC<sub>6</sub>(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 transzgén 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 transzgén 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 DiOC<sub>6</sub>(3) festékkel feltöltött, disszociáltatott kortikális és hippokampális idegsejteken végeztük, ahol a disszociáltatást megelőzően a sejtek különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kezeléssel estek át. A tenyészetek egy részében PKD-specifikus inhibitorok is jelen voltak. Eredményeink szerint 24 órás 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés a megnövekedett MMP-ú sejtek arányát már jelentősen (~50%) megnövelte, amit a PKD-specifikus inhibitorok 1 µM-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.

## **9. Egér ízületi folyadék granulocitáinak sortolása mRNS expressziós vizsgálatokhoz.**

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

**A téma munkájában a témavezetón kívüli résztvevők:** Dr. Kovács Miklós (Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet)

**A téma feladatainak leírása:** Egérmodellekből származó ízületi folyadékok sejtjeiből granulociták szelektív szortírozása a FACSAriaIII készülékkel, további PCR expressziós analízis céljára.

## **10. Leukocita populációk izolálása Toll receptor expressziós vizsgálatokhoz. Egér csontvelői DC sejtek sortolása.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Herbáth Melinda (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék).

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

### **11. Melanoma sejtek apoptózisának vizsgálata fluoreszcens markerekkel.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Bakos Anita (Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** Különböző melanoma sejtvonalak inhibitor által kiváltott apoptózisának vizsgálata, ezek összehasonlítása.

**Eredmények:** A melanóma sejtvonalak közül sikerült kiválasztani azt, amely leginkább érzékenynek mutatkozott. A továbbiakban ezen sejteken vizsgáljuk az inhibitor hatását az apoptózis kiváltása vonatkozásában.

### **12. Autoimmun és normál limfociták membrán gangliozid és koleszterin szintjének összehasonlító analízise.**

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

**A téma munkájában a témavezetőn kívüli résztvevők:** Izsépi Emese, Dr. Balogh Andrea, Csala Anna (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** A limfocita sejtek (alpopulációk) membrán gangliozid és koleszterin tartalmának összehasonlító analízise normál és autoimmun sejteken.

**Eredmények:** Sikerült meggyőzően kimutatnunk, hogy az autoimmun betegekből származó T limfociták magasabb membrán gangliozid (GM1) és koleszterin szintet mutatnak.

### **13. 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 egérből kivágott kis szövetdarabokat papainnal disszociáltatunk, majd a sejteket PBS-ben vesszük fel és megfelelő szűrés után sortoljuk.

#### **14. Citrullinált peptidek hatásmechanizmusának vizsgálata az immunrendszer adaptív ágában. Transzfektált GFP-transzkripció faktorok és a citokintermelés kapcsolatának vizsgálata.**

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

**A téma munkájában a témavezetőkön kívüli résztvevők:** Szarka Eszter (Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék).

**A téma feladatainak leírása:** Jurkat T sejtek transzfektálása vad típusú, illetve mutáns NF-AT-vel, majd ezen transzfektált sejtek IL-2 termelésének összehasonlítása. B sejtek citrullinált peptid felvételének áramlási citometriás analízise.

**Megjelent publikáció:** *SHORT CITRULLINATED EPITOPE OF FILAGGRIN IS RECOGNISED BY SERA AS WELL AS ANTIBODIES PRODUCED IN VITRO BY B CELLS OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS*

Eszter Szarka, Monika Adori, Fruzsina Babos, Anna Magyar, Ferenc Hudecz,

György Nagy,<sup>3</sup> Judit Pozsgay,<sup>1</sup> Gabriella Sármay<sup>1,4</sup>

*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