

Kedves Kollégák!

Köszöntjük a Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Konferenciájának résztvevőit! Pécsi összejövetelünk – a hagyományok szellemében – lehetőséget ad a hazai biofizikai műhelyeknek, hogy munkájukat itthon is bemutassák, a fiatal kutatóknak, hogy gyakorlatot szerezzenek a nyilvános szereplésben és megismerjék személyesen azokat, akiket már név szerint ismernek; ezen kívül módot ad mindannyiunknak arra, hogy találkozzunk, megismerjük egymás legújabb munkáit. A Kongresszus – az előadásokon és poszterek bemutatásán túl – alkalmat kínál személyes beszélgetésekre, s szűkebb szakmai látóköri határain túlnyúló új, közös programok elindítására. A jelen program- és absztraktfüzet, amelyet az olvasó most a kezében tart, átfogó válogatás az elmúlt két év hazai biofizikai kutatásainak az eredményeiből. Kívánjuk, hogy mindenki forgassa érdeklődéssel és meglelégedéssel! Idei kongresszusunknak külön ízt és hangsúlyt ad, hogy e kellemes és élénk szellemi központ, Pécs ad neki otthont. Ez a város évtizedek óta rajta van a „Biofizika világtérképén”, s minden okunk megvan azt remélni, hogy tartósan rajta is marad. A Magyar Biofizikai Társaság és a Szervezőbizottság nevében hasznos és kellemes napokat kívánunk minden résztvevőnek!

Tisztelettel,

Nyitrai Miklós

a Kongresszus elnöke

Tigyi József

az MBFT és a Kongresszus
tiszteltbeli elnöke

Závodszky Péter

az MBFT elnöke



Dr. Pálinkás József, az MTA elnöke

Dr. Páva Zsolt, Pécs polgármestere

Dr. Gábrriel Róbert, a PTE rektora



Augusztus 23. (vasárnap)

- 18:00 Köszöntő, megnyitó
- 18:20 Plenáris előadás
Investigating the Strain Sensor in Muscle Fibres Using Fluorescence Lifetime Imaging
Michael A. Ferenczi, az EBSA (European Biophysical Societies' Association) elnöke
- 19:20 Állófogadás a PAB Székházban

Augusztus 24. (hétfő)

I. Orvosfizika, orvos-biológia és sugárbiológia

Szekcióvezetők: Sáfrány Géza, Pellet Sándor

- 9:00-9:25 *A kis dózisu ionizáló sugárzás hatása az immunrendszerre*
Lumniczky Katalin
- 9:25-9:40 *Kisdózisu γ sugárzás hatása a génexpresszióra*
Hegyesi Hargita
- 9:40-10:05 *Ionizáló sugárzások orvostudományi alkalmazásainak sugárvédelme, különös tekintettel a páciensek sugárterhelésére*
Pellet Sándor
- 10:05-10:20 *Gyermekeken végzett CT vizsgálatok sugárvédelmének optimalizálása*
Giczi Ferenc
- 10:20-10:35 *A máj ultrahang attenuációjának jelentősége krónikus diffúz májbetegségekben*
Szebeni Ágnes



10:35-10:50 *Tartósító eljárások hatása regionális élelmiszer termékek minőségére*
Páli Tibor

II. Biológiai membránok, ioncsatornák és membránfehérjék

Szekcióvezetők: Török Zsolt, Mátyus László

11:10-11:35 *Citokinreceptorok sejt felszíni elrendeződésének biofizikai analízise humán T sejteken*
Dóczy-Bodnár Andrea

11:35-11:55 *Sejt felszíni receptorklaszterek összetevőinek vizsgálata biofizikai módszerekkel*
Jenei Attila

11:55-12:15 *A plazmamembrán mikroheterogén szerveződésének vizsgálata ultraszenzitív fluoreszcencia mikroszkópiával: a „magashőmérséklet-jel” képzésének lehetőségei*
Török Zsolt

12:15-12:30 *Az aszkorbát a második fotokémiai rendszer alternatív elektron donorja*
Tóth Szilvia

12:30-12:45 *Egy skorpióméregből származó peptid ioncsatorna-szelektivitásának javítása pontmutációk segítségével*
Varga Zoltán

12:45-13:00 *A primycin antibiotikum hatásmechanizmusa: membrán dinamikai vizsgálatok EPR és steady-state fluorimetriás módszerekkel*
Virág Eszter

14:30-15:15 *Chiraz Frydman (Horiba Jobin Yvon, France)*
Easy and fast approach for real-time label free array-based biomolecular interaction analysis by Surface Plasmon Resonance imaging

15:15-15:30 *Kávészünet*



- 15:30-17:30** *Poszter szekció*
(Minden poszter megtekinthető lesz a konferencia teljes időtartama alatt. A poszter szekciók idejében a poszter bemutatót kérjük, legyenek a poszterük mellett)
- 17:00** *MBFT elnökségi ülés*
19:00 *Vacsora a Tettye vendéglőben*

Augusztus 25. (kedd)

III. Modern biofizikai módszerek

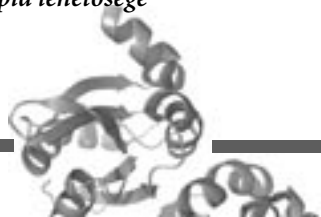
Szekcióvezetők: Kellermayer Miklós, Derényi Imre

- 9:00-9:25** *A nagy teljesítményű szűrés lehetőségei és problémái*
Csúcs Gábor
- 9:25-9:50** *A $\beta 2$ -mikroglobulin amiloidképzésének vizsgálata korszerű biofizikai módszerekkel*
Kardos József
- 9:50-10:15** *Egy biológiai mintakészítés utóélete*
Váró György
- 10:15-10:30** *A tropomiozin szerepe a kortikális aktin hálózatok szabályozásában*
Bugyi Beáta
- 10:30-10:45** *Hogyan sétál a kinezin?*
Czövek András
- 10:45-11:00** *Mikroméretű eszközök készítése és funkionalizálása biológiai alkalmazásokhoz optikai csipeszben*
Kelemen Lóránd

IV. Fehérjebiofizika

Szekcióvezetők: Fidy Judit, Simon István

- 11:20-11:45** *Az aminosav oldalláncok rotációs frekvenciáinak jelentősége: funkcionális THz spektroszkópia lehetősége*
Málnási-Csizmadia András



- 11:45-12:10 *Egy ritkán használt termodinamikai paraméter, a nyomás. Mit tudhatunk meg az összenyomott fehérjék vizsgálatából?*
Smeller László
- 12:10-12:25 *A DAAM formin-homológia doménjének vizsgálata biofizikai módszerekkel*
Barkó Szilvia
- 12:25-12:40 *Aktinkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságára*
Kardos Roland
- 12:40-12:55 *Fotoszintetizáló baktériumok szinkronizálása: molekuláris és membránátrendeződések*
Asztalos Emese
- 12:55-13:10 *A mutációs robusztusság evolúciója mikroRNS szekvenciákban*
Szöllősi Gergely
- 14:30-15:15 *Az MBFT F fiatal Kutatói pályázatok ünnepélyes eredményhirdetése, a díjazott fiatal kutatók előadásai*
A díjakat átadja Závodszy Péter, az MBFT elnöke, és Tigyi József, az MBFT és a Konferencia tiszteletbeli elnöke
- 15:15-15:30 *Kávészünet*
- 15:30-17:30 *Poszter szekció*
- 18:00 *Villányi látogatás a Blum Pincébe*

Augusztus 26. (szerda)

V. Spektroszkópia és képpalkotás

Szekcióvezetők: Szalontai Balázs, Belágyi József

- 9:00-9:25 *Fehérjéken belüli elektrontranszport*
Maróti Péter



- 9:25-9:50 *Klorofill prekursorok natív szerkezete, spektrális tulajdonságai és élettani szerepe*
Böddi Béla
- 9:50-10:05 *Makroszkóposan és mikroszkóposan rendezett rendszerek ESR spektrumainak szimulációja a lassú forgású tartományban*
Gróf Pál
- 10:05-10:20 *A fehérjék jelenlétének hatása a DNS-porfirin kölcsönhatásra*
Csík Gabriella
- 10:20-10:35 *Önszerveződő mesterséges klorozómák, porfirin nanorudak anizotróp sajátságai*
Anita Župčanová
- 10:35-10:50 *A sötétben hajatott tiszafa (*Taxus baccata*) klorofill bioszintézisének sajátosságai*
Skríbanek Anna

VI. Nanobiotechnológia

Szekcióvezetők: Ormos Pál, Vonderviszt Ferenc

- 11:10-11:30 *Vázizom titin nanomechanikai vizsgálata erővisszacsatolt lézercsippessel*
Mártonfalvi Zsolt
- 11:30-11:50 *Szerkezeti átmenetek egyedi dezmin intermedier filamentumokban*
Kiss Balázs
- 11:50-12:10 *Optikai rezonanciák jelölésmentes érzékeléshez*
Horváth Róbert
- 12:10-12:30 *Fehérjerétegek optikai vizsgálata bioszenzorikai alkalmazásokhoz*
Kurunczi Sándor
- 12:30-12:50 *Fehérjék integrált optikai alkalmazása*
Fábián László



Nyitó fogadás a PAB Székházban (augusztus 23), vacsora a Tettye Étteremben (augusztus 24), villányi látogatás a Blum Pincébe (augusztus 25). Ezen közös programok mellett – igény szerint – kulturális programokat is szervezünk a konferencia résztvevőket elkísérőknek.



ELŐADÁS ABSZTRAKTOK



*Lumniczky Katalin, Bogdándi Enikő Noémi, Balogh Andrea,
Felgyinszki Nikolett, Szatmári Tünde, Sáfrány Géza
Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi
Kutató Intézet, Budapest*

Arra kerestünk választ, hogy a kis dózisu ionizáló sugárzás hogyan befolyásolja az immunrendszert. Egereket egésztest besugárzásnak vetettünk alá és meghatároztuk a különböző limfocita alpopulációk számbeli változását. A következő funkcionális paramétereket vizsgáltuk: a T sejtek Concanavalin A-ra adott proliferációs válaszában bekövetkező változások; a lépsejtek apoptózisa, a Th1 és Th2 aktivációban szerepet játszó citokinek expressziója. Mértük a dendritikus sejtek T-sejt aktiváló képességét, és citokin termelését, valamint regulátor T-sejtek proliferációs és T-sejt gátló hatását.

Valamennyi vizsgált sejtpopuláció száma dózisu függően csökkent: a legsugár-érzékenyebbek a B sejtek, a dendritikus és a CD8+ sejtek, a legsugár-rezisztensebbek az NK és Treg sejtek voltak. A T sejtek proliferációs képessége összességében dózisu függően csökkent, de a besugárzást követő első napon 10 mGy enyhe proliferáció fokozódást okozott. Az apoptózis mértéke a 10-100 mGy-es tartományban kevésbé változott, 500 mGy-nél viszont jelentősen nőtt. A kis dózissal (50 mGy) besugarazott dendritikus sejtek jobban aktiválták az allogén T sejteket, mint a kontroll sejtek. Nagy dózisuoknál (500 mGy felett) jelentősen csökkent a dendritikus sejtek T-sejt aktivációja. T-reg sejtek proliferációja és in vitro szuppressziós képessége dózisu függő csökkenést mutatott.

Már igen kis dózisuok is jól kimutatható mennyiségi és funkcionális változásokat okoznak a különböző limfocita alpopulációkban.



*Hegyesi Hargita, Sándor Nikolett, Schilling Boglárka, Sáfrány Géza
Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató
Intézet (1221 Budapest, Anna u. 5.)*

Munkánk célja a kis dózisú direkt besugárzás és a bystander-effektus mérése diploid fibroblasztokon.

Humán primer tenyészetekben, három dózist (10mGy, 100mGy, 500mGy) választva, a γ -sugárzás hatását; valamint médiumcserével kivitelezett bystander hatás RNS expresszió változást mértünk cDNS microarray-en (44K Agilent). A microarray méréseket a SE GSI Microarray Core Facility laboratóriumban végeztük. 44000 vizsgált transzkriptum közül átlagosan néhány száz változott szignifikánsan. A sugárválasz géneket funkcionális csoportokba rendeztük és megállapíthatjuk, hogy ezek jó része, a még csak a szekvenciáiban igazoltak közé tartozik (40%). A már azonosított gének legnagyobb része a sejtciklus szabályozásában, apoptózisban, DNS repair-ben vagy a jelátvitelben játszik szerepet. 16 gén expresszióját q-RT-PCR-rel (SyberGreen/Corbett) validáltuk, majd a hitelesített gének dóziszfüggő változását vizsgáltuk tovább.

Összehasonlítottuk eltérő sugárérzékenységű fibroblasztokban a GDF-15, TP53INP1, CDKN1A1 és DLGAP4 gének változását. Az adatok analízisét követően két p53-függő gén transzkripció változását vizsgáltuk tovább; a GDF-15 és a TP53INP1 esetében mértük a génexpressziós változás időkinetikáját is.

Megállapíthatjuk, hogy a GDF-15 és a TP53INP1 is korai sugárválasz gének tekinthető, mindkettő esetében már két órával a besugárzást követően emelkedik az expresszió mértéke.

Az egyéni genetikai háttérre visszavezethető expressziós különbségek 500mGy-nél már 2-3-szorosak is lehetnek.



Ionizáló sugárzások orvostudományi alkalmazásainak sugárvédelme, különös tekintettel a páciensek sugárterhelésére

Pellet Sándor¹, Giczi Ferenc², Ballay László³, Temesi Alfréda¹, Brunner Péter¹

¹Országos Szakfelügyeleti és Módszertani Központ (Budapest, Váci út 174.)

²Széchenyi István Egyetem (9026 Győr, Egyetem tér 1.)

³“Frederic Joliot Curie” Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet (Budapest, Anna u. 5.)

A röntgensugárzás és az izotópok felfedezését rövidesen követték az ionizáló sugárzás orvostudományi alkalmazásával kapcsolatos eredményes és kevésbé eredményes próbálkozások. Rövid idő alatt nyilvánvalóvá vált az ionizáló sugárzás a testszöveteket roncsoló és egészségkárosító hatása.

Napjainkra az ionizáló sugárzások orvostudományi alkalmazásának haszna megkérdőjelezhetetlen. Mindez azonban nem jelentheti azt, hogy az embereket, különös tekintettel a pácienseket indokolatlan sugárterhelésnek tegyük ki. Az orvosi sugáralkalmazásoknál is érvényre kell juttatni a sugárvédelem alapelveit.

A röntgensugárzás és a radioaktív izotópok alkalmazásával együtt járó technikák napjainkban is feltartóztathatatlanul fejlődnek. Gondoljunk csak a többszeletes spirál CT-kre, a röntgenkontroll mellett végzett egyre bonyolultabb intervenciókra vagy a különböző képfúziós eljárásokra, pl. a PET/CT-re, amelyek újabb és újabb kihívást jelentenek a sugárvédelmi szakembereknek. A kardió CT vizsgálatok a nemzetközi irodalomban is komoly vitát váltottak ki az indokoltságuk és sugárterhelésük okán. A CT vizsgálat szűrővizsgálatként való bevezetését az amerikai FDA elutasította.

Az új technikák nem feltétlenül járnak együtt a páciensek optimált és indokolt sugárterhelésével, ezek megvalósulásának eszközeit vizsgálni kell, amelyeket előadásunkban foglalunk össze.



¹Giczi Ferenc, ²Pellet Sándor

¹Széchenyi István Egyetem, Győr, ²Országos Szakfelügyeleti és Módszertani Központ, Budapest

A CT vizsgálatok klinikai értéke megkérdőjelezhetetlen, ezért a legkorszerűbb, többszeletes spirál CT berendezések száma napról napra növekszik.

A gyermekek, azaz a 0-15 éves korosztály röntgendiagnosztikai vizsgálatra különleges megfontolásokat igényel. Különösen igaz mindez a nagy sugárterhelést okozó CT vizsgálatokra. A magas színvonalú technikai háttér ellenére a páciensek, különösen a gyermekek sugárterhelése sok esetben magasabb az indokoltnál. Ezeket a sugárterheléseket a CT vizsgálatok információ tartalmának károsodása nélkül csökkenteni lehet.

Nemzetközi tapasztalatok mutatják, hogy a gyermek CT vizsgálatokat sok esetben ugyanazokkal a technikai paraméterekkel végzik, mint a felnőtt betegek vizsgálatát. Ennek következtében a gyermekkorú betegek CT vizsgálatának sugárterhelése hasonló nagyságú, sőt nagyobb, mint a felnőttek esetében.

A CT vizsgálatok páciens sugárterhelését befolyásoló tényezők közül a legfontosabbak a berendezés típusa, geometriai paraméterei, a csőáram, a röntgenső körülfordulási ideje, a csőfeszültség, a kollimáció, az asztalmozgatás gyorsasága és nem utolsósorban a vizsgált anatómiai terület optimális megválasztása. Mivel a gyermek populációban a testméretek jelentősen eltérőek, a vizsgálat technikai paramétereinek optimális megválasztása elengedhetetlen.



A máj ultrahang attenuációjának jelentősége krónikus diffúz májbetegségekben

Szebeni Ágnes dr.

ÁEK Gasztroenterológia

A krónikus diffúz májbetegségek (CDLD) – gyulladás, toxikus máj, zsírmáj, stb. – prevalenciája növekszik. A máj ultrahang (UH) vizsgálata alapvető a CDLD diagnosztikájában, a jellegzetes UH kép, az u.n. fényes máj észlelésével. A fényes máj attenuációja (α) alapján 2 típus különíthető el, az alacsony (DI) és a magas (DII) α -s típus. Az α a betegvizsgálat folyamán referenciafantom segítségével mérhető. Bebizonyosodott, hogy az alacsony α -jú fényes máj UH képét a fibrosist okozó májbetegségek, míg a magas α -jút a zsírmáj hozza létre. Kérdés, lehet-e „cut-off” α értéket megállapítani a DI-DII típus differenciálására. Szövetteni vizsgálattal igazolt 432 esetben megmértem a máj α értékeit az egyes csoportokban (126 normál, 176 DI, 130 DII). Az eredmények azt mutatják, hogy a normál máj α -ja nem éri el az 1 dB/cm/MHz értéket. A DI típus értékei nem haladják meg az 1.1 dB/cm/MHz -t, de igen nagy átfedést mutatnak a normál értékekkel. Így a normál és a DI típus az α alapján nem különíthető el. A DII típus α értékei 1-1 esetben a 0.95-1.1 dB/cm/MHz tartományban csekély átfedést mutattak, de döntő többségük 1.1 dB/cm/MHz felett volt, így ezen érték felett a zsírmáj diagnózisa nagy valószínűséggel felállítható. Az α mérése alkalmas lehet arra is, hogy a 2 csoport közötti bio-kémiai, ill. biofizikai különbségek tudományos vizsgálat tárgyát képezzék.

^{1a}Fodor, E., ²Kispéter, J., ³Fekete, M., ²Fehér, L., ³Kovács, L., ²László, Zs.,

²Bajúsz-Kabók, K., ²Szabó, G. és ¹Páli, T.

¹ MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged, Magyarország,

² Szegedi Tudományegyetem, Élelmiszeripari Főiskolai Kar, Szeged, Magyarország,

³ Droginvest Kft., Szeged, Magyarország

Fűszer őrlmények kétféle tartósító eljárása, az ionizáló sugárzás és a nagy nyomású telített gőzzel való kezelés hatására bekövetkező változásokat tanulmányoztuk szegedi paprika őrleményben az elnyelt besugárzási dózis, a tárolási idő, valamint a paprika minőségi jellemzőinek függvényében. A pigment, szabadgyök tartalom, a szín és viszkozitás változását mértük. A nagy nyomású telített gőzzel való kezelés a tárolást követően színvesztésre (fakulásra) vezetett, amit viszkozitás változás és a kombinált kezelés során keletkezett szabadgyökök tartósabb megmaradása kísért, míg a besugárzás okozta változások reverzibilisek voltak. Szárított hagyma készítményen tanulmányoztuk a színváltozást, a mikrobiológiai tisztaságot és a szabadgyök tartalmát az ionizáló besugárzás dózisának függvényében. A makói, szerbiai és lengyel hagymafajták minen színvesztésre (fakulásra) vezetett, amit viszkozitás változás és a kombinált kezelés során keletkezett szabadgyökök tartósabb megmaradása kísért, míg a besugárzás okozta változások reverzibilisek voltak. Szárított hagyma készítményen tanulmányoztuk a színváltozást, a mikrobiológiai tisztaságot és a szabadgyök tartalmát az ionizáló besugárzás dózisának függvényében. A makói, szerbiai és lengyel hagymafajták minőnyösebb a minőség megőrzése szempontjából, segítettek az optimális besugárzási dózis megállapításában.

^a Jelenleg: MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged.



Citokinreceptorok sejt felszíni elrendeződésének biofizikai analízise humán T sejteken

Dóczy-Bodnár Andrea

MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Molekuláris Medicina Kutatóközpont, Debreceni Egyetem

A γ_c citokincsaládba tartozó IL-2, IL-9 és IL-15 kritikus szerepet játszik a T sejt immunválasz szabályozásában. Az IL-2R és IL-15R felépítésében a γ_c mellett a szintén közösen használt β lánc és egy citokin-specifikus α -alagység vesz részt. Az IL-9 biológiai hatását a γ_c láncból és az IL-9-specifikus α -láncból álló heterodimer receptorkomplex közvetíti. A közös alegység(ek) következtében ezen citokinek által kiváltott sejt válasz bizonyos fokú redundanciát mutat. A citokinek eltérő, egyedi hatásának biztosításában kiemelt fontosságú a citokin-specifikus α láncok jelenléte. A kiváltott válasz megfelelő irányba terelésében, „hangolásában” emellett fontos szerepet játszhatnak a receptorok egymással és más membránfehérjékkel kialakított molekuláris kölcsönhatásai, azok esetleges különbözősége, amely pl. eltérő intracelluláris jelátvivő molekulák bekapcsolódását is jelentheti az egyes citokinek által kiváltott válaszba. A többféle γ_c receptort expresszáló sejtek esetén felmerül a kérdés, hogy az egyes citokinek egymástól független receptorkomplexeken keresztül fejtik-e ki hatásukat vagy osztoznak a közös alegység(ek)en. Jelen előadás a munkacsoportunk által az IL-2, IL-9 és IL-15 receptorok sejt felszíni eloszlásának és kölcsönhatásainak humán T sejteken történő feltérképezésére irányuló, főként különféle biofizikai módszerekkel (FRET, CLSM, FCS stb.) végzett kísérletek eredményeit foglalja össze.



*Jenei Attila, Rente Tünde, Fábíán Ákos, Szöllősi János, Mátyus László
Debreceni Egyetem Orvos-és , Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
(4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.)*

A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata segítségünkre lehet a sejtek magasabb szerveződési szintű molekuláris komplexeinek, azok struktúra-függő funkciójának, és ezen keresztül a jelátviteli folyamatok szabályozásának megértésében. A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) alapú módszerek kiváló lehetőséget nyújtanak a membránfehérjék asszociációinak és konformációjának közvetlen, molekuláris szintű vizsgálatára a sejtek felszínén és a sejteken belül. A módszert számos mérőberendezésre adaptálták. Az energiatranszfer hatékonyságra, a fluorofórokat jellemző fizikai paraméterek (intenzitás, élettartam, stb.) megváltozásából következtethetünk, melyek kapcsolatban vannak a molekulák távolságviszonyaival.

A módszer alkalmas molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára, de a molekulák pontos távolságának meghatározása bizonytalan, mert a klasszikus Förster-hatékonyság és a távolság közötti kapcsolat csak az egy-egy donor-akceptor arány esetén érvényes. Ez a feltétel nem teljesülhet, ha a sejtfelszíni molekulák különböző számú fluoreszcens donor és akceptor molekulákkal konjugált antitestekkel vannak megjelölve. Munkánk célja volt, hogy meghatározzuk a rezonancia energiatranszfer hatékonyság függését az antitestek jelölési arányától. Méréseinkhez egy olyan modellrendszert választottunk, mely alkalmas a FRET mérések kivitelezésére állandó donor-akceptor távolságok mellett ahol az egyetlen változó paraméter a fluoreszcens festékkel konjugált antitestek jelölési aránya.



A plazmamembrán mikroheterogén szerveződésének vizsgálata ultraszenzitív fluoreszcencia mikroszkópiával: a „magashőmérséklet-jel” képzésének lehetőségei

*Török Zsolt, Gombos Imre, Horváth Ibolya, Balogh Gábor, Vigh László
MTA, Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet, Molekuláris
Stresszbiológiai Csoport*

Sejtek hőstresszre adott válaszában számos részlete ismert de teljes mechanizmusa különös tekintettel a stressz érzékelésre ma még tisztázatlan. A széles körben elfogadott fehérjedensűrítési modellen túl korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a membránok specifikus perturbációját előidéző képes kezelések módosítják a sejtek stresszválaszában küszöbhőmérsékletét. Az enyhébb hőstressz hatására is bekövetkező stresszválasz indukcióját a fehérjék elhanyagolható szerkezeti változásai helyett a membránokhoz aszociált jelátviteli folyamatok sérülésével ill. aktivációjával magyarázhatjuk. Kísérleteinkben a membrán topológiájában és dinamikai szerkezetében hőstressz hatására bekövetkező perturbációk azonosítását tűztük ki célul. A membránok mikroheterogén struktúráját feloldani képes ultraérzékeny nagyfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia vizsgálatokkal kimutattuk a membrán kettősrétegben „úszó” lipid-fehérje jelképző „tutajok” méretének csökkenését (olvadását), valamint feltérképeztük a „túlélő”, nagy valószínűség szerint a stresszválasz fenntartásában szerepet játszó tutajok dinamikai sajátosságait. Nagyszámú sejt membrán-szerkezeti vizsgálatának és ugyanezen sejtek stresszválaszában összehasonlítása rávilágított az egyedi sejtválasz sokszínűségére és a folyamat sejt szintű követésének szükségességére. Molekuláris biológiai, biokémiai, analitikai módszerek és a lipid-fehérje membrán dinamikus szerkezetének módosulását eredményező különböző molekuláris kölcsönhatások követésére alkalmas ultraszenzitív sejtbiológiai megközelítések együttes alkalmazása olyan új gyógyszer molekulák szűrésére ad lehetőséget melyek nem egy szokásos farmakológiai értelemben vett receptoron keresztül fejtik ki hatásukat, hanem nagy valószínűséggel specifikus lipid kölcsönhatásaik révén („lipidreceptoron”) módosítják a membránok finomszerveződését ill. a fehérje-lipid kölcsönhatásokat és ezáltal bizonyos gének (mindenekelőtt a hő sokk fehérjék génjeinek) expresszióját.

Tóth Szilvia Zita, Jos T. Puthur, Nagy Valéria és Garab Győző

A fotoszintézis során a növények, zöldalgák, fotoszintetizáló baktériumok fényenergia felhasználásával szerves anyagokat állítanak elő. A szén-dioxid asszimilációjához a vizet használják fel elektrondonorként, és a víz oxidációja során oxigén szabadul fel. A vízbontó komplex a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc egyik legsérülékenyebb komponense és különösen hőstresszre érzékeny. Intakt leveleken végzett vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a vízbontó komplex inaktivációja esetén a víz helyett aszkorbát szolgál elektrondonorként (Tóth et al. 2007, *Biochim Biophys Acta* 1767: 295-305, Tóth et al. 2009, *Plant Physiol* 149: 1568-1578), ugyanis a második fotokémiai rendszerhez történő elektronátadás sebessége ($t_{1/2}$) a levelek aszkorbát tartalmától függ: vad típusú *Arabidopsis thaliana* növényben a $t_{1/2}$ kb. 25 ms, míg aszkorbát-deficiens mutánsokban kb. 55 ms és ez jelentősen gyorsítható aszkorbát oldatban történő inkubálással. Azt is kimutattuk, hogy ez a típusú alternatív elektrontranszport általánosan előfordul a növényvilágban és szerepet játszhat a magas fény és UV sugárzás okozta fotoinhibíció kivédésében. Vizsgáljuk a biotechnológiai hasznosíthatóságot is, különös tekintettel a zöldalgák hidrogén-termelésére.



Egy skorpióméregből származó peptid ioncsatorna-szelektivitásának javítása pontmutációk segítségével

Varga Zoltán¹, Papp Ferenc², Bartók Ádám¹, Leon Dinshaw¹, Panyi György
Debreceni Egyetem, ¹Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, ²MTA-DE
Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet,
Molekuláris Medicina Kutató Központ

A T limfociták aktivációjában kulcsszerepet játszanak a feszültségfüggő Kv1.3 K⁺ csatornák a negatív membránpotenciál fenntartásával. A humán T sejtek nagy számban fejezik ki e csatornát, melyet specifikusan gátolva a sejtek proliferációja in vitro és in vivo is gátolható, így lehetővé válik az immunsejtek működésének farmakológiai manipulálása. Ezáltal a szervezetben immun-suppresszió érhető el, amely nagy jelentőséggel bírhat bizonyos autoimmun betegségek terápiája esetén.

Az általunk korábban azonosított, az *Anuroctonus phaiodactylus* skorpió méregéből izolált 35 aminosavból álló peptid, az anuroctoxin nagy affinitással gátolja a Kv1.3 csatornákat, míg a Kv1.2 csatornákat ugyan kisebb affinitással, de szintén gátolja. A Kv1.2 számos ideg- és izomsejt típusban megtalálható, ezért ez a hatás nem kedvező a toxin potenciális klinikai felhasználásának szempontjából.

Munkánk során szolid-fázisú kémiai szintézissel előállítottuk a vad-típusú anuroctoxint, valamint ismert hatású toxinok szekvenciájának összehasonlítása alapján pontmutációkat hoztunk létre, melyekkel a toxin Kv1.3 csatornák iránti affinitásának javítását kívántuk elérni a Kv1.2 csatornával szemben. Sikeresen előállítottunk több mutánst, melyek közül néhány szelektivitása jelentősen javult, bár ez kis mértékű affinitás-csökkenéssel járt. Ezután újabb toxinok előállítását tervezzük, melyek mind affinitásban, mind szelektivitásban felülmúlják a natív toxint, és a potenciális terápiás felhasználás lehetőségét kínálják.



Virág Eszter¹, Gazdag Zoltán¹, Belágyi József², Kardos Roland², Nyitrai Miklós², Kunsági-Máté Sándor³ és Pesti Miklós¹

¹Pécsi Tudományegyetem TTK, BI, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

²Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biofizikai Intézet

³Pécsi Tudományegyetem TTK, KI, Általános és Fizikai Kémiai Tanszék

A primycin antibiotikum hatásmechanizmusának vizsgálatához jól jellemzett *Candida albicans* 33erg+ vad típusú és e törzsből előállított ergoszterin bioszintézisben mutáns, erg-2 törzseit használtuk. Meghatároztuk a törzsek minimális gátló koncentrációját (MGK) primycinnel szemben, amely az 33erg+ törzs esetében 256 µg/ml, a mutáns erg-2 esetében 128 µg/ml volt. Mivel a korábbi eredményekből tudjuk, hogy a két törzs plazmamembránja eltérő összetételű, és a primycin érzékenysége is különböző a törzseknek, ezért feltételeztük, hogy az antibiotikum plazma membrán támadásponthoz.

Meghatároztuk a plazma membrán fázistranzíciós hőmérsékletét EPR segítségével, amely a kezeletlen sejtek esetében 10 °C és 12 °C, míg kezelt sejteknél 14 °C és 16 °C-nak adódott a szülői illetve a mutáns törzseknél. A primycin kezelés hatására tehát rigidebb lett mindkét törzs plazmamembránja. Steady-state fluorimetriás mérések során mértük az anizotrópia hőmérséklet függését primycinnel kezelt illetve kezeletlen mintákon. A kapott adatok azt mutatták, hogy kezelés hatására a mutáns törzs plazmamembránja rigidebb lett a szülői törzshöz képest.

Meghatároztuk, majd modelleztük a primycin és olajsav - mint egyik fő membránalkotó molekula - közötti kölcsönhatást steady-state fluorimetriás mérésekkel. A primycin - olajsav kölcsönhatásban 1:1 sztöchiometriai arányt számítottunk ki. Az így kialakult komplexet 2 féle hidrogénkötés stabilizálta, melyek az interakció során jelen voltak egyenként és együttesen is. A külön-külön kialakuló H kötések esetében a komplex sokkal nagyobb flexibilitással rendelkezett, mint amikor a kettős H kötés volt jelen. A 2 féle kötés egyidejű kialakulása tehát az olajsav mozgását gátolta.



A nagy teljesítményű szűrés lehetőségei és problémái

Csúcs Gábor

Light Microscopy Centre, ETH Zürich, Zürich, Svájc

A mai modern sejtbiológiai/sejtanalitikai alap kutatás egyik legdinamikusabban fejlődő területe a nagy teljesítményű (gátló RNS alapú) szűrés (= high throughput screening). Egészen a legutóbbi időkig a szükséges műszaki háttér komplexitása miatt a terület elsősorban a gyógyszergyárak számára volt elérhető de a legutóbbi idők fejlesztéseinek köszönhetően a technológia bevonult az egyetemi alap kutatásba is. Előadásomban ismertetem a technológia alapjait, lehetőségeit de kitérek a különböző problémákra/nehézségekre is kezdve a biológián, az informatikán ill. a képfeldolgozáson át a az interpretációs nehézségekig. Külön hangsúlyt kapnak prezentációmban a nagy információtartalmú analízissel (= high content analysis) kapcsolatos kérdések. Konkrét biológia példákon (vírus/baktérium fertőzés, sejtosztódás ill. riboszóma biogenezis) mutatom meg, hogy a gyakorlatban hogyan is alkalmazható ez az új módszer.



Kardos József

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék

A fehérjék kóros aggregációjával és amiloid lerakódásával járó betegségek, mint pl. az Alzheimer-kór, társadalmilag egyre súlyosabb problémát okoznak. A hatékony terápia kidolgozásához elengedhetetlen az amiloidképződés mechanizmusának és a szálak stabilitását meghatározó kölcsönhatásoknak pontosabb ismerete. Az amiloidképződés nukleáció-függő folyamat, amely a megemelkedett fehérjekoncentráción kívül a környezeti paramétereiktől és más kölcsönható molekulák jelenlététől is függ. Modellfehérjéül a β_2 -mikroglobulint (β_2m) választottuk, amely a vesedialízishez kötődő amiloidózis kialakulásáért felelős. Munkánk során komplex biofizikai és biokémiai módszerekkel tanulmányoztuk a β_2m polimerizációját. Az aggregátumok morfológiáját és méretét elektron- és atomerő mikroszkópia segítségével vizsgáltuk. H/D izotópkicserélődés és IR- spektroszkópiai mérésekkel az aggregátumok másodlagos szerkezetére, illetve a hidrogén-hidak által kialakított rigid amiloid mag kiterjedésére következtettünk. A szálak növekedésének kinetikáját thioflavin-T fluoreszcencia segítségével követtük. Vizsgáltuk a szálak törésének hatását a polimerizáció folyamatára, amelynek in vivo szerepe lehet a betegség kifejlődésében. Az amiloidképződés termodinamikai paramétereit direkt módon, izotermális titrációs kalorimetriával határoztuk meg. Vizsgáltuk a különféle adalékanyagok amiloidképződésre gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a lizofoszfátidsav (LPA) destabilizálja a natív β_2m molekulát, amely így részlegesen kitekeredett, amiloidogén állapotba kerül. Limitált proteolízis kísérletekkel vizsgáltuk az átmeneti állapot szerkezetét, felderítve a molekula fellazult, flexibilis részeit. A hasítóhelyeket tömegspektroszkópiával azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy a molekula N-terminális régiója, amelyhez in silico dokkolási kísérleteink szerint az LPA is kötődni tud, fellazul. Eredményeink közelebb vihetnek az amiloidképződés mechanizmusának megértéséhez és ezzel új terápiás lehetőségek kidolgozásához.



Egy biológiai mintakészítés utóélete

Váró György

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet (6726 Szeged, Temesvári krt. 62.)

Egy 25 éve kidolgozott mintakészítés, különböző, nem mindig biológiai területen történő alkalmazását mutatom be.

A 80-as években szárított, orientált bakteriorodopszin mintákat készítettünk, amelyek segítségével sikeresen tanulmányoztuk a víz szerepét a fehérje működésében. A minták fénygerjesztés hatására több voltos válaszjelet adtak és extrém körülmények között is hosszú ideig működésképesek maradtak.

Ezen tulajdonságok a mintát a biológia területén nem szokványosak alkalmazásokra tették képessé:

- Ultragyors mérések: optikai egyenirányítás a fehérje terahertzes sugárzásának mérése
- Integrált áramkörökben: optikai érzékelők készítése
- A fehérje mechanikai mozgásának atomerőmikroszkópos érzékelése

Ezen alkalmazások nagyrésze a minták biotechnológiai adottságait használja ki és bizonyítja a biotechnológiai anyagok lehetőségeit.



Bugyi Beáta, Marie-France Carlier

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales; CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, Bât. 34, 91198 Gif-sur-Yvette, Franciaország

A sejtmozgás során meghatározó szerepet játszanak a protrúziós és adheziós struktúrákat felépítő aktin filamentum rendszerek. A sejtmembrán közeli elágazó aktin hálózatot a gyors turnovervel rendelkező lamellipodium alkotja, míg távolabb a lassabb turnovervel jellemezhető lamella található. Eddigi in vivo megfigyelések szerint a tropomiozin eltérő módon befolyásolja a két aktin hálózat sejtmozgásban betöltött szerepét, azonban a háttérben álló molekuláris mechanizmusok nem teljesen tisztázottak. Munkánk során a tropomiozin (vázizom izoforma) hatásait vizsgáltuk a protrúziós aktin struktúrák kialakulására és tulajdonságaira. Ennek érdekében N-WASP-al bevont gyöngyökön alapuló biomimetikus motilitás esszét alkalmaztunk. Vizsgálataink szerint a tropomiozin kompetitív módon gátolja az N-WASP-Arp2/3 komplex által létrehozott elágazások kialakítását, amelynek következtében módosul a gyöngyök mozgása. Ez a hatás függött az N-WASP molekulák gyöngyfelszíni távolságától. Megmutattuk továbbá, hogy a tropomiozin és az ADF antagonisztikus módon szabályozzák az elágazó aktin hálózat kiterjedését, valamint azt is, hogy a tropomiozinnak az aktin hálózathoz való kötődését az elágazások disszociációja szabályozza. Eredményeink alapján a tropomiozin hozzáadása az N-WASP motilitás esszéhez elegendőnek bizonyul az in vivo megfigyelt, két eltérő szerkezeti és dinamikai sajátságokkal rendelkező aktin filamentum rendszer kialakításához.



Hogyan sétál a kinezin?

*Czövek András, Szöllősi Gergely, Derényi Imre
ELTE, Biológiai Fizika Tanszék, Budapest*

A kinezin motorfehérje mikrotubulus mentén tud lépkedni és a végére kapcsolt teherre több pN erőt kifejteni. Ennek a mozgásnak a részletes mechanizmusa nem ismert. Megválaszolóásra váró kérdés többek között a kinezin neck linkerének pontos szerepe, a neck linker dokkolással járó szabadenergia-változás, az egy lépés alatt elhidrolizált ATP-k száma és egy átlagos trajektória a kinezin állapotterében.

A kinezin eddigi kinetikai modelljei túl egyszerű kinetikai hálózatot használtak és/vagy nem voltak termodinamikailag konzisztensek a kinetikai állandók megadásakor. Az utóbbi években elég adat halmozódott fel ahhoz, hogy lehetségessé váljon egy olyan modell elkészítése, aminek a bemenő paraméterei kellően megalapozottak és ami az összes, monomer állapotból konstruált dimer állapotot tartalmazza. Célunk egy olyan termodinamikailag konzisztens modell készítése volt, ami megfelel ezeknek a kritériumoknak.

Szimulációnk segítségével reprodukálni tudtuk a kinezinnel kapcsolatos számos görbét, többek között mutáns kinezinét is. Eredményeink valamivel több, mint 1 ATP/lépést mutatnak és megkérdőjelezzik a neck linker dokkolásra mért kis szabadenergia-változást. A modell egyik fő erényének tartjuk, hogy egy olyan keretrendszert ad, ami más motorfehérjék termodinamikailag helyes modellezésénél is követendő.



Kelemen Lóránd¹, Badri Aekbote Lakshman Rao¹, Ormos Pál¹, Jesper Glückstad²

¹*MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet*

²*DTU Fotonik, Technical University of Denmark, DK-4000 Roskilde, Denmark*

Mikrogyöngyök alkalmazása optikai csipeszben sejtek vagy biológiai makromolekulák vizsgálatához, manipulálásához mára már bevett gyakorlattá vált. Funkcionalizálásuk sok esetben az egyetlen lehetőség arra, hogy bármilyen kölcsönhatást elérjünk köztük és a vizsgált objektum között. A mikrogyöngyök használatakor a fókuszált lézernyalábbal csapdázott és a biológiai objektummal kölcsönható eszköz ugyanaz, ami az alkalmazást esetenként megnehezíti.

A kétfotonos polimerizációval, mikrométer alatti feloldással készíthető mikroszerkezetek új lehetőségeket tárnak fel az élő szervezetek optikai manipulációjában. Alkalmos tervezéssel elérhető, hogy az optikai csapdázás és a manipuláció egymástól térben elváljon. A mikroeszközök felületének funkcionálizálása megfelelő kémiai eljárások révén egyszerűen elvégezhető.

Laboratóriumunk eredményei között megtalálhatók kétfotonos polimerizációval készített, optikai csipeszben használható, sejtek manipulálására alkalmassá tehető funkcionalizált mikropróbák. Bemutatunk továbbá olyan mikroeszközöket, melyekkel demonstráltuk optikai csipesz rendszerben a 3D mikro-összeszerelés lehetőségét.



Az aminosav oldalláncok rotációs frekvenciáinak jelentősége: funkcionális THz spektroszkópia lehetősége

Lőrincz István, Málnási-Csizmadia András

*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai tanszék (1117, Budapest,
Pázmány sétány 1/c.)*

Ha az aminosav oldalláncok mozgását specifikusan tudnánk befolyásolni, akkor az enzimek működése kísérletesen vizsgálható lenne az egyes régiók specifikus perturbációjával. Ennek a lehetőségnek a feltárása érdekében különböző enzimek aminosav oldalláncainak rotációs frekvenciáit vizsgáltuk számítógépes molekuláris dinamikai módszerekkel. Azt tapasztaltuk, hogy az oldalláncok mozgásai THz tartományban jól karakterizált, időben stabil, az egyes aminosavakra jellemző spektrumokkal jellemezhetők. A spektrumok az aminosavak fajtái valamint a másodlagos szerkezeti elemekben való előfordulások szerint csoportosíthatóak. Mindazonáltal az enzimekben található olyan aminosavak is, amelyek spektruma eltér a csoportjára jellemzőtől. Ugyancsak megfigyeltük, hogy egy enzim különböző konformációs állapotokban csak bizonyos aminosavak spektruma változik meg. Független biokémiai kísérletekből arra következtetünk, hogy a csoportjától eltérő, valamint a konformációs átmenetekre érzékeny spektrumú aminosavak többsége funkcionális szempontból fontos. A fenti megfigyelések megnyithatják a lehetőségét egy funkcionális, THz spektroszkópiai módszer kidolgozására.

Egy ritkán használt termodinamikai paraméter, a nyomás. Mit tudhatunk meg az összenyomott fehérjék vizsgálatából?

Smeller László

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet Budapest

Biológiai rendszerekben a fehérjékhez köthető folyamatok általában állandó hőmérsékleten és nyomáson zajlanak le. Ez azonban nem zárja ki azt, hogy a fehérjék tulajdonságairól többet tudjunk meg azáltal, hogy a szervezetben uralkodótól eltérő fizikai paraméterek mellett vizsgáljuk azokat. A fehérjék tulajdonságainak hőmérséklettől függésére irányuló mérések a modern biofizika világában mindennaposak. Ehhez képest indokolatlanul kevés munka vizsgálja a másik – tulajdonképpen a hőmérséklettel egyenrangú – termodinamikai paraméternek, a nyomásnak a biológiai rendszerekre kifejtett hatását. Ezen vizsgálatok hiányának a technikai nehézségek mellett a fiziológiástól nagymértékben eltérő körülményektől való idegenkedés lehet az oka.

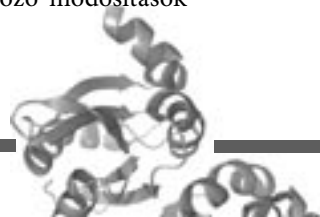
Bár a legelső olyan publikáció, amely a nagy nyomásnak a fehérjékre gyakorolt hatását írta le, még a múlt század elején született, a téma a fehérjékről rendelkezésre álló ismeretek hánya miatt hosszú időre feledésbe merült, és csak a modern szerkezetvizsgáló fizikai és biofizikai módszerek elterjedésével lendült fel.

Az előadás során a nagy nyomás (100 MPa – 1 GPa) mint perturbáló paraméter felhasználásával fehérjéken végzett kísérleteinkről (infravörös spektroszkópiái ill. kisebb részben fluoreszcencia spektroszkópiái vizsgálatokról) számolok be, felvillantva, hogy a nyomás alatt végzett mérések milyen új információkkal szolgálhatnak.

A nyomás hatásának megértésénél az általános Le Chatelier-Braun elvből indulhatunk ki. E szerint a nyomás hatására a rendszer csökkenteni igyekszik térfogatát. Ezért általánosan elmondhatjuk, hogy a térfogattal kapcsolatos információkat, térfogati paramétereket lehet meghatározni a nyomás segítségével. Ilyenek a térfogatváltozás, vagy térfogatkülönbség (pl. két konformáció között), az aktivációs térfogat, illetve a kompresszibilitás.

Az fehérjék egyik meglepő tulajdonsága, hogy nagy nyomáson elvesztik szerkezetüket, kitekeredett (denaturált) állapotba jutnak. Bár a kitekeredett fehérjét intuitíve natív szerkezetünél nagyobb térfogatúnak gondolnánk, a fehérje belsejében rejtőző üregek és a fehérjét körülvevő hidrátburok együttesen adják a megoldás kulcsát.

Infravörös spektroszkópiával számos fehérje nyomásstabilitását mértük meg. A tormaperoxidáz esetén vizsgáltuk, hogy a különböző módosítások



(szubsztrát kötés, a hem helyettesítése, ill. hiánya, Ca^{2+} mentesítés, redukált diszulfid hidak) hogyan befolyásolják a szerkezet stabilitását.

A nyomás és a hőmérséklet síkon végzett mérésekkel megkaptuk a fehérje fázisdiagramját. Ezen elliptikus fázisdiagramot sikerült kiterjeszteni úgy, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is figyelembe vegye. Így a manapság sokat vizsgált intermedier, fehérje-konformációkat, valamint aggregációs állapotokat is elhelyeztük a fázisdiagramon.

Különösen érdekes a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata, ugyanis az intermolekuláris kölcsönhatások nagyon érzékenyek a nyomásra. Szubdenaturáló nyomással egyes fehérjeaggregátumok disszociálhatóak, de ennél is érdekesebb az, hogy a hirtelen nyomáscsökkenéssel indukálható az intermedier állapotba hozott fehérjék aggregációja, és ezeken a rendszereken az aggregáció kinetikája jól vizsgálható. Hasonló módon a több, vagy sok alegységből fehérjék (pl. hemoglobin, kis hősokk fehérjék) monomerjei is disszociálhatók nyomással, ami a közük levő kölcsönhatás erősségére, illetve az oligomer szerkezetnek a funkcióban betöltött szerepére ad információt.

A denaturációs nyomásnál kisebb nyomás hatására a fehérje elasztikus deformációt szenved. Ennek leírására szolgál a kompresszibilitás, amely azonban a fluktuáció-disszipáció tétel alapján nem csak statikus paraméter, hanem a fehérje dinamikájáról is információt szolgáltat. Speciális fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekkel mértük meg a tormaperoxidáz kompresszibilitását, és adtunk strukturális modellt a szerkezet heterogén dinamikájára.

A fehérjék nyomás indukálta kitekeredése ill. visszatekeredése során a kinetika nyomás függéséből a denaturáció során bekövetkező térfogatváltozáson kívül az aktivációs térfogatok is meghatározhatók. Ezt egy két doménből álló fehérje a PGK példáján mutatom be.

Természetesen a külső nyomás az enzimfehérjék működését és az enzimkinetikát is befolyásolja, abban a nyomástartományban ahol a fehérje még nem denaturálódik. A nagy nyomásnak a kinetikára gyakorolt hatásából olyan, az enzimfunkcióra jellemző termodinamikai paraméterek számíthatók ki, mint az aktivált állapothoz kapcsolódó térfogatváltozás, ill. a biokémiai folyamathoz tartozó térfogatváltozás. A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim által katalizált folyamaton a protoklorofillid fény hatására bekövetkező klorofilliddé alakulásán keresztül mutatom be ezt a lehetőséget. Ez a példa is nagyon jól mutatja, hogy a fiziológiás körülményektől nagyon eltérő környezetben végzett mérések is adhatnak olyan információt, amely a fiziológiás körülmények között lejároló reakciók fontos tulajdonságait tárja fel.



Barkó Szilvia¹, Mihály József² és Nyitrai Miklós¹

¹ Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet (Pécs, Szigeti út 12.)

² Szegedi Biológiai Központ (Szeged, Temesvári krt. 62.)

Kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster* DAAM forminjának FH₂ és FH₁FH₂ fragmentumait karakterizáltuk aktinnal és profilinnal való kölcsönhatásuk szempontjából.

Pirén fluoreszcencia mérésekkel leírtuk az aktin filamentumok polimerizációjának és depolimerizációjának kinetikáját különböző koncentrációjú DAAM FH₂ és FH₁FH₂ fragmentumok jelenlétében, és hatásukat az aktin kritikus koncentrációjára.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a DAAM fragmentumok megnövelik az aktin filamentumok polimerizációs sebességét, és hatásuk van az aktin kritikus koncentrációjára is.

Méréseket végeztünk az aktin-kötő profilin és a DAAM FH₁ doménjének kölcsönhatására vonatkozóan is. Adataink szerint a kooperáció a formin és a profilin között az aktin filamentumok polimerizációjának további gyorsításához vezet.

A DAAM fragmentumok aktinhoz való kötődésének affinitását koszedimentációs módszerrel vizsgáltuk. Eredményeink alapján a DAAM fragmentumok a filamentum végéhez és oldalához is képesek kötni.

Fluoreszcencia mikroszkópiás mérésekkel leírtuk a DAAM-nak az aktin filamentumok szupramolekuláris szerkezetére gyakorolt hatását. Eszerint a DAAM-FH₂ és a DAAM-FH₁FH₂ keresztkötéseket hoz létre az egyes aktin filamentumok között.



Aktonkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságára

Kardos Roland¹, Tóth Mónika¹, Futó Kinga¹, Elisa Nevalainen², Pekka Lappalainen², Nyitrai Miklós¹ és Hild Gábor¹

¹Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet (7624 Pécs, Szigeti út 12.)

²Helsinki Egyetem, Biotechnológiai Intézet (00014 Helsinki, Finnország)

Az eukariota sejtek mikrofilamentális rendszerének fő alkotó fehérjéje az aktin, mely globuláris (monomer) és filamentális (polimer) formában egyaránt jelen van a citoplazmában. Az aktin monomerek filamentumba való beépülésének és leválásának térbeli és időbeli mintázatát a mikrofilamentális rendszerhez asszociált fehérjék (aktinkötő fehérjék) határozzák meg.

A kofilin és a profilin kis molekulásúlyú aktinkötő fehérjék; az előbbi a depolimerizáció, az utóbbi a polimerizáció irányába módosítja a „treadmilling” folyamatát. Az aktin monomerhez kötődve megváltoztatják a nukleotid kicserélődés kinetikáját; a kofilin lassítja, a profilin gyorsítja a folyamatot.

Fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek alkalmazásával kerestük a választ arra a kérdésre, hogy az aktin monomer intramolekuláris flexibilitása hogyan módosul a két vizsgált fehérje hatására, illetve milyen biológiai funkció rendelhető a változáshoz. Az aktin intramolekuláris flexibilitását a fluoreszcensen jelölt Cys³⁷⁴ és a Lys⁶¹ között monitoroztuk. Mind két fehérje a jelölt Cys³⁷⁴-hez közel köt az aktinon, így fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel meghatároztuk a két fehérje affinitását a jelölt monomerhez. Hőmérsékletfüggő FRET mérések kimutatták, hogy mindkét fehérje csökkenti a két aminosav közti protein mátrix flexibilitását. A kapott stabilizációs hatást az elvégzett kalorimetriás mérések is alátámasztották.



Asztalos Emese és Maróti Péter
SZTE Biofizikai Tanszék

A baktérium (*Rhodobacter sphaeroides*) citoplazmájában a sejtmembránból betűrövidített struktúrában vannak a fotoszintetikus egységek, amelyek egy reakciócentrum fehérjéből és kétféle fénybegyűjtő antennából állnak. Azt szeretnénk kideríteni, hogyan épülnek be ezek a rendezett fotoszintetikus egységek a sejtciklus alatt a membránba. Két lehetőséggel számolhatunk: 1) az egységek előre gyártódnak és készen szállítódnak a felhasználás helyére, vagy 2) a sejt fokozatosan építi fel az egységeket a membránban, először a reakciócentrumot minimális antennával veszi körbe, majd bővíti, és átrendezi (szorosabbá fűzi). Ennek eldöntésére a tenyészetet szinkronizáltuk, mert ezekben a sejtek egyszerre osztódnak, így azt is láthatjuk, hogy a fotoszintetikus egységek összeszerelése illetve membránba való beépítése függ-e a sejt-ciklustól. A fotoszintetikus egységek szerveződését a fluoreszcencia indukció mérésével követjük nyomon, és azt vizsgáljuk, hogy a kapott paraméterek függenek-e a sejt-ciklustól. Az eddigi méréseink szerint a fotokémiai sebesség mutat sejt-ciklussal összefüggő változást, amiből arra következtetünk, hogy a fotoszintetikus egységek felépítése nem állandó, hanem a sejtek növekedése és osztódása közben változik. Megfigyeléseink alapján a második lehetőséget tartjuk valószínűbbnek a fotoszintetikus egységeknek a membránba való ágyazódására.



Szöllösi Gergely János és Derényi Imre

ELTE, Biológiai Fizika Tsz.

A genetikai robusztusság eredete nyitott kérdés: nem egyértelmű, hogy az közvetlenül alakul-e ki természetes szelekció folytán, vagy fenotípusos tulajdonságokra való szelekció korrelált melléktermé-ke. Különböző eukarióta fajokból származó mikroRNS (miRNS) szekvenciákat vizsgálva Borenstein és Ruppin [1] megmutatták, hogy a miRNS prekursor szekvenciák szignifikánsan megemelkedett mutációs robusztusságot mutatnak. Ezek az eredmények meglepőek, mivel elméleti eredmények azt mutatják, hogy a genetikai robusztusság közvetlen evolúciójához nagy effektív populációméretek szükségesek, amelyek nem tapasztalhatóak többsejtű eukarióták között.

Az [2] publikációnkban megmutattuk, hogy: (i) a Borenstein és Ruppin által alkalmazott mintavételezési eljárás a robusztusság szisztematikus túlbecsüléséhez vezet; (ii) a mikroRNS szekvenciák körében erős korreláció van jelen a genetikai és a környezeti robusztusság között. A munka során a miR-Base internetes adatbázisból miRNS prekursor-szekvenciákat gyűjtöttünk és azonos szerkezettel rendelkező szekvenciák véletlen mintáját gyártottuk le. A véletlen minta és a természetben megtalálható prekursor-szekvenciák termodinamikai sokaságát mintavételeztük a robusztusságra történő adaptáció nyomait keresve.

A környezeti robusztusság új mértékét vezettük be, amely a másodlagos szerkezetek termodinamikai sokaságán alapul. Ezt felhasználva demonstráltuk, hogy az RNS-folding biofizikája erős korrelációt indukál a mutációs és a környezeti robusztusság között. A többsejtű eukariótákra jellemző, kis effektív populációméretek figyelembe véve ez erős bizonyíték arra, hogy a mikroRNS-ek körében tapasztalható genetikai robusztusság a termodinamikai robusztusságra való szelekció mellékterméke.

Az öröklődő (mutációs) és nem öröklődő (termodinamikai) perturbációk közötti korreláció lehetséges, hogy kiterjed az RNS másodlagos szerkezettől különböző genotípus-fenotípus leképezésekre is, mint pl. fehérje folding. Folyamatban lévő munkánkban arra utaló bizonyítékot találtunk, hogy a mutációk hatása egy effektív hőmérséklettel jellemezhető. Ez az eredmény a mutációs és környezeti perturbációkra adott válaszok közötti szoros összefüggésre utal.



*Maróti Péter^a, Asztalos Emese^a és Laczkó Gábor^a
SZTE Biofizikai Tanszék^a és Kísérleti Fizikai Tanszék^b*

Az élet építőköveinek tekintett fehérjéknek kb. harmada redox-fehérje, azaz megfelelő körülmények között elektronok felvételére és leadására képesek. Ezek között vannak olyan fehérjék is, amelyekben belül nem csupán egy, hanem több redox-centrum is van, és közöttük elektron átadás-átvétel, más szóval belső elektrontranszfer játszódhat le. Mivel ennek sebessége és hatékonysága élettanilag fontos folyamatokat irányíthat, ezért működésük részleteinek megismerése alapvetés. Az előadásban egy redox-fehérjét, a fotoszintetizáló baktériumok reakciócentrumát választjuk ki, annak is az egyik legfontosabb redox-centrumát, a primér kinont. Itt dől el lényegében, hogy az elnyelt fényenergia tud-e fotokémiai szempontból hasznosulni. ill. ha igen, akkor milyen mértékben. Ebben elsősorban az elektrontranszfer sebessége és a redox centrumok közötti szabadenergia-esés játszik meghatározó szerepet. Ezek hatását tanulmányozzuk (egy-egy kulcspozícióban levő aminosav kicserélésével kapott) mutáns és a természetes ubikinont alacsony potenciálú kinonokkal (pl. antrakinon-származékokkal) helyettesített reakciócentrumokon. A bakterioklorofill késleltetett fluoreszcenciájának mérése különösen alkalmas módszer, mert közvetlenül adja meg a fotoszintetikus energia-hasznosulással szemben veszteségként jelentkező visszreakciók kinetikai és energetikai jellemzőit.

- [1] Borenstein, E, Ruppin, E (2006)
Direct evolution of genetic robustness in microrna.
Proc Natl Acad Sci 103:6593–6598.
- [2] Szöllősi, GJ, Derényi, I (2009)
Congruent evolution of genetic and environmental robustness in microrna.
Mol Biol Evol 26:867–874.



Klorofill prekursorok natív szerkezete, spektrális tulajdonságai és élettani szerepe

*Böddi Béla, Solymosi Katalin, Kósa Annamária, Vitányi Beáta, Hideg Éva**

*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növény szerkezettani Tanszék; *MTA, SzBK, Növénybiológiai Intézet*

Természetes körülmények között fejlődő növények egyes szövetei fénytől elzártan alakulnak ki, ezért a klorofill bioszintézis előanyagai halmozódnak fel. Legjelentősebb a protoklorofillid (Pklid), ami különböző molekula-komplexekbe épülhet be és eltérő spektrális tulajdonságokat mutat. Egyes szervekben a monomer állapot dominál; itt a pigment nem kromofór molekulához (a NADPH:Pklid oxidoreduktáz enzimhez (POR) vagy máshoz) kötődik. Más szervekben a POR-Pklid-NADPH hármas komplexei dimerekké és oligomerekké rendeződnek, ami jól modellezhető: a hármas komplexek glicerinszacharózos pufferben aggregáltathatók. A monomerek fény hatására csak kismértékben redukálódnak klorofilliddé, többségük foto-oxidációs folyamatokat szenzibilizál. A dimerek és oligomerek nagy hatékonysággal redukálódnak, de átalakulásuk kinetikája függ annak a membránnak a szerkezetétől, amelyben kötöttek. Ezeket a folyamatokat csíranövények talaj felszíne alatti szöveteiben, természetes fény-sötét perióduson fejlődött, rügypikkelyek által takart rügyek levélkezdeményeiben, virágbimbók belsejében, termésfal által leárnyékolts termésekben is kimutattuk. Ez aláhúzza a natív molekula-szerveződés jelentőségét a foto-oxidációs folyamatok megelőzésében és kivédésében.



*Gróf Pál, Belágyi József**

Biofizika és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem; Budapest,

**Biofizikai Intézet, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Pécs*

A biológiai makromolekulák ESR spektrumai, az ESR spektroszkópia terminológiája alapján három, különböző korrelációs idejű tartományba sorolhatók: i.) gyorsforgási tartomány; ii.) lassú forgási tartomány valamint iii.) igen lassú forgási tartomány. Az első tartományba esnek a kis molekulák és a makromolekulák gyors szegmensmozgásai; az erre jellemző korrelációs idő a ps-ns tartományban van. Az igen lassú forgási tartományba eső molekuláris mozgások spektroszkópiái megfigyelése ST-ESR technikát alkalmaz, s a spektrum alakja alapvetően eltér a másik két tartományban mértektől. A lassú forgási/mozgási tartomány a mintegy $5 \text{ ns} - 10^{-7} \text{ s}$ -ig terjed. Ebben a tartományban a spektrális anizotrópiák már nem átlagolódnak ki, így ebben a tartományban a korrelációs idők meghatározása Freed és mtsai. által korábban leírt módon, a spektrumszimulációkon alapuló nomogramok, illetve az azokat leíró megfelelő függvények segítségével lehetséges. A módszer alkalmazásának implicit hibája azonban abból fakad, hogy az elérhető nomogramok elsősorban izotróp Brown-mozgásra, meghatározott vonalszélességekre vonatkoznak. Korábbi munkáinkban aktin-filamentumok konvencionális ESR spektrumait vizsgálva megállapítottuk, hogy az aktin-filamentumok gél állapotban makroszkópicusan rendeződnek. A szokásosan használt spin-jelölő molekulák jó közelítéssel mereven kapcsolódnak az aktin filamentumhoz, térbeli mozgásuk mind a saját, mind az aktin-filamentumoké ebben az esetben nem írható le izotróp, Brown-rotációs-diffúzióval. Freed és mtsai korábbi munkáikban a lipidrendszerek ESR spektrumainak leírására kifejlesztették a „mikroszkóposan rendezett makroszkóposan rendezetlen” módszert, ami — többek között — képes figyelembe venni az anizotróp rotációs diffúziót, izotróp eloszlású makroszkópos rendezettségű rendszerekre, a $\sim \text{ns} - \text{ms}$ -os forgástartományra. Az ESR spektrumok szimulációjára vonatkozó Freed-féle NNLS-programot továbbfejlesztve lehetővé vált — általánosan használt Winodws-os kezelőfelülettel ellátva — a mikroszkópicusan és makroszkópicusan is rendezett rendszerek, makromolekulák ESR spektrumainak szimulációja. A poszteren néhány szimulált ESR spektrumot mutatunk be, tengelyszimmetrikus makroszkópos eloszlást és anizotróp rotációs diffúziót figyelembe véve.



A fehérjék jelenlétének hatása a DNS-porfirin kölcsönhatásra

Csík Gabriella¹, Egyeki Marianna¹, Herényi Levente¹, Majer Zsuzsa²,
Tóth Katalin³

¹Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest;

²Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémia Tanszék, Budapest;

³DKFZ, Biophysik der Makromoleküle, Heidelberg

A mezo(4-N-metilpiridil)porfirin (TMPyP) és nukleoprotein komplexek – T7 bakteriofág és HeLa nukleoszoma – illetve az azokból izolált DNS kölcsönhatását vizsgáltuk. A porfirin abszorpciós spektrumainak felbontásával és CD spektroszkópia felhasználásával mind a DNS-ben, mind a nucleoprotein komplexekben a porfirin két kötött formáját - interkalált és a külső kötött - azonosítottuk. Az egyes kötött formák mennyiségének és arányának elemzése rámutatott, hogy a fehérjék jelenléte mindkét NP komplexben csökkenti a nukleinsav hozzáférhetőségét, de a kötött formák aránya markánsan különbözik a két nukleoprotein komplex esetében. UV és CD melting felhasználásával kimutattuk, hogy a porfirin kötődése a nukleoszómában destabilizálja a DNS-fehérje kölcsönhatást, míg a T7 NP-ben ilyen hatás nem volt kimutatható. A porfirin által indukált fotokémiai reakciók csökkentették mindkét NP illetve az azokat alkotó nukleinsavak termikus stabilitását, de a nukleoszóma lényegesen érzékenyebb volt a kezeléssel szemben.



Anita Župčanová^{1,2,3}, Steinbach Gábor¹, Szabó Milán¹, Tomáš Fessler^{2,4}, František Vácha^{2,3,4}, Silviu Balaban⁵ és Garab Győző

¹ MTA, Szegedi Biológiai Központ, Szeged

² Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceske Budejovice, Czech Republic, E-mail: anitazupcanova@gmail.com

³ Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove Hradky, Czech Republic

⁴ University of South Bohemia, Faculty of Science, Czech Republic

⁵ Karlsruhe Institute of Technology, Forschungszentrum Karlsruhe, Institute for Nanotechnology, Karlsruhe, Germany

A napenergia hatékony átalakításában kiemelkedően fontos olyan molekuláris eszközök tervezése és kialakítása, melyek a foton energiáját alacsony fényintenzitás esetén is nagy határfokkal képesek elektromos energiává alakítani.

Fotoszintetikus szervezetekben a napfény energiáját nagyméretű makro-aggregátumokba szerveződő fénybegyűjtő antenna rendszerek 'csapdázzák' és továbbítják a fotokémiai reakciócentrumok felé. A zöldbaktériumok kloroszómái – amelyekben a bakterioklorofill molekulák néhány száz nm átmérőjű rendezett aggregátumokat alkotnak – a- leghatékonyabb ismert természetes fénybegyűjtő antenna rendszerek.

A 3,13-Zn-ketol porfirin pigmentek szerves oldószerekben nanorudakká, 5-10 µm hosszúságú és 1-2 µm szélességű struktúrákká szerveződnek. Ezek a „mesterséges kloroszómák” jól orientálhatóak >0.5T erősségű mágneses térben, és erősen polarizált fluoreszcencia emissziót bocsátanak ki; lineáris dikroizmusuk is magas. Differenciál-polarizációs lézersugárpásztázó mikroszkóp (DP-LSM) segítségével feltérképeztük a polarizált fluoreszcencia anizotrópia, fluoreszcencia detektált lineáris dikroizmus és a fluoreszcencia emisszió polarizációfokának – magas lokális értékeket mutató homogén – térbeli eloszlását.

A mesterséges kloroszómák – a natív rendszerekhez hasonló (sőt azt is felülmúló) - erős optikai és diamágneses anizotróp sajátságai kiemelkedően fontosak lehetnek a gerjesztési energiavándorlási folyamatokban; egyúttal lehetőséget teremtenek ezen egységek mikromanipulációjára.



A sötétben hajtattott tiszafa (*Taxus baccata*) klorofill bioszintézisének sajátosságai

Skríbanek Anna¹, Solymosi Katalin², Hideg Éva³, Böddi Béla²

¹*Nyugat-Magyarországi Egyetem, Növénytani Tanszék*

²*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Növény szerkezettani Tanszék*

³*Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet*

A klorofill bioszintézise zárwatermő növényekben fénytől függő folyamat, mivel ezekben a növényekben a reakcióút egyik lépését katalizáló NADPH: Protoklorofillid OxidoReduktáz (POR) enzim működéséhez fényt igényel. Az alacsonyabbrendű növényekben a fénytől függő enzim mellett egy másik, hasonló funkciójú, de teljesen más szerkezetű POR enzim is megtalálható. Kevésbé ismert, hogy a nyitwatermőkben hogyan szabályozódik a két, azonos funkciójú enzim együttes működése az egyedfejlődés során.

Kísérleteinkben 4-8 hétig sötétbe helyeztünk tiszafa ágakat, majd tanulmányoztuk a rügyekből sötétben kifejlődő fiatal hajtásokat. Spektroszkópiai módszerekkel meghatároztuk a különböző fejlettségű levelek (fiatal csúcsi, illetve idősebb levelek) valamint a szárok pigment-összetételét, a klorofill, illetve protoklorofillid pigmentek natív szerveződését, valamint klorofill fluoreszcencia imaging segítségével jellemeztük a minták fotokémiai aktivitását. A növényi szintestek szerkezetét elektron mikroszkópiával vizsgáltuk meg. Arra következtethetünk, hogy a két enzim működési aránya szerv-specifikus, a szárok kevesebb klorofillt képesek sötétben szintetizálni, mint a levelek.



Mártonfalvi Zsolt¹, Pasquale Bianco², Kellermayer Miklós S. Z.³

¹Pécsi Tudományegyetem ÁOK Biofizikai Intézet

²Department of Evolutionary Biology, University of Florence, Italy

³Semmelweis Egyetem ÁOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

A titin a fél szarkomeret áthidaló filamentáris fehérje, mely molekuláris rugóként, szarkomerikus templántként és feltehetően mechanoszenzorként funkcionál a harántcsíkolt izomban. A molekulát felépítő globuláris szerkezetű domének tandem ismétlődése miatt a titin kedvelt kísérleti modell az erővezérelt fehérjetekeredési vizsgálatokban. Mivel azonban a hagyományos mechanikai manipulációs kísérletekben az erő és a molekulahossz egyszerre változó paraméterek, a tekeredési mechanizmusok pontosabb megértése érdekében az egyik változót ideálisan konstans értéken kell tartani. Kísérleteinkben erővisszacsatolt lézercsipesz segítségével állandó erőnél vizsgáltuk a titinmolekula tekeredési folyamatait.

Állandó erővel (~100 pN) történő megnyújtás során a molekula kontúrhossza diszkrét lépésekben növekedett, ami az egyes globuláris domének sorozatos kitekeredését reprezentálja. Állandó erő (~2 pN) melletti relaxáció során a molekula rövidülése egy többfázisú, összetett erő választ mutatott, ami arra utal, hogy a kitekert polimerlánc nem tisztán entrópikus mechanizmusokon keresztül veszi fel alakját. A feltekeredett molekula újbóli megnyújtása során a domén kitekeredések ismét megfigyelhetők voltak.

Állandó terhelés melletti ciklusos erő-rámpa kísérletek során, a sorozatos doménkitekeredést már alacsony erőknél (~50 pN) is megfigyeltünk. A nyújtási terhelés az egyes ciklusokban 1-10 pN/s között, a minimális molekulára ható erő pedig 2-10 pN között változott. A részlegesen kitekert molekula 2 pN erőig történő rámpa relaxációja során entrópikus „féregszerű” láncként viselkedett, majd azonnali újra megnyújtása során nem tapasztaltunk szignifikáns domén tekeredést. A teljes domén újratekeredéshez feltehetően hosszabb időt kell a molekulának alacsony erőnél (< 2 pN) megrövidült állapotban töltenie. A kitekeredett titinmolekula rövidülését tehát nemcsak entrópikus, hanem entalpiikus mechanizmusok is segítik, és a molekula hoszú ideig diffundál a konformációs energiaprofilon, mielőtt térbeli szerkezete teljesen stabilizálódik.



Kiss Balázs, Karsai Árpád, Kellermayer Miklós S.Z.

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet

A dezmin, az izomszövet intermedier filamentuma feltételezett szerepet játszik a szöveti mechanikai integritás és rugalmasság fenntartásában, melynek molekuláris alapjai nem pontosan ismertek. Kísérleteinkben izolált, egyedi dezmin filamentumok morfológiáját, rugalmasságát és mechanikailag vezérelt szerkezeti átmeneteit vizsgáltuk atomerőmikroszkóppal (AFM).

A dezmin polimerizációját Na^+ vagy Mg^{++} só hozzáadásával indukáltuk, majd a kialakult filamentumokat csillám-, vagy szilanizált tárgylemezfel-színhez adszorbeáltuk. A felszínt az AFM rugólapkájával végigpásztázva regisztráltuk a filamentumok geometriai orientáció-eloszlását. A rugólapka vertikális mozgatásával a molekulákat feszítés-relaxáció ciklusokban nyújtottuk, melyek során a dezmin rugalmasságát leíró erő-megnyúlás függvényeket vettünk fel.

A filamentumok kontúr hossza és vég-vég hossza alapján számított perzisztenciahossz $0,48 \mu\text{m}$, a becsült Young-modulus $3,7 \text{ MPa}$. A molekulák nyújtása során regisztrált $20\text{-}60 \text{ pN}$ nagyságú erőátmenet vélhetően a dezmin dimerek kiszakítását jellemezheti. A dezmin további nyújtásakor mért konstans erő feltehetően protofilamentum-leválasztódás következménye, míg a molekulakötegek további nyújtásakor mért nemlineáris rugalmasság a részlegesen denaturált dezmin dimerek mechanikai válaszát tükrözheti.



Horváth Róbert

MTA MFA (1121, Budapest, Konkoly Thege Miklós út 29-33.)

Az optikai rezonátorok és fényvezetők fejlesztése napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területe. Széles skálájuk magában foglalja az információ továbbítására kifejlesztett optikai kábeleket, integrált optikai rezonátorokat (optikai számítógép) illetve napjaink legmodernebb bioszenzorait. Ezen elrendezésekben a fény terjedését bizonyos irányokban egy mesterségesen kialakított nano- vagy mikrostruktúra korlátozza, így az elektromágneses sugárzás – hasonlóan a kvantummechanikában megismert elektronállapotokhoz – csak bizonyos és jól meghatározott módusok (rezonanciák) formájában terjedhet. Bioszenzor alkalmazásokban az érzékelendő minta (fehérje, DNS, vírus, baktérium, mérgeanyag stb.) jelenlétével perturbálja a rendszer rezonanciáit, így ezen anyagok nagy pontosságú detektálására nyílik mód. A technológia jelen állása szerint akár egyetlen molekula jelölésmentes érzékelése is lehetséges.

Az előadás ezen szenzorok legújabb alkalmazási területeit tekinti át, mint például fehérjerétegek struktúrájának valós idejű karakterizálását, illetve embrionális őssejtek felületi viselkedésének nyomkövetését.



*Kurunczi Sándor**MTA MFA (1121, Budapest, Konkoly Thege Miklós út 29-33.)*

Előadásomban flagelláris filamentumok szenzorfelülethez rögzítésének (immobilizáció) eredményeit mutatom be. A flagelláris filamentumok genetikai módosításával olyan receptorfehérjéket kívánunk előállítani, amelyeket az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetben (MFA) fejlesztett optikai szenzorokban alkalmazunk.

Bioellipszometriai módszerrel és optikai hullámvezető szenzorral (OWLS) végeztünk kísérleteket a több száz nanométer hosszúságú flagelláris filamentumok immobilizációjára. A felhasznált hordozók Si félvezető lap (bioellipszometria) és TiO_2 – SiO_2 összetételű hullámvezető (OWLS) felületek voltak. A hordozók felületét amino-propil trietoxi szilánnal (APTES) kezeltük, és a kialakított amino-csoportokhoz glutáraldehid keresztkötővel kapcsoltuk a flagelláris filamentumokat. Méréseink azt mutatják, hogy az immobilizáció kinetikája a bioszenzorikában szokásostól eltérően lassabb folyamat, amelynek természetes oka a filamentumok nagy mérete. Az immobilizált rétegről készített AFM képek és optikai modellek alapján olyan részben rendezett (orientált) filamentum-réteg feltételezhető, amely vertikálisan két különböző optikai sűrűségű rétegnek mutatkozik. Az így elérhető nagy felületi kötőhely-sűrűség rendkívül előnyös szenzorikai alkalmazásokban, amelyet flagellinre specifikus IgG oldat reakciójával demonstráltunk.

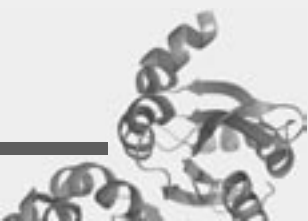


*Fábián László, Valkai Sándor, Oroszi László, Ormos Pál, Dér András
MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet (6726 Szeged, Temesvári
krt. 62.)*

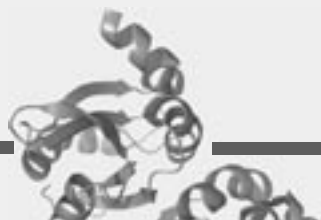
A biofotonika jelenünk egyik új, dinamikus fejlődő interdiszciplináris alkalmazott kutatási területe, mely ötvözi a biofizikát, optikát és számítástechnikát. A 60-as évektől kezdődően a számítástechnika fejlődése exponenciálisnak tekinthető: a szilícium-alapú integrált áramkörök alkatrész-sűrűsége a technológia megjelenése óta nagyjából évente megduplázódik (Moore-törvény). A miniatürizálás azonban nem folytatható a végtelenségig, elemzések szerint az elkövetkező tíz évben elérjük az elméleti határt („Moore’s Law hits the wall”). A probléma hosszú távú megoldása új anyagokat, új működési elveket kíván. Ígéretes alternatívának tűnik az integrált optika, amely az elektronikus áramkörök analógiájaként fényt, miniatűr fényvezetőket és optikai elemeket használ az információ továbbítására.

Az optikai adatfeldolgozás szűk keresztmetszete az olyan nemlineáris optikai tulajdonságokkal rendelkező anyagok felkutatása, melyek képesek ezen optikai áramkörök vezérlésére. Jelen munkánkban a bakteriorodopszin és a fényérzékeny sárga fehérje (Photoactive Yellow Protein, PYP) integrált optikai alkalmazásán keresztül demonstráljuk, hogy a jövő fotonikai áramköreiben biológiai anyagok egyenértékű versenytársai lehetnek a jelenleg alkalmazott szilárdtesteknek.





POSZTER ABSZTRAKTOK



HEp-2 tumor sejtek magjában jelenlévő aktin karakterizálása

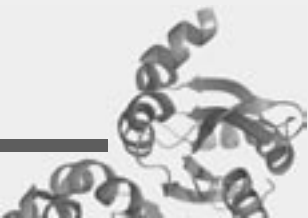
Czimbalek Livia, Barkó Szilvia, Futó Kinga, Tóth Mónika, Kupi Tünde, Hild Gábor és Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet (7624 Pécs, Szigeti u. 12.)

A sejttagon belül az aktin monomer, polimer illetve bizonyos speciális szerkezeti formában (pálcikák, csavarok) egyaránt megtalálható. Az aktin jelenléte elengedhetetlen az RNA polimerázok működéséhez, továbbá összetevője a kromatin átalakulási komplexumnak is. Funkcionális szerepet játszik a fehérjék és az RNA molekulák nukleáris transzportjában, valamint a sejttag burkolatának kialakításában is.

A sejttagon belüli aktin-kötő fehérjék egy része képes befolyásolni az aktin monomerek nukleotid cseréjét (pl. cofilin, profilin), míg más részük hatékonyan vesz részt az aktin monomerek polimerizációjában (pl. formin, ARP2/3), és aktív szerepet játszanak az aktin molekulák citoszol és sejttag között történő mozgásában, valamint kapcsolat fedezhető fel a tumoros megbetegedésekkel is.

Munkánk során Eppendorf InjectMan NI2 injektáló rendszer segítségével Oregon-green 488-al jelölt G-aktint fecskendeztünk HEp-2 sejtek cytolpazmájába, és sejttagjába. A sejteket IX81 Olympus epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az aktin és az aktin-kötők fehérjék sejttagon belül történő elhelyezkedése értékes információkat szolgáltat az interakcióikra és a sejttagon belül lezajló események idejére vonatkozóan.

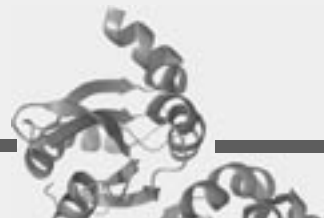


Kiss Alexa, Csúcs Gábor

Light Microscopy Centre, ETH Zürich, Zürich, Svájc

A sejtmag mint az örökítőanyag hordozója, az eukarióta sejtek legjelentősebb organelluma. Pontos elhelyezkedése kulcsfontosságú szerepet játszik számos organizmus és sejtípus fejlődésében. A sejtmag pozicionálásának folyamata emlős sejtekben – más modell-szervezetekhez (*S.cerevisiae*, *C.elegans*) képest – kevésbé ismert. A legnagyobb kihívás ezen vizsgálatok során a sejtmag és a sejt mozgásának megkülönböztetése. Erre kínál egy lehetséges megoldást az ún. mikropecsételés technológia. A vizsgált felületen kialakított mintázatot a sejtek letapadásának kedvező fehérje (fibronektin) és egy hidrofil, az adhéziót gátló polimer (poli-etilén-glikol, PEG) rétegei alkotják. Mikroszkópos felvételeken látható, hogy az így módosított felszíneken a sejtek bipoláris morfológiával rendelkeznek, és a sejtmag oszcillál.

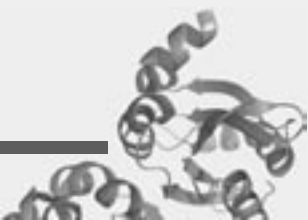
Kutatásunk célja a megfigyelt jelenség molekuláris hátterének és mechanizmusának tanulmányozása és egy lehetséges biofizikai modell megalkotása. Korábbi kísérletek már igazolták, hogy a citoszkeleton szerepe jelentős a folyamatban, de a működési elv még ismeretlen. Kísérleteink főleg a sejtmag mozgásának megértésére koncentrálnak, ám eredményeink hozzájárulhatnak az emlős sejtek polarizációjának, vándorlásának, és az extracelluláris mátrix komponenseivel történő kölcsönhatásának vizsgálatához.



A készárukezelés hatása a friss kenyér állományára és ízére

*Lambertné Meretei Anikó, Kovács Zoltán és Fekete András
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Fizika-Automatika
Tanszék (1118 Budapest, Somlói út 14-16. Tel.:+36 1 482-6023, e-mail:
aniko.meretei@uni-corvinus.hu)*

A sütőipari termékeknel a fogyasztói véleményt döntően a termék állománya és íze határozza meg. Munkánk célja a különböző hőmérsékleten történő hűlés hatásának meghatározása a kenyérbél szerkezetére és ízére. Azonos összetétellel és technológiai paraméterekkel készített kenyereket vizsgáltunk a gyártás napján. Kétféle árukezelést alkalmaztunk, az első csoportot szobahőmérsékleten hűtöttük (lassú hűtés), a második csoportot pedig 5 °C körüli hőmérsékleten (gyors hűtés). A kenyerek íztulajdonságainak megállapításához mindkét csoport esetén a hűlés folyamán 100 °C, 60 °C, 40 °C és 25 °C-os hőmérsékleten vettünk mintát az elektronikus nyelv mérésekhez. A kenyerek szobahőmérsékletre történő hűtése után reológiai méréseket végeztünk a 12 mm vastagságú kenyérszeleteken TA-XT2 típusú precíziós penetrométerrel. Az elektronikus nyelv mérési eredményei alapján a különböző hőmérsékletű kenyerekből előkészített minták csoportjai a készítési hőmérsékletüknek megfelelő sorrendbe rendeződtek. A gyorshűtés során a kenyér jobban megőrzi a frissensült kenyérré jellemző íztulajdonságait. Az állománymérés eredményeinek értékelésénél négy régióra osztottuk a kenyereket, a régiónkénti összehasonlítás alapján 95 %-os szignifikancia szinten különbség mutatkozott a kétféle hűtésű kenyér keménysége között. A gyorshűtés során a kenyér sokkal ellenállóbb szerkezettel rendelkezik, valamint jobban megőrzi friss ízét.



*Schilling Boglárka , Sándor Nikolett, Hegyesi Hargita , Sáfrány Géza
Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató
Intézet*

Ismert, hogy az ionizáló sugárzás a teljes génállományra kiterjedő instabilitást okoz, ami generációkon keresztül fennmarad. Az utódsejtekben nő a genetikai változások, a malignus átalakulások gyakorisága, a mutációk és kromatid aberrációk száma, csökken az osztódási képesség, az élettartam.

Munkánk során in vitro immortalizált humán fibroblaszt sejt kultúrákat kezeltünk egyszeri ^{60}Co -gamma besugárzással, növekvő dózissal. A kis dózis okozta genetikai instabilitás kísérleteket indokolja, hogy orvos-diagnosztikai vizsgálatok során ebben a tartományban éri a páciens a sugárzás. Mértük a sejtek osztódási képességét, és a mitokondriális DNS károsodás időbeli változását. Utóbbi módszert azért választottuk, mert valós idejű PCR -rel érzékenyen meghatározható a deléciós és normál mtDNS mennyisége és aránya.

Eredményeink szerint már 100 mGy sugárdózis hatására kimutatható a sejtszám csökkenése, a deléciós mutánsok száma a kontrollhoz képest 10 %-kal nő, és idővel nem változik. Kettő Gy sugárdózisnál kifejezettebb hatást figyelhettünk meg, az első két hétben a sejtszám nagymértékben csökken, majd a harmadik héttől kontrollhoz közelít. A mtDNS deléció kialakulása is 2-3-szorosára emelkedik. A hatodik héttől a sejtszám ismét csökken, és a mutáns mtDNS aránya a kontroll szintje fölött alakul.

Eredményeink szerint a genetikai instabilitás már kis dózisok hatására is kialakul és mérésének érzékeny markere a mtDNS mutáció követése.



Mit lát az AFM tű, az élő endotél és melanoma sejtek magánéletéből?

*Végh Attila Gergely, Fazakas Csilla, Wilhelm Imola, Krizbai István,
Váró György*
MTA SZBK Biofizikai intézet, Szeged

Az AFM (Atomic Force Microscope) egy nagyon hegyes tű segítségével mintegy „letapogatva” a kívánt minta felszínét, képes arról háromdimenziós topográfiát készíteni. Mivel a módszer folyadékban is működik, élő sejtekről nagyfelbontású képek készítésére nagy sikerrel alkalmazható.

Jelen munka a bőrrákok közül a legveszélyesebb, az életet is fenyegető melanoma, a bőr festéktermelő sejtjeiből (melanocitákból) kiinduló rákhoz kapcsolódik. A veszélyessége abban rejlik, hogy a többi bőrrákkal ellentétben a melanoma gyorsan áttéteket képez a test távoli részeibe, ahol tovább növekszik és roncsolja a szöveteket. Többek közt jelentős gyakorisággal, az esetek 40-60%-ban, képeznek agyi áttéteket, amihez át kell jutniuk a vér-agy gátat képező endotél sejtek rétegén.

Kísérleteinkben ezt az átjutási folyamatot követtük konfluens hCMEC/D3 élő endotél sejt kultúrára helyezve A2058 melanoma sejteket. Eddigi kísérleteink azt mutatják, hogy a melanoma sejtek megváltoztatva mechanikai tulajdonságaikat, az endotél sejteket félretaszítva rést törnek a folytonos rétegen. A folyamat pontos leíráshoz és megértéshez további kísérletek szükségeltetnek.



Vozáry Eszter

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Fizika-Automatika Tanszék

Az élő szövetek jellegzetes impedancia spektrumot adnak az 1 Hz – 30 GHz frekvenciatartományban. Az 1 Hz – 1 kHz, ill. a z 1 kHz – 100 MHz frekvenciáknál jelentkező sávok az ionos vezetésről, ionok diffúziójáról, ill. a sejtmembránok passzív kapacitásáról adnak felvilágosítást (1). Zöldségek, gyümölcsök tárolásakor, ill. szárításakor fellépő szerkezeti változások jól követhetőek az impedancia paraméterek értékeivel. A húsok öregedési folyamati is leírhatóak bizonyos impedancia paraméterekkel.

Alma étintőjén ugyanazon a helyen, héjjal és hámozva mértük meg az impedancia nagyságát és fázisszögét 10 Hz – 1 MHz frekvenciatartományban. Méréseket végeztünk ép és mechanikailag sérült almákon. Fiab spa EKG elektródákat használtunk kb. 1 cm távolságban. A héjas almán mért spektrumokat három, a hámozott almán mért spektrumokat kettő elosztott paraméterű elem és egy ohmos ellenállás soros eredőjéből álló modell áramkörrel közelítettük. A héjas és hámozott almán kapott impedancia paramétereket összehasonlítva megállapítottuk, hogy a héjas almákon kapott impedancia paraméterek is képesek a héj alatti almahús állapotáról információt adni.

1. S, Grimnes, O G, Martinsen Bioimpedance and Bioelectricity Basics. Academic Press New York (2000).



Membránfehérjék termikus stabilitása

^{1a}Fodor, E., ²Fedosova, N., ¹Ferencz, Cs., ¹Tokaji, Zs., ¹Kóta, Z., ²Esmann, M., ³Marsh, D. és ¹Páli, T.

¹ MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged, Magyarország,

² Institute of Physiology and Biophysics, Aarhus, Denmark,

³ Abteilung Spektroskopie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

A fehérjék gombolyodásának és a natív szerkezetük kialakulását irányító molekuláris mechanizmusok megismerése az utóbbi évtizedek kutatásainak központjában áll, mivel ez a fehérjék működésének megértéséhez és annak befolyásolásához elengedhetetlen. Míg számos vízdékony fehérje atomi felbontású térszerkezete és a működést kísérő konformációk sora ismert, a membránfehérjék esetében mind kristályosításukat, mind gombolyodásuk vizsgálatát megnehezíti az, hogy nehezen kezelhető és modellezhető, komplex és heterogén fiziko-kémiai környezetben vannak: a lipid kettősrétegben. Munkánk során a membránfehérjék stabilitását, és az azt befolyásoló tényezőket vizsgáltuk termikus és kémiai denaturáció során, amit a Na, K-ATPázról gyűjtött publikált adataink alapján mutatunk be. Két különböző szervezetből származó és különböző hőmérsékleti tartományban működő, de szekvenciájukban hasonló Na,K-ATPáz aktivitását és stabilitását vizsgáltuk különböző típusú ionok és ionerősségek mellett. Következtetéseinket összevetjük csoportunkban vizsgált más membránfehérjéken kapott eredményeinkkel.

^a Jelenleg: MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged.

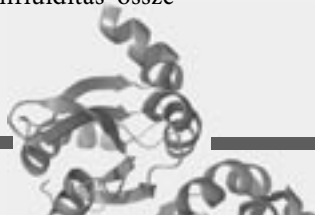


Kaszás Nóra, Sas Balázs, Lenkey Nóra*, Mike Árpád*, Gróf Pál*
Biofizika és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem (Budapest Tűzoltó u. 37-47.)

**MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Celluláris Farmakológia Kutatócsoport (Budapest Szigony utca 43.)*

A GUV-ok (Giant Unilamellar Vesicles) a liposzómák méret és szerkezet szerinti osztályozásában a „legújabb” és egyben legkevésbé vizsgált csoportot alkotják. Több 10 mikrométeres átmérőjüket tekintve a humán sejték mérettartományába tartoznak, így azok modellezésére a kisebb vezikuláknál alkalmasabbak lehetnek. További előnyük abban rejlik, hogy a különféle modern mikroszkópos technikák lehetővé teszik a belsejükben/felületükön lokalizálódott molekulák által előidézett változások vizsgálatát: a liposzóma szerkezetének, mechanikai tulajdonságainak változása, hatóanyag-lokalizáció, stb. Nagyobb méretük ezen felül lehetővé teszi makromolekulák, azok polimerizációs reakcióinak, egymással való kölcsönhatásának tanulmányozását, az oldat egészétől elkülönített térben. A GUV-okon vizsgálható egyes farmakonok membránra gyakorolt hatása, illetve a hatáshoz szükséges membránon keresztüli transzport vagy a lipidek közé történő beoldódás. A mikroszkópos technikák alkalmazása nem követeli meg homogén GUV-preparátum előállítását, ugyanakkor azok a molekuláris kölcsönhatások, amelyek elsősorban meghatározzák az előbb felsorolt tulajdonságokat, spektroszkópiai módszerek segítségével vizsgálhatók. A spektroszkópiai módszerek esetén a következtetések levonása egyszerűbb kevésbé heterogén rendszerek vizsgálatakor, így kívánatos minél homogénebb méreteloszlást elérni. Korábbi irodalmi adatok alapján többféle eljárást alkalmaztak a GUV-ok előállítására. Ezek közül kettő tűnik alkalmasnak arra, hogy jól reprodukálhatóan, rövid preparálási idő mellett, a fehérjék számára is kedvező feltételek (pH, hőmérséklet, ionerősség) biztosíthatóak legyenek, figyelembe véve, hogy párhuzamosan mikroszkópos és spektroszkópiai módszereket kívánunk alkalmazni.

A két kiválasztott GUV-előállítási módszert alkalmazva különféle lipid-összetétel mellett vizsgáljuk az ionerősség szerepét a GUV-képződésben. Fluoreszcencia (inkorporált fluoreszcens lipidek segítségével) és fáziskontraszt mikroszkópiát felhasználva a képződő liposzómák alakját, típusát vizsgáljuk. ESR spektroszkópiát alkalmazva a méreteloszlás-membránfluiditás össze-



függést vizsgáljuk. A folyamatban lévő kísérleteinkben fluoreszcens-jelölt monomer G-aktin molekulákat inkorporálunk a GUV-ok belsejébe, azok beépülését vizsgáljuk a különféle módon előállított GUV-okban. A membránfluiditásra vonatkozó méréseinket kiegészítjük néhány jól ismert hatóanyagnak a GUV-membránra történő hatásának vizsgálatával.

Megfigyeléseink alapján 10-40 mikrométer átmérőjű és homogénebb méreteloszlású GUV-liposzómák állíthatók elő a vákumpárolásos technikával. Változó, de szintén az előbbi méretű liposzómák állíthatók elő a vékonyréteg-hidratációs módszerrel, de a preparátumok a mikroszkópos módszerek számára kedvezőek. Megfigyeléseink szerint, a nagyobb arányban telítetlen lipideket tartalmazó lipidösszetétel kedvező – hacsak nem feltétel – a GUV-ok jó hatásfokú képződéséhez. Előzetes eredményeink alapján az aktin-monomerek inkorporációját biztosítani lehet az optimalizált feltételek között, ami ígéretes tény a makromolekulákhoz kapcsolódó további kísérleti munkáinkhoz.



Kilár Ferenc¹, Szabó Dávid¹, Buzási Péter¹, Farkas Virág¹, Farkas Kornélia¹, Kocsis Béla²

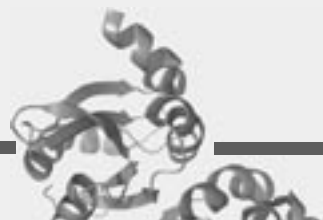
¹Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Bioanalitikai Intézet

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet (7624 Pécs, Szigeti út 12.)

A mikroorganizmusok viselkedése nagymértékben függ felületi tulajdonságaitól. A baktérium- és gombasejtek elektromos térben történő vándorlása lehetőséget ad megkülönböztetésükre. Egy új, mikrochip alapú, mikroszkópos rendszert fejlesztettünk ki mikroorganizmusok elektromos térben történő elemzésére. A rendszerrel meghatározható a sejtek mobilitása, valamint a különböző környezeti hatások, pH, puffer adalékok, stb. hatásának nyomon követése is lehetséges. A sejtek közötti kölcsönhatások, aggregáció is könnyen tanulmányozható. Az analízis akár 2-3 másodperc alatt végrehajtható, nyitott, fedett kapillárisban.

Mikroorganizmusok felületi tulajdonságait, elsősorban hidrofobicitásukat vizsgáltuk különböző puffer-adalékok, detergensok jelenlétében. A hidrofobicitás jellemzésére a mobilitásban bekövetkező változás segítségével megfelelő paramétert vezettünk be. A kísérleti körülmények megfelelő változtatásával először sikerült különböző mikroorganizmusok egymással ellentétes irányú mozgását jellemezni, amely egyúttal a sejtek kölcsönhatásairól is felvilágosítást nyújt. A rendszer lehetőséget nyújt egyedi sejtek és aggregátumok vizsgálatára is. Az eredmények hisztogramok formájában, statisztikai elemzés segítségével lehetőséget adnak a sejtek életciklusainak, „szinkronizált állapotuk” jellemzésére.

A munka az OTKA NI 68863, RET 008/2005, GVOP-168/2004 pályázatok támogatásával készült.



A *Centruroides suffusus suffusus* skorpió venomjából izolált toxin kálium-csatornát gátló

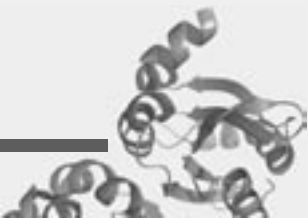
Papp Ferenc¹, Szilagyi Orsolya², Herceg Monika², Corzo Gerardo³, Varga Zoltan², Barraza Omar³, Pavel G. Espino³, Ricardo C. Rodríguez de la Vega³, Gaspar Rezso², Lourival D. Possani³, Panyi György²

¹MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport DE OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet,

²DE OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet,

³Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, Mexico.

A feszültség-kapuzott kálium-csatornák fontos szerepet játszanak számos különféle sejtfunkcióban azáltal, hogy szabályozzák a membránpotenciált. Ezen csatornák farmakológiai manipulálásával az adott sejt funkcióinak szelektív befolyásolására nyílik lehetőség, ha a gátló molekula nagy affinitással és nagy szelektivitással kötődik egy adott csatornához. Régóta ismert, hogy a skorpió venomok olyan peptideket tartalmaznak, amelyek rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal. Mi elsősorban olyan peptidekek kerestünk, amelyek a T-sejtek Kv_{1.3} csatornáját blokkolják, és így a T-sejtes immunválaszt szelektíven befolyásolhatják. A *Centruroides suffusus suffusus* skorpió venomjának HPLC tisztított peptid-frakcióinak vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a venom egyetlen Kv_{1.3}-at gátló peptidkomponenst tartalmaz, amit Css20-nak neveztünk el. A toxin 38 aminosavból áll, amelyet három diszulfid-híd tart össze; molekulatömege 4000,3 Da. Azt találtuk, hogy a Css20 a Kv_{1.3} csatornákon felül a Kv_{1.2}-t is blokkolta, míg a többi tesztelt csatornát – hat másik kálium- és egy szívizombeli nátrium csatornát – 10 nM koncentrációban nem gátolta. A dózishatás-görbék paramétereiből 1,3 and 7,2 nM IC₅₀-értékek adódtak Kv_{1.2} és Kv_{1.3} csatornákra vonatkozóan. Érdekes, hogy a két gátolt csatornánál a hasonló affinitás ellenére a blokkolás kinetikája lassabb a Kv_{1.2} esetében.



Szabó Milán¹, Bernard Lepetit², Erostyák János³, Reimund Goss², Christian Wilhelm², Garab Győző

¹*MTA-Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet, Szeged*

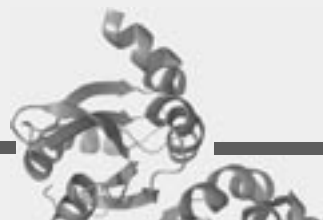
²*Lipcei Egyetem, Növényélettani Intézet, Lipcse, Németország*

³*Pécsi Tudományegyetem, Fizikai Intézet, Kísérleti Fizika Tanszék, Pécs*

A kovamoszatok a globális elsődleges nettó produkcióhoz mintegy 25%-ban járulnak hozzá. Ez – tekintve igen alacsony biomassza tömegarányukat (~0.2%) - rendkívül hatékony napfényenergia-hasznosításukról tanúskodik.

A fényenergiahasznosítás mechanizmusainak megértéséhez fontos a fotoszintetikus apparátust alkotó pigment-protein komplexek szupramolekuláris szerveződésének és szerkezeti flexibilitásának ismerete; ezekről kovamoszatokban – a zöld növényekhez képest – nagyon keveset tudunk. Cirkuláris dikroizmus méréseinkből arra következtettünk, hogy a pigment-protein komplexek királis makrodoménekbe rendeződnek. Ez a makroszerveződés reverzibilis változásokat mutat a különböző környezeti tényezők hatására. Ez magasan szervezett dinamikus rendszert biztosít - hasonlóan a magasabbrendű növényekben megismert szerveződéshez.

Elektrokromizmus mérésekkel mutattuk ki, hogy a fukoxantin - mint fő fénybegyűjtő pigment - heterogén csoportokat alkot, melyek aránya változik a nevelési fényintenzitással. Ennek a szerveződésnek a szerepéről további élet-tani vizsgálatokkal kaphatunk információt.



A lipid és a fehérje szerkezetváltozások elválasztható hatása a membránok dinamikájára

Laczkó-Dobos¹ Hajnalka és Szalontai² Balázs

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ,

¹Növénybiológiai, ²Biofizikai Intézet (6726 Szeged, Temesvári krt. 62, balazs@brc.hu)

A lipidek, illetve a fehérjék membrán dinamikára gyakorolt hatásának vizsgálatához vad típusú (W) és deszaturáz enzimhiányos *Synechocystis* PCC 6803 mutánsokat (desA⁻/desD⁻) neveltünk 25 és 35 °C-on. A hőmérséklet adaptáció következtében a 25 °C-on nevelt vad sejtekben sokkal magasabb volt a többszörösen telítetlen zsírsavakkal rendelkező lipidek aránya, mint a 35 °C-on nevelt vad sejtekben. Ezzel szemben, a desA⁻/desD⁻ sejtek nem tudtak lipidjeik telítetlenségében a növekedési hőmérséklethez alkalmazkodni, mert csak egyszeresen telítetlen zsírsavakkal rendelkezhetnek. Infravörös spektrumokat vettünk fel 3 °C-onként 8 és 92 °C között, és megfigyeltük a fehérjeszerkezet változását az amid I, a hidrogén/deutérium kicserélődés sebességét az amid II, a membrán lipidek transzmembrán rendezettségét a C-H rezgési tartomány, a lipidek laterális rendezettségét a észter C=O rezgések eltolódása alapján a hőmérséklet függvényében. Méréseink alapján úgy tűnik, hogy (i) az alacsony hőmérsékleti stressz tartományban a W sejtekben igen (a desA⁻/desD⁻ sejtekben nem), a lipidek gél-folyadékkristályos átmenete korrelál a növekedési hőmérséklettel; (ii) a fizioiógias hőmérséklettartományban a membráindinamika (fehérje+lipid) meglepően állandó; (iii) a magashőmérsékleti stressz tartományban éles változások vannak a fehérje szerkezetben és dinamikában, amik nem korrelálnak a sejtek nevelési hőmérsékletével/mutációjával; (iv) alapvető különbségek vannak a tilakoid és a citoplazmás membránok között.



*Szilágyi Orsolya, Tóth Ágnes, Krasznai Zoltán, Panyi György, Hajdú Péter
DEOEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet*

A T sejt és az antigén prezentáló sejt között létrejövő immunológiai szinapszis (IS) kialakulása a T sejt aktiváció kritikus lépése. Eredményeképpen számos membránbeli valamint citoszólikus fehérje, beleértve a T sejt receptort is, membrán doménekbe rendeződik át. Korábban kimutatták, hogy a T sejtek domináns feszültség-függő kálium ioncsatornája, a Kv1.3 a T sejt és az antigén prezentáló sejt között kialakuló IS-be szegregálódik. Kísérleteink során a Kv1.3 csatorna e transzlokációjának funkcionális következményeit vizsgáltuk egér helper T (T_H2) és B sejtek között kialakuló IS-ben.

Az egyedülálló (c), valamint IS-ben levő T sejtek (IS) Kv1.3 áramának biofizikai karakterizálását patch-clamp technikával végeztük, teljes-sejt konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban.

Méréseink során kimutattuk, hogy az IS-ben levő sejtek Kv1.3 áramának aktivációja lassult, inaktivációs kinetikája pedig felgyorsult. Továbbá a nyitott és zárt állapotok közötti egyensúlyi megoszlás IS-ben levő sejtek esetében a depolarizáló feszültségek irányába tolódott el. Ennélfogva megállapíthatjuk, hogy a Kv1.3 csatornák IS-be történő szegregációja megváltoztatja a csatornák kapuzási tulajdonságait. Protein kináz gátlószerek alkalmazásával sikerült bizonyítanunk, hogy az inaktivációs kinetika gyorsulása a csatorna defoszforilálódásával magyarázható. Az aktivációs kinetika lassulása valószínűleg a csatorna eltérő membrán doménekbe történő diffúziójának következménye.



Lipid membránok viselkedése szabad membrán él illetve töltött felszín közelében

Takáts-Nyeste Annamária, Derényi Imre
ELTE Biológiai Fizika Tanszék

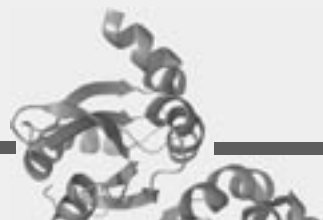
Az utóbbi időben a figyelem központjába került a biológiai vagy mesterséges eredetű membrán vezikulumok felületre történő kitapadása, valamint az azt követő kiszakadása. Elméleti számolásainkkal ezen témakör két alapvető jelenségének fizikai hátterét próbáljuk feltárni. Egyrészt magyarázatot adunk arra, hogy a töltött lipidek jelenléte miért segíti kevésbé a vezikulumok kiszakadását töltött felületre való letapadás után, mint ahogy azt naivan várnánk; másrészt megmutatjuk, hogy az adhézió, illetve a felületen már jelenlévő szabad membrán él miként gyorsítja fel a kiszakadás folyamatát.



Fényérzékenyítő anyagok sejtmembránba történő beépülésének vizsgálata modellrendszeren

Veres Dániel, Böcskei-Antal Barnabás, Voszka István, Csík Gabriella, Módos Károly, Kaposi András, Fidy Judit, Herényi Levente Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet (Budapest, Tűzoltó u. 37-47.)

Az élő szervezetekben létrehozható fotoszenzibilizáció szempontjából elsődleges fontosságú a fényérzékenyítő anyag sejtekhez való kötődésének ismerete. Ezt tanulmányoztuk porfirin típusú fényérzékenyítők és a sejtmembránok egyszerű modelljének tekinthető liposzómák különféle rendszerein, „site”-szelektív fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel. Azt vizsgáltuk, hogy a kismértékben eltérő fényérzékenyítők hogyan helyezkedhetnek el a lipid kettősrétegben. Kísérleteinket kétfajta mezoporfirinnel (MP–dimetil-észter: MPE, MP–dihidroklorid: MPCL) végeztük el többféle egykomponensű kis unilamelláris vezikulákon, melyek méreteloszlását a kísérleti fázisok során dinamikus fényszórásméréssel ellenőriztük. A kellően felbontott spektrum-sorozatokból elő tudtuk állítani a „kötőhelyek” jellemzésére használható inhomogén eloszlásfüggvényeket, amelyekre az MPE esetében két, míg az MPCL esetén egy Gauss-görbe illeszthető. Ezek paramétereit alapján, konzisztens módon két lehetséges „kötőhelyre” következtethetünk: az egyik kötőhely a membránt alkotó két lipidmolekula-réteg között, míg a másik a zsírsavláncok mentén helyezkedik el.



Olajsav- primycin kölcsönhatás modell

Virág Eszter¹, Pesti Miklós¹, Kunsági-Máté Sándor²

¹Pécsi Tudományegyetem TTK, BI, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

²Pécsi Tudományegyetem TTK, KI, Általános és Fizikai Kémiai Tanszék

A primycin antibiotikumnak, korábbi vizsgálataink szerint, plazma membrán dezorganizáció hatása van. Célunk az olajsav, mint az egyik fő membránt alkotó vegyület, és a primycin kölcsönhatásának termodinamikai paramétereinek meghatározása volt. A kölcsönhatást fluoreszcenciás módszerrel mértük. 16-36°C közötti hőmérséklet-tartományban megmértük, majd gauss-görbékre bontottuk a fluoreszcenciás spektrumokat. A kiértékelést a Benesi- Hildebrand módszerrel végeztük.

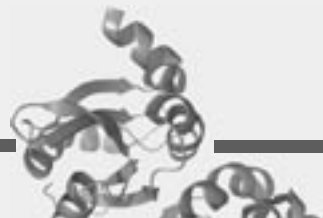
A hőmérséklet emelésével 2 gauss görbénél tapasztaltunk változást. Ebből az oldatbeli kémiai egyensúly vagy egyensúlyok eltolódására következtettünk. Ez alapján a két gauss-görbével számított eredményeink a következők: $-\Delta H_1 = 27769,217$ J/mol, $\Delta S_1 = -10,14$ J/molK és $-\Delta H_2 = 8078,659759$ J/mol, $\Delta S_2 = 53,9437$ J/molK. A termodinamikai paramétereiből látszik, hogy két, egymással egyidejűleg jelenlévő kölcsönhatás van a rendszerben. A kölcsönhatás erőssége másodlagos kötések kialakulására utal, ami esetünkben a molekula szerkezetét figyelembe véve H kötések kialakulását jelentheti. A primycin – olajsav kölcsönhatásban a hidrogén kötések kialakulhatnak egyenként és együttesen is. A külön-külön kialakuló H kötések esetében a komplex sokkal nagyobb flexibilitással rendelkezik, mint amikor a kettős H kötés alakul ki. A 2 féle kötés egyidejű kialakulása merevíti az olajsav molekulát, egészen pontosan az olajsav mozgását gátolja, ami a fluoreszcencia intenzitás növekedését eredményezi.



Kardos József

ELTE TTK, Biokémiai Tanszék

A fehérjék kóros aggregációjával és amiloid lerakódásával járó betegségek, mint pl. az Alzheimer-kór, társadalmilag egyre súlyosabb problémát okoznak. A hatékony terápia kidolgozásához elengedhetetlen az amiloidképződés mechanizmusának és a szálak stabilitását meghatározó kölcsönhatásoknak pontosabb ismerete. Az amiloidképződés nukleáció-függő folyamat, amely a megemelkedett fehérjekoncentráción kívül a környezeti paramétereiktől és más kölcsönható molekulák jelenlététől is függ. Modellfehérjéül a β_2 -mikroglobulint (β_2m) választottuk, amely a vesedialízishez kötődő amiloidózis kialakulásáért felelős. Munkánk során komplex biofizikai és biokémiai módszerekkel tanulmányoztuk a β_2m polimerizációját. Az aggregátumok morfológiáját és méretét elektron- és atomerő mikroszkópia segítségével vizsgáltuk. H/D izotópkicserélődés és IR- spektroszkópiai mérésekkel az aggregátumok másodlagos szerkezetére, illetve a hidrogén-hidak által kialakított rigid amiloid mag kiterjedésére következtettünk. A szálak növekedésének kinetikáját thioflavin-T fluoreszcencia segítségével követtük. Vizsgáltuk a szálak törésének hatását a polimerizáció folyamatára, amelynek in vivo szerepe lehet a betegség kifejlődésében. Az amiloidképződés termodinamikai paramétereit direkt módon, izotermális titrációs kalorimetriával határoztuk meg. Vizsgáltuk a különféle adalékanyagok amiloidképződésre gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a lizofoszfátidsav (LPA) destabilizálja a natív β_2m molekulát, amely így részlegesen kitekeredett, amiloidogén állapotba kerül. Limitált proteolízis kísérletekkel vizsgáltuk az átmeneti állapot szerkezetét, felderítve a molekula fellazult, flexibilis részeit. A hasítóhelyeket tömegspektroszkópiával azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy a molekula N-terminális régiója, amelyhez in silico dokkolási kísérleteink szerint az LPA is kötődni tud, fellazul. Eredményeink közelebb vihetnek az amiloidképződés mechanizmusának megértéséhez és ezzel új terápiás lehetőségek kidolgozásához.



Flagelláris filamentumokat érzékelő elemként alkalmazó integrált optikai bioszenzor fejlesztése

Kozma Péter², Hülber Tímea¹, Németh Andrea¹, Barátné Jankovics Hajnalka², Kurunczi Sándor³, Kaspar Cottier³, Hámori András¹, Horváth Róbert¹, Petrik Péter¹, Vonderviszt Ferenc²

¹Magyar Tudományos Akadémia Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet (1121 Budapest Konkoly Thege Miklós út 29-33.)

²Pannon Egyetem, Nanotechnológia Tanszék (8200 Veszprém, Egyetem út 10.)

³Creoptix GmbH (CH-8820 Wädenswil, Engelstrasse 2B)

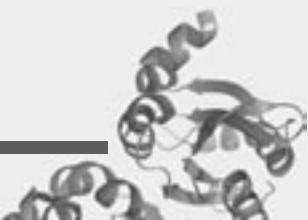
Fehérjemérnökség vagy irányított evolúció alkalmazásával módosított flagelláris filamentumok képessé tehetők célmolekulák specifikus megkötésére [1]. E fehérjeszálakat immobilizációs eljárással [2] suprasil hordozóra párologtatott, felületaktivált monomódusos Ta₂O₅ hullámvezető vékonyrétegre rögzítjük. A leválasztást folyadékcellában, spektroszkópiai ellipszométerrel, „in situ” követjük, majd atomerő mikroszkóppal „ex situ” vizsgáljuk. Az így kapott struktúra felületén végbemenő ligandumkötési események a hullámvezető vékonyrétegbe csatolt fény fázistolását okozzák, mely integrált optikai interferométerrel [3] kivételes érzékenység mellett detektálható. A megkötött célmolekulák mennyisége e fázistolás mértékével arányos.

Referenciák:

[1]: Vonderviszt et al. PO402683, 2004

[2]: Kozma et al., Phys. Stat. Sol. 5 (2008) 1427

[3]: Cottier WO2008110026, 2009



Anizotróp szerkezetek feltárása differenciálpolarizációs lézersugárpásztázó mikroszkóppal. Növényi sejtfa rendezettsége és a szárazságtűrés; amiloid-filamentumok periodikus szerkezete

Steinbach Gábor¹, Pomozi István^{1,2}, Buza Ágnes¹, Jánosa Dávid Péter¹, Horváth V. Gábor¹, Makovitzky József³ és Garab Győző^{1,4}

¹MTA Szegedi Biológiai Központ (H-6726 Szeged. E-mail: stein@brc.hu)

²Pi Vision Bt., Budapest

³Department of Neuropathology, University of Heidelberg, Heidelberg

⁴Medicopt Bt., Szeged

Az elmúlt évek során egy új leképezési módszert fejlesztettünk ki azzal a céllal, hogy mikroszkópikus minták főbb polarizációs optikai sajátosságait megmérjük és térbeli eloszlásukat megjelenítsük. A kifejlesztett eszköz, a differenciálpolarizációs lézersugárpásztázó mikroszkóp (DP-LSM), amint azt korábban bemutattuk (Steinbach és mtsai, 2008 Cytometry; 2009 Acta Histochem. és hivatkozásai), segítségével lehetővé vált a fő DP mennyiségek képpontonkénti mérése és így az anizotrópia 2D és 3D feltérképezése. A Kongresszuson a jelenlegi vizsgálataink közül két alkalmazást mutatunk be.

Az éghajlatváltozás és a globális felmelegedés következtében egyre fontosabb annak felderítése, hogy miként fokozható a növények szárazságtűrése. Számos adat utal arra, hogy ez nagy mértékben függ a sejtfa szerkezetétől, ill. a cellulózszerkezet ozmotikus stresszre adott válaszreakciójától. Ennek tesztelésére alkalmazunk DP-LSM leképezéseket. A fokozatosan növelt ozmotikus stresszhatáshoz adaptálódott és az azt hirtelen elszenvető, adaptálódni nem képes UNGGI-9 japonika rizs szuszpenzióan a sejtfa differenciálpolarizációs vizsgálataival azonosítani tudtunk a cellulózsálak szerkezetében bekövetkező – más módszerrel nem detektálható – változásokat. A DP-LSM-mel végzett méréseket a sejtfa lignifikációjának meghatározásával egészítettük ki. Ezek az eredmények más vonatkozásban, pl. a cellulóz potenciális energetikai felhasználása területén, is felhasználhatók.

Az amiloid-filamentumokból összeállt hierarchikusan rendezett fehérje-aggregátumok számos neurodegeneratív betegségért felelősek. Konfokális DP-LSM leképezéssel sikerült feltérképezni a Congo Red-del megfestett (izolált) humán amiloidszálak finomszerkezetét, a szálakhoz kötődő fluoreszcens festékmolekulák abszorpciós és emissziós dipólusainak irányeloszlását. (FDLD és anizotrópia-leképezések). A homogén eloszlású fluoreszcencia intenzitás képekkel ellentétben az FDLD és r képek erős anizotrópiájú lokálisan előjelet váltó inhomogenitásokat mutattak. Több mintában határozott, μm



méretű periodikus struktúrák – makrohelikális szerkezetek voltak azonosíthatók, amelyek valószínűleg a sokkal kisebb, kb. 100 nm-es skálán korábban azonosított helikális szerkezetek makroszerveződéséből származnak

A DP mikroszkópia – fontos egyedi (és kvantitatív) információt szolgáltatva anizotrópiáról valamint a polarizált fény és a vizsgált minta kölcsönhatásairól – segíti bonyolult rendszerek molekuláris szerkezetének a feltárását.



A foszfoglicerátkináz folding- és misfolding- energiefelszíneinek összehasonlítása

Agócs Gergely, Fidy Judit, Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet (1094 Budapest, Tűzoltó utca 37-47.)

A fehérjék natív szerkezetének kialakulása (folding) mögött meghúzóó fizikai folyamatok számos megválaszolatlan kérdést vetnek fel, csakúgy, mint a több betegség alapját képező hibás konformációk kialakulása (misfolding és amiloidképződés).

A fehérjedinamika egyik termodinamikai megközelítése a molekula energiefelszín-modelljén alapul. Jelen munkánkban a foszfoglicerát-kináz enzim környezetét kísérletileg változtatjuk a natív szerkezetnek kedvezőtől az amiloidképződést elősegítőig. A folding/misfolding folyamat kinetikáját mérve, a körülmények finom hangolásával feltárjuk a fehérje energiefelszínének jellemzőit. Megállapítottuk, hogy az olvadt gombóc átmeneti állapotig azonos útvonalon halad a folding és a misfolding, majd ezután kettéválik: a folding egy energiagát átlépésével percekben belül lezajlik, míg az amiloid kialakulása napokon keresztül elhúzódik. Amint a körülményeket a helyes gombolyodásnak kedvező semleges pH-ról a hibás gombolyodást elősegítő alacsonyabb pH-k irányába változtatjuk, a natív szerkezet kialakulása lelassul – jelezve az olvadt gombóc és a natív állapot közötti energiagát növekedését –, miközben a natív szerkezet stabilitása is folyamatosan csökken.



Egy „tumor szuppresszor” tulajdonságú citokróm b561 fehérje spektroszkópiai jellemzése

Bérczi Alajos⁽¹⁾ és Han Asard⁽²⁾

⁽¹⁾MTA SZBK Biofizikai Intézet, Szeged, és

⁽²⁾Department of Biology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

A citokróm b561 (Cyt-b561) fehérje családot aszkorbáttal redukálható, transzmembrán helyzetű, 6 transzmembrán hélixet és 2, b-típusú hemet tartalmazó citokrómok alkotják. A fehérjecsalád legismertebb – és egyben névadó – tagja a mellékvesekéreg kromaffin granuláiban található citokróm b561 (CGCytb). A CGCytb mellett eddig még 4 másik Cyt-b561 fehérjét írtak le (és jellemezték többé-kevésbé), amelyek között egy „tumor szuppresszor” tulajdonságú citokróm b561 (TSCytb) a legújabb. Sikerült megfelelő mennyiségben, élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtekben termeltetnünk, majd az élesztő sejtek membránjaiból kitisztítanunk a human fehérje egerekben található homológ fehérjéjének rekombináns, a C-terminálison (His)₆ jelölővel ellátott változatát (rMmTSCytb). Az rMmTSCytb spektroszkópiai vizsgálatai (UV-VIS, EPR) alapján megmutatjuk, hogy a fehérje

- (a) valóban kettő, b-típusú hemet tartalmaz, amelyek mikrokozonyete eltér az eddig tanulmányozott, a Cyt-b561 fehérjecsaláddhoz tartozó, más fehérjék hem csoportjainak mikrokozonyetétől,
- (b) az aszkorbát (ASC) mellett két –SH csoportot tartalmazó reagensekkel is (DHLA, DTT) redukálható, de nem redukálható NAD(P)H-val vagy GSH-val,
- (c) ASC nagy koncentrációi mellett az egyik hem csoport környezetében konformáció változás következhet be,
- (d) auto-oxidálódik, amely folyamat alapján a két, b-típusú hem redox potenciálja 22 mV és 148 mV.

Az rMmTSCytb szekvenciájának egyedisége alapján egy érdekes, az eddig vizsgált másik 4 Cyt-b561 fehérjénél nem elképzelhető hem kötődési lehetőségre is felhívjuk a figyelmet.



ADP-aktin filamentumok hatása különböző miozin S₁ izoformák ATPáz aktivitására

Dudás Réka, Orbán József, Nyitrai Miklós, Hild Gábor
PTE ÁOK Biofizikai Intézet, Pécs

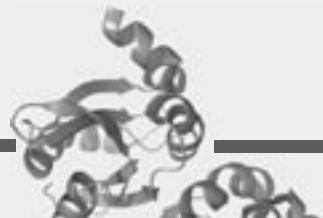
Az izomkontrakció fontos szerkezeti elemei a vékony filamentumok, melyek főleg aktin filamentumokból épülnek fel. Fiziológias körülmények között ezek ATP-kötő aktin monomerekből polimerizálódnak, de ATP-hiányos körülmények között létrejöhetnek ADP-monomerekből is. A monomerek szerkezete nukleotidfüggő, és strukturális különbségek figyelhetők meg a különböző nukleotidot kötő monomerekből létrejött filamentumok között.

A miozin az egyik legfontosabb aktinkötő fehérje. Az aktomiozin komplex hatékonyságát a miozin ATPáz aktivitása jellemzi. Kimutatták, hogy a miozin S₁ alegység szívizom eredetű izoformája alacsonyabb ATPáz aktivitással rendelkezik, mint a vázizom-izoforma.

Az S₁ ATPáz aktivitását az aktin filamentumok jelenléte serkenti. Ennek mértéke függ a filamentum konformációjától, ami különbözik az ATP-, ill. ADP-filamentumok esetében.

Munkánk során az ADP-aktin monomerekből polimerizált filamentumok hatását vizsgáltuk vázizom-, illetve szívizom-eredetű miozin S₁ ATPáz aktivitására.

Eredményeink megerősítették, hogy a szívizom-S₁ bazális aktivitása alacsonyabb, mint a vázizom-eredetű S₁ aktivitása. Mindkét aktin izoforma kisebb mértékben serkentette a szív-S₁ ATPáz aktivitását, mint a vázizom-S₁ esetében. Az ADP- és ATP-filamentumoknak az S₁ ATPáz aktiváló képessége nagy hasonlóságot mutatott minden esetben.



Membránfehérjék termikus stabilitása

^{1a}Fodor, E., ²Fedosova, N., ¹Ferencz, Cs., ¹Tokaji, Zs., ¹Kóta, Z., ²Esmann, M.,
³Marsh, D. és ¹Páli, T.

¹ MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged, Magyarország,

² Institute of Physiology and Biophysics, Aarhus, Denmark,

³ Abteilung Spektroskopie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

A fehérjék gombolyodásának és a natív szerkezetük kialakulását irányító molekuláris mechanizmusok megismerése az utóbbi évtizedek kutatásainak központjában áll, mivel ez a fehérjék működésének megértéséhez és annak befolyásolásához elengedhetetlen. Míg számos vízdékony fehérje atomi felbontású térszerkezete és a működést kísérő konformációk sora ismert, a membránfehérjék esetében mind kristályosításukat, mind gombolyodásuk vizsgálatát megnehezíti az, hogy nehezen kezelhető és modellezhető, komplex és heterogén fiziko-kémiai környezetben vannak: a lipid kettősrétegben. Munkánk során a membránfehérjék stabilitását, és az azt befolyásoló tényezőket vizsgáltuk termikus és kémiai denaturáció során, amit a Na,K-ATPázról gyűjtött publikált adataink alapján mutatunk be. Két különböző szervezetből származó és különböző hőmérsékleti tartományban működő, de szekvenciájukban hasonló Na,K-ATPáz aktivitását és stabilitását vizsgáltuk különböző típusú ionok és ionerősségek mellett. Következtetéseinket összevetjük csoportunkban vizsgált más membránfehérjéken kapott eredményeinkkel.

^a Jelenleg: MTA SzBK, Biokémiai Intézet, Szeged.

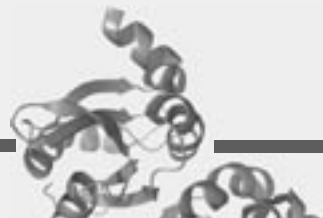


Gráczer Éva¹, Varga Andrea¹, Melnik Bogdan², Semisotnov Gennady², Závodszy Péter¹ és Vas Mária¹

¹MTA, SzBK, Enzimológiai Intézet (1518 Budapest, Pf. 7)

²OTA Fehérjekutató Intézet (142292, Pushchino, Oroszország)

Az alegységek és domének szerepét vizsgáltuk a térszerkezet kialakulása során termofil, mezofil és hidegtűrő IPMDH-kal végzett renaturációs kísérletekben. Mindhárom esetben a domének és alegységek natív térszerkezete kooperatív módon, a molekula szerkezeti szimmetriáját fenntartva alakul ki. A renaturáció időgörbéje triptofán (Trp) fluoreszcencia segítségével követve egy gyors és egy lassú elsőrendű folyamatból áll. A gyors szakasz végén az anizotrópia eléri a natív enzimekére jellemző értékeket, tükrözvén, hogy a polipeptidláncok asszociációja már a kezdeti fázisban bekövetkezik. Ez a dimer intermedier már köti az IPM szubsztrátot, de a harmad- és negyedleges szerkezetre jellemző kölcsönhatások csak a renaturáció lassú szakasza során alakulnak ki. Az egyes domének térszerkezet kialakulásának vizsgálatához irányított mutagenézissel elértük, hogy mindig csak egy adott doménben forduljon elő Trp. A mutánsok renaturációját szintén Trp fluoreszcencia segítségével követtük. Az időgörbék egymáshoz és a vad típusú enzimhez hasonló bifázikus jellege és sebessége a domének egymást elősegítő, kooperatív térszerkezet kialakulását bizonyítja.



A titin Z₁Z₂ és Z₁Z₂-telethonin komplex nanomechanikai vizsgálata

Kollár Veronika^{1,2}, Murvai Ünige¹, Szatmári Dávid¹, Kiss Balázs¹,
Grama László¹ és Kellermayer Miklós²

¹Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biofizikai Intézet

²Semmelweis Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

A titin egy 3,0-3,6 MDa tömegű óriás izomfehérje, amely a szarkomer Z-lemeze és M-vonala között húzódik, és meghatározza a harántcsíkolt izom passzív mechanikai tulajdonságait. A titin Z-lemezhez való horgonyzásáért a titin N-terminálisán található két Ig-domén (Z₁ és Z₂) és a telethonin fehérje által alkotott komplex a felelős, amelyben a telethonin a Z₁Z₂ domének keresztül, antiparallel módon keresztüköt két titinmolekulát. Munkánk célja annak vizsgálata, hogy a Z₁Z₂ fragmentum és Z₁Z₂-telethonin komplex mechanikai tulajdonságai hogyan határozzák meg a titint horgonyzó komplex modellszámítások szerint is jelentős mechanikai stabilitását. Ennek érdekében a Z₁Z₂, illetve a Z₁Z₂-telethonin komplex nanomechanikai tulajdonságait vizsgáljuk atomerőmikroszkóppal végzett mechanikai manipulációs kísérletekben.

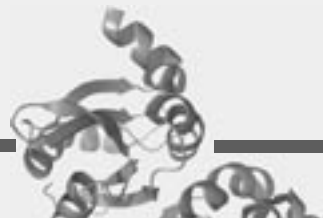
A kísérletekhez a Z₁Z₂ szakaszt és a telethonint bakteriális expressziós rendszerben állítottuk elő, és sikerrel hoztuk létre a Z₁Z₂-telethonin-Z₁Z₂ és Z₁Z₂-DNS komplexeket. Utóbbi esetben az általunk létrehozott, tiol vagy maleimid végű DNS a fehérje C-terminálisához kötődve fogantyúként szolgál a mechanikai manipuláció során a fehérje megragadásához.

Eddigi kísérleteink alapján a Z₁Z₂ domének mechanikai kitekeréséhez szükséges erők (80-120 pN) alacsonyabbak, mint más, korábban vizsgált titin domének esetén megfigyelt értékek, ami arra utal, hogy a fehérjekomplex nagy mechanikai stabilitását döntően nem az egyedi Ig-domének mechanikai viselkedése határozza meg.



*Agócs Gergely, Solymosi Katalin, Varga Andrea, Závodszy Péter,
Fidy Judit, Osváth Szabolcs*

Az amiloid plakkok lerakódása több betegségnek is a molekuláris hátterét képezi. A fehérjeoligomerek és -aggregátumok képződése szoros kapcsolatban van a betegség előmenetelével. Az amiloidlerakódások egy több lépésből álló aggregációs kaszkád végtermékét jelentik. A fehérjék amiloidból történő visszanyerésének lehetőségét már igazolták (Booth II et al., Nature 385 (1997) 787-93), de a teljes folyamatot, amelyben enzimatikusan aktív fehérjét amiloiddá alakítunk, majd az amiloidból aktív szerkezetet nyerünk vissza, még nem vizsgálták. A jelen munkában enzimatikusan aktív foszfoglicerát-kinázt (PGK) amiloiddá alakítunk, majd visszanyerjük az aktív formát. A fehérjének az amiloidszerkezetbe alakulását elektronmikroszkóppal, kongóvörösdikroizmus mérésével, tioflavin-T festéssel és dinamikus fényszórással követtük nyomon. Az érett amiloidfibrillumok kialakulása után a fehérjét visszaalakítottuk a natív szerkezetbe. A kiinduló enzim és a visszanyert állapot biológiai azonosságát kalorimetriás és enzimaktivitás-mérésekkel ellenőriztük. Eredményeink azt mutatják, hogy a natív állapot stabilizálása nem elegendő az aktív enzimszerkezet visszanyerésére. A natív szerkezet helyreállításának kulcslépése az aggregátumok destabilizálása volt.



A szubsztrát kötődés irányítottá teszi a humán foszfogllicerát kináz (PGK) funkcionális csuklómozgását

Pálmai Zoltán¹, Chaloin Laurent², Lionne Corinne², Fidy Judit¹, Perahia David³, Balog Erika¹

¹*Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest*

²*CPBS, UMR 5236, CNRS–Univ Montpellier 1-2, France*

³*Lab de Modélisation et d'Ingénierie des Protéines, Univ Paris-Sud, Orsay, France*

A PGK egy két doménből álló enzim mely a foszfát csoport átadását katalizálja a glikolízis egyik lépéseként. 1,3-biszfoszogllicerát az enzim N-doménjéhez, míg az ADP a C-doménhez kötődik. Ahhoz, hogy a foszforil-transzfer végbemehessen a szubsztrátok kellően közel kell kerüljenek egymáshoz; így feltételezték, hogy az enzim működése során csuklószerű mozgást végez.

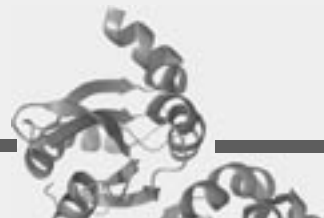
Molekula dinamikai szimulációval vizsgáltuk a csuklómozgás jelenlétét az enzim apo ill- komplex formájában. Eredményeink azt mutatják, hogy az apo enzim dinamikájában is jelen van egy viszonylag kis amplitúdójú csuklómozgás ns-os időskálán, a komplex rendszer csuklómozgásának periódusa viszont jóval meghaladja 20 ns-ot. A szubsztrát kötődés hatására a csuklómozgás irányítottá válik, egyetlen csuklópont jelenik meg a szubsztrát kötőhelyek közelében, míg az apo forma esetében több csuklópont vesz részt a mozgás kialakításában kevésbé definiáltá téve így a mozgást.



Ujfalusi-Pozsonyi K.¹, Bacsó Zs.², Gutayné Tóth Zs.², Hild G.¹ és Nyitrai M.¹
¹PTE ÁOK, Biofizikai Intézet ²DE OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Aktin monomerek polimerizációs sebességének változását tanulmányoztuk detergensek jelenlétében. A fluorofórral jelölt molekulák fluoreszcenciája a polimerizáció során jelentősen megnő, a fluoreszcens jel követésével a polimerizáció dinamikájáról kaphatunk információt. A polimerizáció sebessége alacsony detergens koncentrációk esetén csökkent mindhárom vizsgált detergens esetén. Ez a csökkenés a detergensek kritikus, micellák kialakulásához vezető koncentrációjáig volt megfigyelhető, majd ezt meghaladva TX100 és az NP40 magasabb koncentrációinál növekedni kezdett. A CHAPS magasabb koncentrációban sem gyorsította a polimerizáció folyamatát.

Az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságainak tesztelésére anizotrópia lecsengés méréseket végeztünk fázisfluoriméter segítségével. Az alacsony TX100 koncentráció mellett polimerizálódott filamentumok hosszú rotációs korrelációs ideje megnő. Magas detergens koncentrációk mellett nem mutatható ki eltérés. A detergensek kritikus, micellák kialakulásához vezető koncentrációja fontos szerepet játszhat a megfigyelt hatás létrejöttében. Egyes detergensek molekuláris / sejtbiológiai alkalmazása során az eredmények értelmezésekor figyelembe kell venni az aktin dinamikájára és polimerizációjára kifejtett közvetlen hatásukat is.



Kollektív, ms időskálájú mozgások vizsgálata PGK esetében – domain kölcsönhatások szerepe a dinamika aktivációjában.

Schay Gusztáv¹, Osváth Szabolcs², Herényi Levente², Fidy Judit^{1,2}

¹MTA Membránbiológiai Kutatócsoport (Bp. 1113 Daróczi u. 24.)

²SE. Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet (Bp. 1094 Tűzoltó u. 37-47.)

A foszfogllicerát kináz régóta ismert fehérje. Feltételezik, hogy a katalizált biokémiai reakcióhoz a fehérje két domainje csuklószerű mozgást végez. Ennek során két konformációs végállapot, a nyitott- és a zárt szerkezet közötti átmenet valósul meg. Mindaddig azonban a két feltételezett állapotot csupán különböző fajokból sikerült izolálni, nincsen olyan kísérletes szerkezeti információ a kezünkben amely egy adott peptidlánc esetében a nyitott és a zárt konformációt egyaránt tartalmazná.

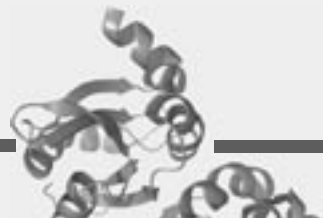
A PGK-t nem túl nagy mérete, két domainből álló szerkezete, valamint az a tény, hogy a kémiai reakció megvalósulásához mindkét domainre szükség van, ideális „terepévé” teszi az alegység-kölcsönhatás vizsgálatának. Ismert például, hogy az egyes domainek feltekeredési kinetikája eltérő, valamint az is, hogy a feltekeredés során a domainek egymás tekeredési folyamatát befolyásolják, annak ellenére, hogy külön-külön mindkét domain maga is feltekeredik.

A domainek közötti kölcsönhatások érdekesek lehetnek a hosszú, ms-os időskálán is, hiszen ez éppen a katalizált biokémiai reakció karakterisztikus idejének nagyságrendjébe esik. Ezt a kölcsönhatást vizsgáltuk a PGK dinamikájának termikus aktivációján keresztül, és egy egyszerű modell segítségével termodinamikai paramétereket is meghatároztunk. Ezek a paraméterek érzékenyek a szomszédos domain jelenlétére, jelezve a ms időskálájú kollektív dinamikában a csatolás fontosságát.



*Szatmári Dávid, Dudás Réka, Nagy Attila, Hild Gábor és Nyitrai Miklós
PTE ÁOK, Biofizikai Intézet*

Aktív molekuláris transzport a mag és a citoplazma között, a magpórus komplexen keresztül történik és az importin- β fehérjecsalád által szabályozott. Tagja, a magasabb rendű eukariótákból ismert, transzport receptor, exportin6. Érdekes kérdések megválaszolásához adhat segítséget ez a fehérje. A citoskeletális elemek milyen úton szállítódnak be- és ki a magból? Milyen fehérjék szabályozzák a transzportfolyamatokat? Több labor által is bizonyított, exportin6-hoz köthető funkció, a profilin szabályozta aktin transzport. Nem tisztázott, az exportin6-profilin-aktin komplexek kialakulásának folyamata, a komplexek stabilitása, az exportin6 affinitása G-aktinhoz és F-aktinhoz, a komplex stabilitását a profilin izoformák milyen mértékben szabályozzák. Célunk az exportin6-profilin-aktin komplexek előállításának és jellemzése biofizikai módszerekkel. A humán exportin6, egy kb. 124 kDa-os fehérje, expressziójához szükséges DNS konstrukció, egy amplicilin rezisztenciát hordozó pET-19b vektor, amely tartalmazza az Exp6 gént. A fehérje expresszióját, E.coli BL21-es sejtekben, IPTG-vel indukáltuk. Tisztítását, a fehérje N-terminálisán lévő His-tag segítségével, Co- és Ni-NTA kromatográfiával, natív és denaturáló körülmények között végeztük. Sikerült egy mikroM-os koncentrációjú exportin6 oldatot készítenünk. Továbbiakban az exportin6-profilin-aktin komplexek dinamikai és kinetikai jellemzőit szeretnénk vizsgálni, fluoreszcencia és EPR spektroszkópiai, kalorimetriai és gyorskinetikai módszerekkel.



Agyspecifikus tropomiozin izoformák jellemzése

Talián Cs. Gábor¹, Bugyi Beáta², Hild Gábor, Nyitrai Miklós

¹PTE ÁOK, Biofizikai Intézet, H-7624 Pécs

²CNRS, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, 91198, Gif-sur-Yvette (Franciaország)

E-mail: gabor.c.talian@aok.pte.hu

A tropomiozinok pálcika alakú, α -hélix szerkezetű dimer fehérjék, melyek képesek az aktinhoz kötődni. Számos izoformájuk fordul elő, amelyek alternatív gén- illetve promoterhasználat, valamint alternatív „splicing” révén keletkeznek; emlősökben jelenleg 4 gén ismeretes (α - δ). A tropomiozinok az egész sejten megtalálhatók, ahol csak aktin citoskeleton van, és hozzájárulnak a különböző kompartmentek filamentumainak sajátos tulajdonságaihoz. Míg a tropomiozin szerepét az izomsejtek összehúzódásában kiterjedten tanulmányozták, és viszonylag jól értjük, addig kevés az ismeret a nem izomsejtekre vonatkozóan. Az emlős agyban három specifikus izoformát azonosítottak^[1], melyeket TMBR-1, -2 és -3 névvel jelölnek.

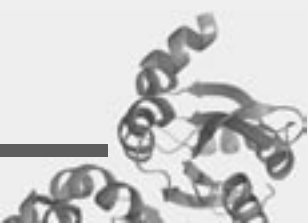
Az idegsejtekben kifejeződő egyedi izoformák különböző eloszlásban szállítódnak a nyúlványokba és a sejttestbe, a fejlődési stádiumtól is függően^[2]. Az átfedő exonhasználat miatt nem lehetséges teljesen specifikus ellenanyagokat vagy „antisense” próbákat létrehozni, ezért megfelelő expressziós rendszerben egyedi tropomiozin izoformákat állítottunk elő, hogy jellemezhessük biológiai tulajdonságaikat, és alkalmas jelölés után a neuronba juttatva követhessük sejten belüli elhelyezkedésüket. Az utóbbi célra epifluoreszcens mikroszkóppal kombinált mikroinjektáló rendszert alkalmaztunk, a tropomiozinhoz pedig különféle Alexa festékeket kapcsoltunk.

Az előzetes eredmények alapján az egér fibroblasztból bakteriális expressziós rendszerbe (pET28a plazmid BL21 DE3 E. coli sejtben) klónozott TMBR-1 és -3 nagy mennyiségű tisztított fehérjét szolgáltattak. A His-tag teljesen eltávolítható Faktor Xa emésztéssel, így rendelkezésre áll a natív tropomiozin izoforma. Koszedimentációs vizsgálatokban a TMBR-3 jellemző aktin-kötődést mutatott; a disszociációs egyensúlyi konstans a μ M-os tartományban volt. A közeljövőben tervezzük további, agyban kifejeződő izoformák (pl. TM5a) bevonását is a kísérleteinkbe.

Irodalom:

[1] Lees-Miller JP et al. Mol Cell Biol. 10 (1990) 1729.

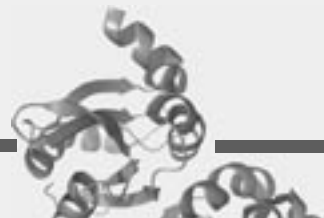
[2] Gunning PW et al. TRENDS in Cell Biol. 15 (2005) 333.



Ujfalusi Zoltán, Hild Gábor és Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet (7624 Pécs, Szigeti út 12.)

A forminok nagymértékben konzervált, multidomén szerkezetű fehérjék, melyek az eukarióta sejtek mikrofilamentum rendszerének szabályozásában vesznek részt. Aktinnal való kölcsönhatásukban kulcsszerepet tölt be FH2 (formin homológ 2) doménjük. Az FH2 domén antiparallel dimereket alkot, az FH1 és FH2 doméneket összekapcsoló 'linker' régió segítségével. Mint azt korábbi vizsgálatainkból tudjuk (Bugyi és mtsai, 2006), az mDia1 fragmentumok a bekötődésük arányától függő módon módosítják az aktin filamentumok konformációját. Munkánk során az emlős izomból származó nehéz meromiozinnak (heasy meromyosin – HMM) a formin fragmentumokat kötött aktin filamentumokra gyakorolt hatását vizsgáltuk hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET), valamint anizotrópia lecsengés módszerek segítségével. Eredményeink szerint a dimereket alkotó formin (mDia1-FH2+linker) fragmentumoknak az aktin filamentumok flexibilitására gyakorolt hatását a HMM molekulák bekötődése jelentősen csökkenti. Korábban már bemutattuk (Ujfalusi és mtsai, 2009), hogy egy másik aktin-kötő fehérje, a tropomiozin is képes hasonló hatás létrehozására, ezért megállapíthatjuk, hogy ezek az aktin-kötő fehérjék fontos szerepet tölthetnek be az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságainak szabályozásában.



Toxinok hatása az inorganikus foszfát felszabadulására az aktin filamentumok képződésekor

Vig Andrea, Kupi Tünde, Hild Gábor és Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet
(H-7624 Pécs, Szigeti u. 12.)

Az eukarióta sejtekben nagy mennyiségben előforduló aktin fiziológiás körülmények között monomer (G-aktin) vagy polimer (F-aktin) formában fordulhat elő, melyeket a polimerizáció folyamata köt össze. Először az ATP-t kötő monomerek kapcsolódnak össze magokká, majd a kialakult magokhoz további ATP-t kötő monomerek kapcsolódnak és alakítanak ki növekvő filamentumokat. A monomerek asszociációja után az ATP hidrolizál $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ -vé, majd az inorganikus foszfát felszabadul. A foszfát felszabadulás sebességi állandója $0,006 \text{ s}^{-1}$, ami egy lassabb folyamat az ATP hidrolízisnél ($0,02 \text{ s}^{-1}$).

A Phalloidin a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) mérge, ami képes odakötődni az aktin filamentumhoz, stabilizálva azt.

A Jasplakinolide a Jaspis johnstoni tengeri szivacs mérge is kötődik az aktin filamentumhoz.

Kutatásunk célja volt megvizsgálni annak lehetőségét, hogy az említett toxinok befolyásolják-e az aktin filamentumokról történő inorganikus foszfát leválásának sebességét. Abszorpciós fotometria és egy enzimrendszer segítségével kísértük nyomon az aktin polimerizációját követő foszfát felszabadulás sebességét és a felszabaduló foszfát mennyiségét. Eredményeink szerint mindkét mérge jelentős mértékben blokkolja az inorganikus foszfát felszabadulását.



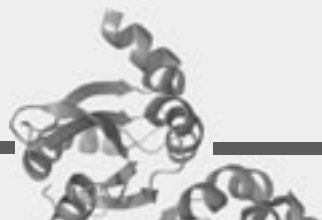
Voszka István¹, Corradi Gábor², Heinz-Jürgen Steinhoff³, Csík Gabriella¹

¹*Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest*

²*MTA Szilárdtestfizikai és Optikai Kutatóintézet, Budapest*

³*Fachbereich Physik, Universität Osnabrück*

A fotodinamikus reakció során keletkező reaktív oxigéngyökök hatótávolsága igen rövid, ezért fontos a fényérzékenyítők helyének ismerete a sejten belül. Egy, vagy két kationos csoportot tartalmazó porfirin származékok semleges vagy negatív töltésű liposzómákkal való kölcsönhatását vizsgáltuk ESR-rel, a zsírsavlánc különböző helyein spinjelző csoportot tartalmazó lipidek segítségével. Az ESR jel paramétereinek változását a porfirinkoncentráció és a hőmérséklet függvényében megvilágítás nélkül vizsgálva jelentősebb hatást a 12-es szénatomon jelzett zsírsavnál észleltünk, nagyobb mértékben az aszimmetrikus porfirin származék esetében. Megvilágítást alkalmazva porfirin jelenlétében az ESR jel intenzitása minden esetben csökkent, de a hatás kifejezettebb volt a szimmetrikus származék esetében. A lecsengési időállandó különböző pozíciójú spinjelzők alkalmazásakor eltérő volt. Az eredményekből arra következtettünk, hogy az aszimmetrikus származék a fejcsoportok közelében, míg a szimmetrikus mélyebben helyezkedik el. Oxigénmentes környezet mindkét származéknál csökkentette, de nem szüntette meg a hatást. Ez azt jelzi, hogy mindkét típusú fotokémiai reakció részt vesz a hatás létrehozásában.

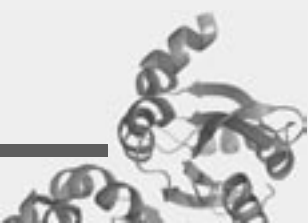


Monte Carlo simulation of 2D FRET systems

A. Forgács, L. Bene

Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen, Hungary
forgacsmeister@gmail.com, bene@dote.hu

The aim of the work is to find simple approximating practical formulas describing the dependence of the FRET efficiency on the concentrations of the donor and acceptor in different geometries: random distributions, and non-random distributions e.g. fractals, quasi-periodic, repeated receptor motifs of given order of donor-acceptor stoichiometries. The work is motivated by a need for the structural interpretation of the FRET efficiency values measured in the steady state or time-domain at different donor-acceptor stoichiometries. The approximating formulas are obtained by fitting of simulated FRET efficiency v.s. donor and acceptor concentration curves. The FRET efficiencies were determined in two ways: (1) Either from simulated fluorescence decays of the donor elicited by pulsed excitations, lifetime-based FRET efficiency, E_{τ} , or (2) from the steady state donor intensities elicited in the limit of infinitely long excitation pulses, quantum efficiency-based FRET efficiency, E_{η} . The quantities E_{τ} , E_{η} and the deviation $E_{\tau} - E_{\eta}$ are analysed on the effects of the geometry and stoichiometry of the FRET system. Issues such as the effects of excitation light intensity (saturation), energy migration (homo-FRET) between donors before hetero-transfer, and the memory effect of excitation pulse duration are also discussed.

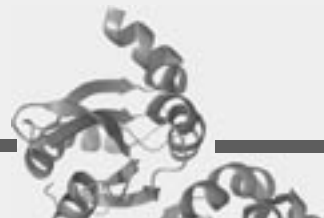


Single-laser polarization fluorescence resonance energy transfer (polFRET)

A. Forgács, L. Bene

*Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen, Hungary
forgacsmeister@gmail.com, bene@dote.hu*

A new steady state method for the simultaneous detection of rotational mobility and proximity of cell surface receptors is presented based on the measurement of polarized fluorescence intensity components of the donor and acceptor. In addition to the FRET efficiency and the donor and acceptor concentrations, the method makes feasible also the determination of the rotational characteristics and the associated fraction of the donors (FRET-fraction). The method is illustrated with flow cytometric measurements on donor-acceptor systems comprised of fluorescently stained mAbs to the MHCI/II cell surface receptors. Acceptor anisotropy proved to be more sensitive than the donor anisotropy in sensing FRET. After determining the rotational constants of the donors by fitting of FRET-resolved Perrin-plots, the associated fraction of the MHCI and MHCII were determined. Sensitivity on intermolecular separation and rotational dynamics was tested by monitoring hypo-osmotic shock-induced reorganizations of receptor clusters. The reduction in FRET-efficiency and increase in rotational correlation time report on a loosening of receptor clusters and an accompanying membrane stiffening. The method can find useful applications also in fluorescence microscopes capable of dual-anisotropy detection.



A titin PEVK domén konformációs dinamikája

*Huber Tamás^{1,3}, Fülöp Lívია², Grama László¹, Penke Botond²,
Kellermayer Miklós S.Z.³*

¹Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet.

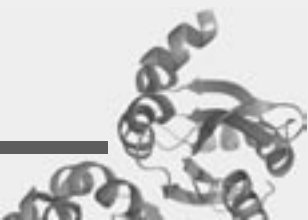
²Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet.

³Semmelweis Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet.

A titin óriás izomfehérje PEVK doménje egy feltehetően random polimerlánc, amely a molekula fiziológias nyújthatóságáért felelős. A PEVK domén szerkezeti dinamikája, konformációja és kölcsönhatásai azonban még nem pontosan ismertek.

Munkánkban a PEVK szerkezeti dinamikáját tanulmányoztuk a PEVK szakaszból kiválasztott, 11 illetve 21 aminosav hosszúságú szintetikus peptidek fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések segítségével. A FRET hatásfok mérésével a peptidek átlagos vég-vég távolságát határoztuk meg különböző kísérleti körülmények között. A vég-vég távolság a statisztikus polimerlánc fontos paramétere.

A peptidek vég-vég távolságának kontúrhosszal való skálázódása eltért a tisztán statisztikus polimerláncok esetén jósolt viselkedéstől, ami arra utal, hogy a vizsgált PEVK fragmentumok nem teljesen random polimerláncok. A szerkezeti dinamika részletesebb feltárása érdekében mértük a hőmérséklet, az ionerősség, és a kémiai denaturánsok FRET hatásfokra gyakorolt hatását. Feltételezzük, hogy a PEVK domén szerkezetét elektrosztatikus kölcsönhatások stabilizálják, amelyek egyúttal rugalmasságának hangolását is lehetővé teszik.



Kupi Tünde, Nyitrai Miklós és Belágyi József

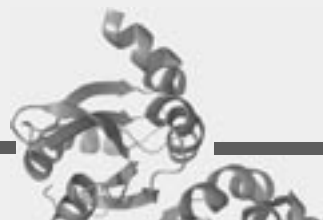
Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Biofizikai Intézet (7624 Pécs, Szigeti u.12.)

A formin fehérjecsalád tagjai citoszeleton szabályozó fehérjék, melyek alapvető szerepet játszanak az aktin filamentumok nukleációjában és az aktin monomerek további asszociációjában. A formin homológia 2 (FH2) domén egy körülbelül 400 aminosavból álló fehérje, melynek szerkezete a legtöbb formin izoformánál nagyfokú konzervativitást mutat. Az FH2 domén az aktin filamentumok szakállas végéhez kötődik, védelmet nyújtva a sapkaféhrjékkel szemben.

Az emlős mDia1 formin FH2 doménjéhez maleimide spinjelölőt (MSL) kapcsoltunk, lehetővé téve a fehérje rotációs dinamikájának és aktinnal való kölcsönhatásának EPR spektroszkópiás vizsgálatát.

A szobahőmérsékleten felvett EPR spektrumok két komponens szuperpozíciójaként értelmezhetők. A lassabb mozgáshoz tartozó komponens rotációs korrelációs ideje 21 ns, ami aktin hozzáadásával 25 ns-ra nő. A gyorsabb mozgás rotációs korrelációs ideje körülbelül 3,5 ns.

A különböző hőmérsékleten felvett EPR spektrumok hiperfinom csatolási állandója ($2A'_{zz}$) a hőmérséklet függvényében egy határozott töréspontot mutat mind az MSL-formin, mind pedig az akto-formin komplex esetében. A 40 °C körüli töréspont egy konformációs változás következményeként értelmezhető. A spektrális változások lehetséges magyarázata a formin FH2 dimerek disszociációja, akár aktinhoz kötött állapotban is.



A beta1 integrin – EGF receptor kölcsönhatás szerepe glioblasztoma sejtek sugárrezisztenciájában

*Lajtos Tamás¹, Petrás Miklós¹, Pintye Éva², Szöllősi János¹, Vereb György¹
Debreceni Egyetem OEC ¹Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, és ²Sugarterápiás
Tanszék*

Az tirozinkináz aktivitású epidermális növekedési faktor receptor (EGFR, ErbB1) amplifikációja megfigyelhető a magas (IV.) grádusú glioblasztómák kialakulása során, és korrelációt mutat azok sugárrezisztenciájával, mellyel érdekes módon a 7. kromoszóma többlet is korrelál - az EGFR génje pedig a 7p-n található. Méréseink szerint a mikrosejt fúzióval létrehozott, többlet 7. kromoszómát tartalmazó U251 glioblasztóma sejtek a többlettel, és az általa megnövelt EGFR expresszióval arányos sugárrezisztenciát mutatnak, és fokozott mértékben fejezik ki a beta1 integrint is, noha az nem ezen a lókuszon található. Jelen kísérleteinkben ezért azt vizsgáltuk, hogy az U251 sejtekbe önállóan bevitt EGFR gén milyen hatással van az beta1 integrin expresszióra, az EGFR-integrin kölcsönhatásra, és a sejtek sugárérzékenységre.

Az U251 NCI anyasejtvonalból elektroporációs transzfektálással, és többszöri áramlási citométeres dúsitással olyan sejtvonalakat hoztunk létre, melyek a többlet EGFR-t magas (E1H) és alacsony (E1L) szinten expresszálják. Áramlási citometriával vizsgáltuk az EGFR és beta1 integrin expresszió időbeli alakulását, és megállapítottuk, hogy az E1H populáció a sejtválogatást követően egy passzálás után már kettéválik, és az E1L-nek megfelelő expressziójú alpopuláció jelenik meg, melynek aránya folyamatosan nő. A többlet EGFR ugyanakkor többlet beta1 integrin kifejeződést okoz, mely időben stabil.

Az új klónok az anyasejtvonalhoz képest az EGFR expresszió mértékével arányos, fokozott kolóniaképző képességet, és megnövekedett sugárrezisztenciát mutattak. A széruméheztetés után EGF hatására létrejött, Western blottal mért Akt foszforiláció szintén az EGFR kifejeződés mértékével párhuzamosan nőtt.

Érdekes módon az áramlási citométeres FRET mérések arra utaltak, hogy az EGFR dimerizáció az expresszió növekedésével párhuzamosan csökken; ugyanakkor az EGFR-integrin kölcsönhatás fokozódik. Kétoldalú mikroszkópos FRET mérések igazolták, hogy a beta1 integrin megjelenése az EGFR molekulákat elvonja az EGFR dimerekből, és az integrinnel való kölcsönhatásokra helyezi át a hangsúlyt, melynek következménye lehet a PI3K/Akt szignálút erősödése, a fokozott sejttúlélés, és sugárrezisztencia. Ezt a hipotézist munkacsoportunk klinikai glioblasztóma mintákon végzett mérései igazolni látszanak.



A TRAIL receptorok cisplatin kezelésre lipid raft függő módon aktiválódnak

Szőőr Árpád¹, Karel Souček², Alois Kozubík², Szöllösi János¹, Vereb György¹

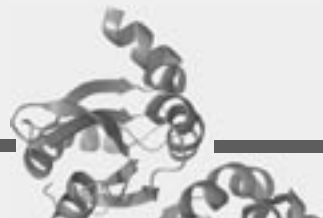
¹Debreceni Egyetem OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

²Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno

A TNF családba tartozó TRAIL két receptorán (DR4 és DR5) keresztül képes a sejtek apoptózisához vezető jelátviteli útvonalakat generálni, ill. rákellenes szerekekkel együttműködve tömeges sejthalált előidézni.

Jelen kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a TRAIL-re reagáló terápiarezsztens prosztata és colon sejtvonalon (PC3, HCT-116) a cisplatin (cDDP) kezelés és az ezzel kombinált TRAIL ligandstimulálás hogyan befolyásolja a DR4 és DR5 receptorok expressziós szintjét és azok kolokalizációját a membrán GM1 gazdag lipid doménjeivel. A receptorokat indirekt immunfluoreszcens jelöléssel, a GM1-et cholera toxin B alegységgel jelöltük. A konfokális optikai szeletekben a kolokalizációt és membrán expressziót saját fejlesztésű programmal értékeltük. Megállapítottuk, hogy a cDDP kezelés ill. a rövid időtartamú (5-20 perces) TRAIL stimulálás fokozta a receptorok expresszióját és azok raft lokalizációját mindkét vizsgált sejtvonalon, és ez fokozott kaspáz aktivitással és sejtpusztulással járt együtt. Western-blot analízis alapján az össz TRAIL receptor mennyisége is nőtt. Egy órás ligandstimulálást követően a receptorok internalizációdtak, azok raft lokalizációja az alapszint alá csökkent. Mind a cisplatin kezelés, mind a TRAIL ligandstimulálás hatása kifejezettebb volt a DR5 receptorokon.

Összegezve, a TRAIL – a terápiában még nem alkalmazott citokin - és a cisplatin kölcsönhatásaként egymást potenciózó hatás lép fel, mely fokozza a sejthalálhoz vezető TRAIL receptorok expresszióját és azok denzitását a lipid raftokban. Eredményeink új stratégiát jelenthetnek az anti-tumor terápiában.



Pertuzumab, trastuzumab, cetuximab és kombinációik alkalmazhatósága erbb2 pozitív emlőtumrok kezelésére: in vitro hatások sejtvonalakon

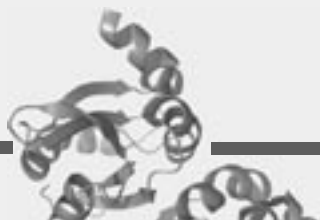
Tóth Gábor, Szöllösi János, Vereb György

Debreceni Egyetem OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A pertuzumab olyan tumor terápiában alkalmazott ErbB2 célpontú humanizált monoklonális antitest, mely az ErbB2 dimerizációs hurkához kötődve annak heterodimerizációját gátolja, míg a trastuzumab az ErbB2 leszabályozását fokozza. Munkacsoportunk korábbi kísérletei szerint a trastuzumabra in vitro rezisztens JIMT1 emlőtumor sejteket immunhiányos egerekbe oltva, azokban a terápiás antitest Fc részén keresztül kifejtett ADCC képes a tumornövekedést megakadályozni. Az ADCC-közvetített hatások in vivo elkülönítésére tehát szükséges F(ab)₂ kezeléseket végezni, melyhez az F(ab)₂ hatások in vitro jellemzése elengedhetetlen. Mások megfigyelései szerint több EGFR (ErbB1) ellenes monoklonális antitest kombinációja in vitro fokozhatja a proliferációgátlás hatékonyságát, azonban e megfigyelés általánosíthatósága még nem ismert. Mindezek alapján in vivo kombinációs kezelések megalapozásához a trastuzumab és a pertuzumab, valamint az EGFR ellenes cetuximab, és F(ab)₂ fragmentumaik három - ErbB2-t és EGFR-et kifejező - emlőtumor vonalra in vitro kifejtett hatását vizsgáltuk. A proliferációt MTT alapú teszttel, az ErbB expressziót áramlási citometriával, az ErbB és Akt foszforilációt Western blotton mértük. Az EGFR-ErbB2 heterodimerizációt mikroszkópos fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer mérésekkel jellemeztük. Egyedi kezelések esetén az irodalomból ismert eredményeket kaptuk: a BT474 kifejezetten, az SKBR3 kevésbé, míg a JIMT1 egyáltalán nem volt érzékeny trastuzumabra. A pertuzumab hasonló arányban hatott a három sejt proliferációjára, de a trastuzumabnál kevésbé. Egyik sejt sem volt érzékeny cetuximabra. Az F(ab)₂ fragmentumok in vitro az egész antiteshez hasonló proliferáció gátlást okoztak. A kombinációs kezelések során jelentősebb potencírozó hatást egyik sejtvonal esetén sem tapasztaltunk. A BT474 esetében a trastuzumab és a pertuzumab additív hatást fejtett ki, míg SKBR3 esetén kifejezett antagonizmust észleltünk köztük, mely leginkább kis dózisu pertuzumab esetén nyilvánult meg. Az ErbB foszforilációs mintázatokból kiemelhető megfigyelés, hogy a pertuzumab F(ab)₂ jobban csökkenti az ErbB2 expresszióját, mint az egész antitest. Ezzel párhuzamosan az EGFR, ErbB2 és Akt foszforilációt is hatékonyabban csökkentette a pertuzumab F(ab)₂. Az Akt foszforiláció csökkenését fokozott apoptózis kísérte. Ezzel párhuzamosan a mikroszkópos FRET mérés-



sek alapján azt is látható volt, hogy a F(ab)₂ fragmentum az egész antitestnél is hatékonyabban csökkenti az EGFR-ErbB₂ molekuláris interakciót, tehát a csökkent Akt foszforiláció és növekedett apoptózis hátterében feltehetőleg a kedvezőbb sztérikus feltételek miatt hatékonyabb EGFR-ErbB₂ heterodimerizáció-gátlás állhat. Kísérleteink alapján megállapítható, hogy (i) az általunk készített F(ab)₂ fragmentumok in vivo rendszerben az in vitro hatás emulációjára alkalmasak; (ii) a többféle antitesttel együttesen létrehozható hiperkeresztkötés és következményes fokozott proliferáció gátlás nem általánosítható, és (iii) pertuzumab esetén a F(ab)₂ sztérikus okok miatt jobban megbontja az EGFR-ErbB₂ heterodimert, mint az egész antitest, azonban ennek alacsony EGFR expressziónál nincs kifejezett in vitro proliferációs következménye.



A bakteriorodopszin koncentrációfüggő diszperziójának mérése a közeli infravörös tartományon

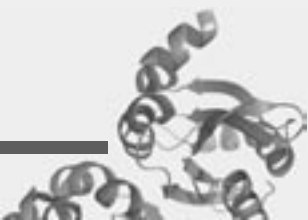
Heiner Zsuzsanna^{1,2}, Szalay Gergely², Osvay Károly²

¹ MTA SZBK, Biofizikai Intézet (6701 Szeged, Pf. 521.)

² SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (6701 Szeged, Pf. 406.)

A bakteriorodopszin (bR), a *Halobacterium salinarum* nevű baktérium membránfehérjeje, amely az elmúlt 30 év számos biológiai és biofizikai kutatásának egyik legjelentősebb molekulája. A nagyfokú érdeklődést az keltette fel, hogy ez a fehérje fény hatására energiát termel a baktérium számára, a klorofill alapú fotoszintézishez képest lényegesen egyszerűbb módon. E funkciója során a bR-ben fényindukált törésmutató-változás lép fel. Ez a jelenség számos fotonikai felhasználási lehetőséget kínál, többek között az integrált optikában (tisztán optikai elven működő kapcsoló), az adattárolásban (polarizációs hologramok) és a nemlineáris optikában (másodharmonikus illetve THz-hullám keltés). Másrészt több publikációban javasolták a fehérje fotoelektromos tulajdonságainak felhasználását is. Annak ellenére, hogy számtalan helyen használják a bR-t, diszperziójára vonatkozó pontos mérési adatok az irodalomban nem állnak rendelkezésre. Vizsgálataink célja tehát a bR diszperziójának meghatározása volt.

Munkánk során térben és spektrálisan bontott interferometriával meghatároztuk a bR koncentrációfüggő fázistolását, majd diszperzióját ($dn(\lambda)/d\lambda$) a 780-880 nm közötti hullámhossztartományon, ahol normális diszperziót mutat, és ahol a legtöbb femtoszekundumos lézer működik. Eredményeink a törésmutató fenomenológiai leírásából számolt diszperziós értékekkel jó egyezést mutatnak.



Murvai Ünige¹, Kolsofszki Mátyás¹, Karsai Árpád¹, Soós Katalin², Penke Botond² és Kellermayer Miklós³

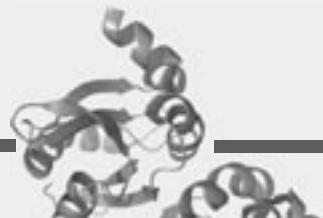
¹Pécsi Tudományegyetem ÁOK Biofizikai Intézet

²Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézet

³Semmelweis Egyetem ÁOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Az amiloid béta (A β) fibrillumok az Alzheimer-kór kialakulásának hátterében álló, A β peptidekből felépülő extracelluláris depozitumok. Túl az Alzheimer-kórban betöltött szerepükön, különleges fizikai-kémiai és önszervező tulajdonságaiknak köszönhetően az A β -fibrillumok nanotechnológiai és nanoelektronikai alkalmazási lehetőségei is felmerültek.

Kísérleteinkben a A β ₂₅₋₃ peptidből csillám felületen kialakuló nanovezeték hálózatok tulajdonságait vizsgáltuk atomerő mikroszkóppal, különböző kísérleti körülmények között. Az A β ₂₅₋₃₅ a béta peptid toxikus és fibrillumképző fragmentuma. A peptidből szabályos trigonális orientációjú fibrilláris hálózat alakul ki csillám felszínén. A peptidok csillámhoz kötődését és a fibrillumok hosszanti növekedését a kálium ionok kompetitív gátolják. A kálium- illetve a peptid koncentráció változtatásával a kialakuló nanovezeték hálózat fő paraméterei (felszíni lefedettség, vezetékek közti távolság) szabályozhatóvá válnak. Hőmérséklet-függő méréseink szerint az amiloid hálózat a vizsgált hőmérséklet-tartományon belül (30-70 °C) megtartja orientációját. 45°C-on azonban olyan effektusok lépnek fel, melyek az A β ₂₅₋₃₅ fibrillumok szerkezetét és belső kölcsönhatásait megváltoztatják. Paradox módon a fibrillumok mechanikai szétzippázásához szükséges erők megnöttek a hőmérséklet növelésével. Feltehetően a konformációváltozás hatására egyéb (pl. hidrofób) kölcsönhatások is kialakultak, amelyek a szerkezet stabilizálásához vezetnek. Mivel az amiloid hálózat ideális model béta-lemezek szerkezeti tanulmányozására, megvizsgáltuk az LPFFD béta-lemz-romboló (beta-sheet-breaker, BSB) peptid hatását az A β ₂₅₋₃₅ fibrillumok növekedési kinetikájára, morfológiai és mechanikai tulajdonságaira. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy bár az LPFFD nem specifikus az A β ₂₋₃₅ peptidre, mégis képes fellazítani a protofilamentumok közötti kölcsönhatásokat. Eredményeink megalapozzák annak lehetőségét, hogy A β peptid variánsokból kontrollálható módon felépülő, orientált, és kémiaiilag hozzáférhető nanovezeték hálózatokat dedikált nanotechnológiai, nanoelektronikai és nanomedicinai feladatokra adaptáljunk.

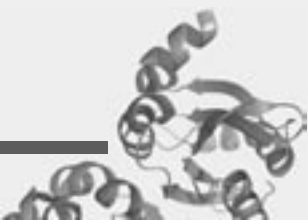


Optikai szálra integrált hullámvezetők készítése fotopolimerizációval és ezek alkalmazása lézercsipeszként

Valkai Sándor, Ormos Pál, Oroszi László

MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézete (6726 Szeged, Temesvári körút 62.)

Kidolgoztunk egy egyszerű eljárást, mellyel hengszerű optikai hullámvezető építhető egymódusú optikai szálak végére. A módszer lényege, hogy az optikai szálát egy speciális edénybe merítjük, mely olyan fényérzékeny folyadékot tartalmaz, amelyet az optikai szálból kilépő fény polimerizál. Megmutattuk, hogy a fotopolimerizációs eljárással készített hullámvezetőből kilépő fény alkalmas optikai csapdázásra, un. „fiber trap” elrendezésben. Annak ellenére, hogy az így létrehozott eszköz jóval kisebb fizikai méretekkel rendelkezik, csapdázási paraméterei megközelítik a hagyományos, hasonló rendszerű lézercsipeszekéit. A bemutatott rendszer lehetséges gyakorlati alkalmazásaira javaslatot teszünk.



“Easy and fast approach for real-time label free array-based biomolecular interaction analysis by Surface Plasmon Resonance imaging”

Dr. Chiraz Frydman

HORIBA Jobin Yvon SAS, a HORIBA Scientific Company

The development of the biophysics, considering the field of life sciences, is promising especially to increase the progress for Health care (diagnostic, analysis and treatment), the control of the environment, and the analysis in pharmaceutical and cosmetic research, quality control in agri-food ...

For the last two decades, the Surface Plasmon Resonance imaging (SPRI) technology is demonstrated as a powerful tool for the bio-molecular interactions investigations and analysis.

This technology is a label-free high sensitivity detection method, using a micro-array biochip format to rapidly monitor multiplex kinetic interactions in real time.

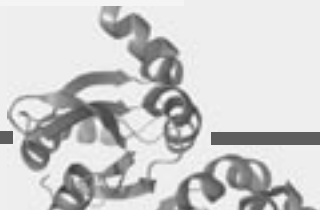
SPRI (Surface Plasmon Resonance imaging) allows:

- Rapid quantification and monitoring of biomolecular interactions in the laboratory.
- The study for a series of label-free binding in multiplex, enabling simultaneous measurements of all reactions to be observed on a biochip surface throughout the entire analysis.

In a single experiment different parameters can be studied and compared: association rate, dissociation rate, affinity constant, surface coverage (pg/mm², pmol/mm²...)... In multiplex array format, these parameters can be studied for all surfaces (more than 100) grafted on the biochip.

The combination of SPRI and MS is considered as an ideal tool for bio-molecular identification as well as a functional and structural complementary analysis within the fields of proteomics, drug-discovery, diagnostic, bio-security using multiplexed approach.

Applications range from the monitoring of DNA:DNA, protein:DNA, protein:ligand or peptide:ligand interactions in the fields of drug discovery process, early diagnosis, biosecurity, therapeutic antibodies, etc.





1. A Pécsi Akadémiai Bizottság székháza (Jurisics Miklós utca 44.)
2. PTE Hunyor Vendégház (Jurisics Miklós utca 16.)
3. A PTE Pollack Mihály Műszaki Kar Damjanich Kollégiuma (Damjanich út 30.)
4. Pécsi Tudományegyetem ÁOK (Szigeti út 12.)
5. Vasútállomás (Indóház tér 1.)
6. Távolsági buszpályaudvar (Nagy Lajos király útja 20.)