

**Szakmai zárójelentés a „Jelátviteli kompartmentek és proteolízis az immunválasz, valamint az immun- és idegrendszer közötti kommunikáció szabályozásában” c. OTKA TS 044711 projektről**

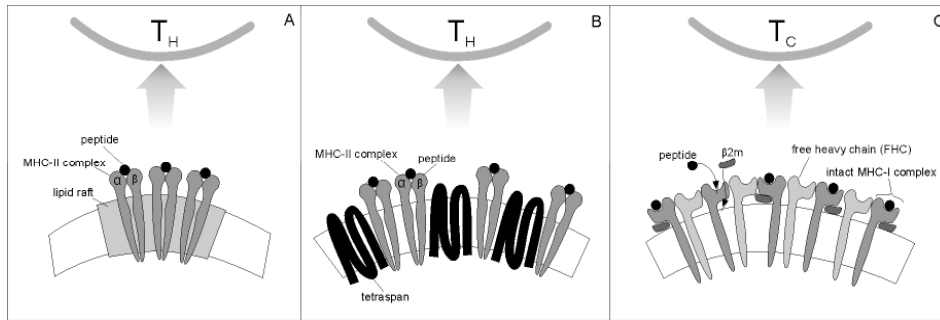
A projekt megvalósítása során a tudományos műhely tagjai *interdiszciplináris megközelítést* alkalmazva a következő tudományos kérdések vizsgálatát tűzték ki célul: *i.) a B és T limfociták antigén-specifikus aktivációjának szabályozása, különös tekintettel az autoimmunbetegségekkel való kapcsolatokra; a sejtaktiváció és sejthalál egyensúlya, mint az immun-homeosztázist kritikus befolyásoló tényező; ii.) a komplement rendszer eddig ismeretlen szabályozó szerepe az allergiás reakciókban, különböző autoimmun és autoimmun eredetű neurodegeneratív kórképekben, iii.) Az immunreakciók és az idegrendszeri funkciók kapcsolata: a két rendszer kommunikációja gyulladásozó reakciók során illetve steroid hormonokon keresztül; egyes immun- és idegrendszeri funkciók proteolitikus mechanizmusok útján történő szabályozása.*

Jelen pályázat támogatásával, többek között, sikerült megoldani, hogy a projekt több témakörében a konfokális celluláris képalkotás több variánsa (pl. „live cell”, kinetikai, morfológiai, kolokalizációs, FRET-képalkotás) megvalósuljon, a pályázat támogatásával beszerzett többcsatornás lézerpasztázó fluoreszcens konfokális mikroszkóp (OLYMPUS FV500) révén. Ez a beruházás igen magas teljesítmény-hatékonyságot mutatott: a BS, MS és PhD képzésünk területén egyaránt jelentős színvonalemelkedést eredményezett, és jelentősen kiszélesítette alap és alkalmazott kutatások lehetőségeit.

A projekten dolgozó **13 minősített kutató** mellett a kutatásban összesen **18 PhD hallgató** is részt vett. A projekt eredményeiből az elmúlt 3 évben **6-an PhD fokozatot szereztek**, és további **7 PhD disszertáció** kerül hamarosan beadásra. A projekten dolgozó kutatók/doktoranduszok interdiszciplináris összefogása több új metodikát, szabadalmaztatható anyagot és eljárást is eredményezett (*ld. 1,3,4,18,25,40 közlemények*). Az eredményekből eddig **38 referált tudományos közlemény** (összesített impaktfaktor: 147.93) és **3 könyvrészlet** jelent meg, s további 4 közlemény áll közlés alatt. A még nem publikált 15 citálható 2005-ös absztrakt azt is jelzi továbbá, hogy a megkezdett kutatási irányvonalak a közeljövőben perspektívikusan folytathatók, azaz a tudományos iskola, műhely folyamatosan hatékonyan működik.

**1. Membrán-kompartimentalizáció és receptor “cross-talk” szerepe az antigén-indukált limfocita-aktivációban és annak szabályozásában.**

► Kimutattuk, hogy az antigénbemutató sejtek (APC) felszínén a patogén eredetű peptidek bemutatását végző I. és II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulák különféle membrán mikro-kompartimentekben lokalizáltak, mely egy **kritikus szabályozó mechanizmus az antigen prezentáció hatékonysága, illetve a T-limfocita aktivációs küszöb meghatározása szempontjából (2,4,10,13)**. Megmutattuk továbbá, hogy az APC plazmamembrán **koleszterinben és szfingolipidekben gazdag lipid raft mikrodoménjei a T<sub>H</sub>-sejtekkel alkotott immunológiai szinapszisok (IS) képződését és stabilitását is alapvetően befolyásolják, az APC sejt felszíni kostimulátor denzitása, és citoszkeletonjának integritása mellett (2,13)**. A membránfehérjék molekuláris kapcsolatainak vizsgálatára optimalizáltuk a pályázat támogatásával beszerzett konfokális lézerpasztázó mikroszkópon a FRET technikát (3).

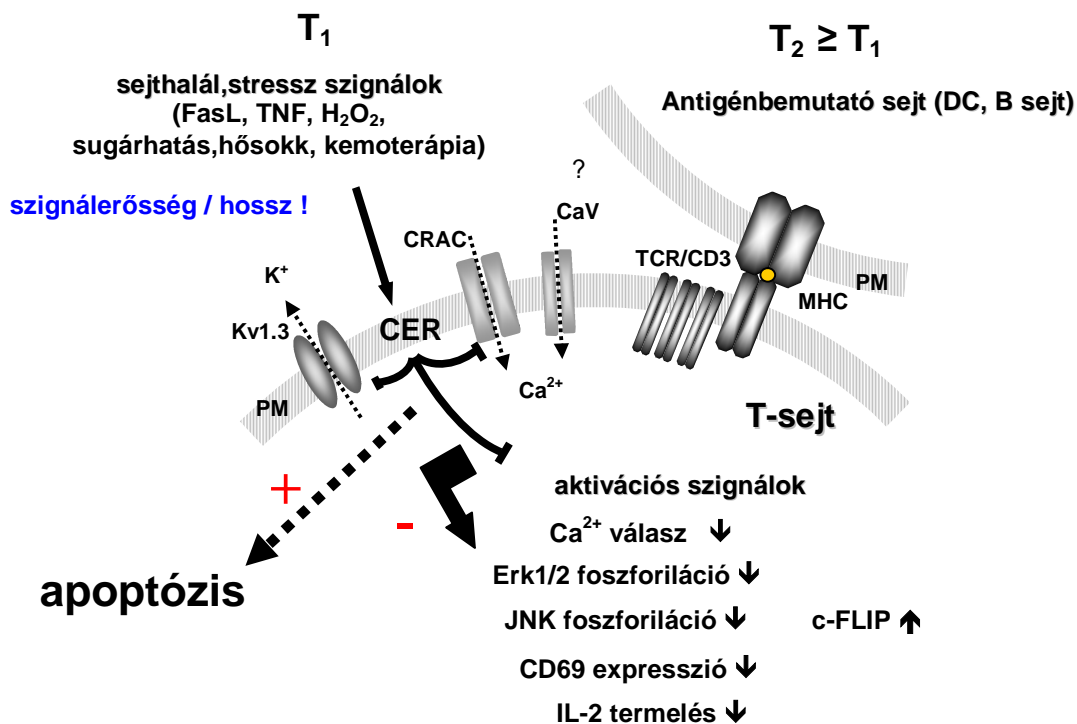


1. ábra: A helper és citotoxikus T limfociták aktivációs küszöbét szabályozó APC plazmamembrán mikrodomének (modell)

Új módszert dolgoztunk ki a membrán mikrodoménekben (lipid raftok) lokalizált fehérjék azonosítására, amely a differenciált detergens rezisztencia (FCDR) elvén alapul (4), s melyet azóta mi és mások is sikeresen alkalmaztunk B és T limfociták, tumorsejtek és hízósejtek membrán receptorai (pl. komplement-, B sejt-, Fc-receptorok, multi-drog transzporter fehérjék, stb.) kompartmentalizációjának vizsgálatára.

Különböző mikroszkópiás képkalkotási módszerek (CLSM, differenciál-polarizációs pásztázó konfokális mikroszkópia) segítségével karakterizáltuk a lipid raftok egyes fizikai tulajdonságait és azok biológiai modulálhatóságát (A9). Előállítottunk és klónoztunk két új IgG3 izotípusú anti-koleszterin ellenanyagot, melyek ígéretesnek tűnnek a membrán mikrodomén kutatásban, valamint a T-limfocita aktiváció illetve HIV-fertőzés raft mikrodoménekben keresztüli modulálásában egyaránt (18, A9).

► Sikerült kísérletesen kimutatnunk, hogy a T-sejteket érő ceramid szignálok, melyeket a sejthalál receptorok ligandkötése, illetve egyes stressz-ingerek képesek kiváltani, csak egy kritikus küszöb felett (*erős/hosszú ingerek*) váltanak ki apoptotikus sejthalált, jó egyezésben egy „rendszer-biológiai” megközelítésen alapuló elméleti modellel (*Bentele et al, 2004. J.Cell.Biol. 166: 839-851*). Újabb eredményeink szerint a szubapoptotikus (gyenge/rövid) ceramid jelek a T-sejteket ezt követően érő, antigén (APC-MHC) által kiváltott aktivációs jelátvitelt negatívan szabályozzák, gátolják, melyet a korai illetve késői T-sejt aktivációs lépések szintjén egyaránt kimutattunk (2. ábra). A szub-apoptotikus ceramid szignálok ezen hatása dominánsan membrán-proximálisan (membránpotenciálváltozás,  $K^+$ - és  $Ca^{2+}$ -ioncsatornák gátlása, foszforilációs-defoszforilációs egyensúly szintjén) érvényesül, mely a sejthalál- és antigén-receptorok közötti „cross-talk” egy eddig nem ismert megjelenési formája, ami az aktuálisan rendelkezésre álló T-sejt készletet is jelentősen befolyásolhatja (12-14, A8). Ezen eredmények egy, a szfingolipid-ciklus befolyásolásán alapuló immunmodulációs eljárás alapjait is képezhetik a továbbiakban. Érdekes módon a ceramidok hatása differenciált az egyes immunociták aktivációja során: különböző érettségi, illetve differenciáltsági stádiumban levő B- és T-limfociták, vagy hízó sejtek igen nagy eltéréseket mutatnak a ceramid-érzékenység terén (14), mely jelenség hátterének tisztázása további vizsgálatokat igényel. Mivel a legerősebb rezisztenciát főként a Burkitt limfóma sejtek mutatták, így a vizsgálatok fontosak lehetnek egyes limfoid tumorok molekuláris hátterének megértéséhez is.



2. ábra: A ceramid-szignálok integrációja (párbeszéd) az egyidejű vagy a sejtet kissé később érő antigén-specifikus T-sejt aktivációs szignálokkal szabályozza a T-sejtek sorsát és a T-sejt készletet.

► Egyre több limfocita funkcióban vált ismertté az utóbbi időben az aktin citoskeleton, a miktrotubulusok és a hozzájuk funkcionálisan kapcsolt motorfehérjék (*miozin* és *dinein*) szerepe. Ilyen funkciók pl. az immunválaszban kritikus sejtmotilitás, az antigénspecifikus aktiváció során a receptor-csoportosulás (clustering), a szignáloszómák kialakulása, a szignálmolekulákat csoportosító lipid raftokat tartalmazó membránvezikulák intracelluláris transzportja, vagy az apoptózis néhány fontos részjelensége (pl. "membrán-hólyagosodás"). Tekintettel arra, hogy a motorfehérje működés és annak regulációja potenciális immunmodulációs célpont lehet, célkitűzéseink között szerepelt a motorfehérje működés molekuláris mechanizmusainak és szabályozásának vizsgálata, illetve limfocita-specifikus szabályozó fehérjék azonosítása.

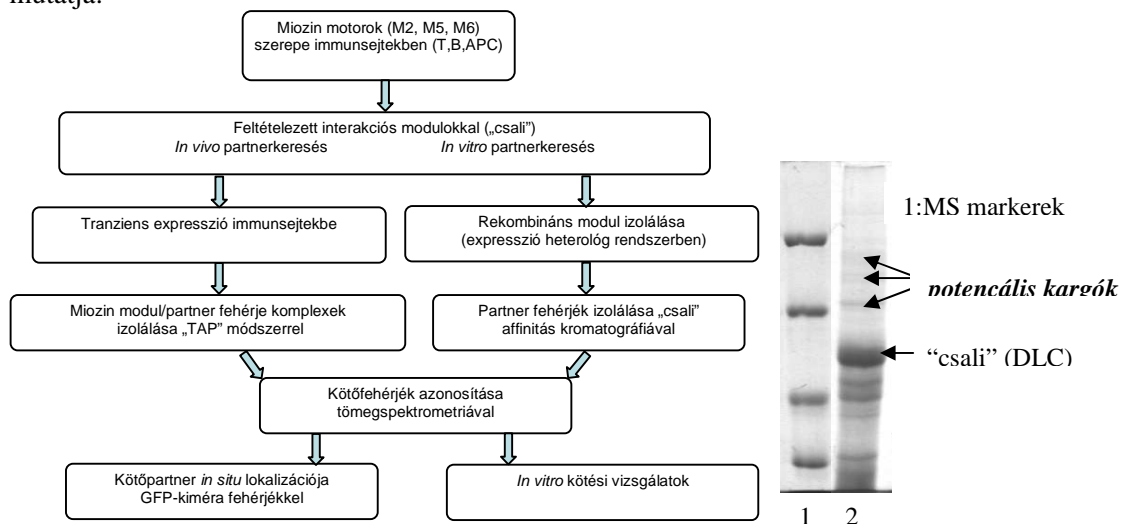
A motorfehérjék közül a miozin II, V, VI vizsgálata kapcsán történt jelentősebb előrelépés a projekt során. **A miozin II szabályozása (amelyet immunsejtekben számos szignalizációs útvonal befolyásol) vagy az egyik könnyű lánc alegység foszforilációján keresztül (több kináz enzim által), vagy az „EF-kéz” motívumot tartalmazó kalmodulin-szerű könnyű láncok Ca<sup>2+</sup>-kötésével valósul meg.** A miozin II izoformák közül van olyan, amelyet a Ca<sup>2+</sup> aktivál, és van olyan, amit gátol. Ennek az érdekes szabályozási kettősségnek a molekuláris hátterét tártuk fel egy Ca<sup>2+</sup>-gátolt miozin II regulációs domén szerkezeti vizsgálatával (19, A4).

A miozin V izoformák kargókötését vizsgálva, sikerült azonosítanunk az ún. dinein könnyű lánc (DLC) kötőhelyét a mediális és disztális *coiled-coil* régió között, egy szerkezet nélküli doménben. Megállapítottuk, hogy a kötőhely kialakításában egy 3 aminosavat kódoló alternatív exon (exon B) esszenciális szerepet tölt be. Az exon B-t tartalmazó forma ideg- és immun-sejteken expresszálódik. NMR vizsgálatokkal és molekuláris dokkolással kimutattuk,

hogy a DLC-hez a miozin egy kb. 8 aminosavból álló szakasza kötődik. Spektroszkópai és egyéb biokémiai vizsgálatok alapján a **DLC kötés jelentősen hozzájárul a miozin rúd stabilitásához ill. dimerizációjához (20,22, A1-A3)**. A DLC és a miozin Va intracelluláris kötődését Jurkat T-sejtekben és NE4C neuroektodermális sejtekben GFP- és RFP-fúziós fehérjék kolokalizációja alapján bizonyítottuk. A DLC kargóköti szerepének további vizsgálata, többek-között az immunsejtekben is jelentős szerepet betöltő „BH3-only” pro-apoptotikus Bim fehérjével folyamatban van. A DLC további kötőpartnereinek keresése „pull-down” és TAP-technikákkal is folyamatban van. A Jurkat sejtekből izolált, eddig még nem azonosított potenciális partnerek között lehetnek T-sejt specifikus fehérjék is (ld. 3.ábra). A sejtaktiváció során a miozin V globuláris farokdoménjéhez (ez a fő kargóköti domén) kötődő molekulák „halászata” jelenleg is folyik.

A miozin VI motorral kapcsolatban kulcskérdés, hogy miként tud dimert képezni, mivel csak ilyen formában tud processzív szállítási funkciót betölteni. A farok doménben található erősen töltött aminosav régióról kimutattuk, hogy stabil egyszálú  $\alpha$ -hélixet (SAH) alkot, amely fontos szerepe tölthet be a molekula effektor funkcióiban. Érdekes módon a SAH domént számos más fehérjében is azonosítottuk *in silico* módszerekkel (A5).

A miozin II immunsejt-specifikus, a regulációs doménhez kötődő partnereit TAP-technikával próbáltuk azonosítani. Jurkat T-sejtekbe bejuttatva a „csali”-konstrukciót, az eddigi kísérletek még nem vezettek új fehérje azonosításához. Az eddig csak részeredményeket hozó „partnerhalászat” sémáját és egy jelenleg MS analízis alatt álló SDS-gélképet az alábbi (3.) ábra mutatja:



**3.ábra: A miozin motorfehérjék partner- keresése „csali-konstrukciók” segítségével immunsejtekben (stratégiai séma).**

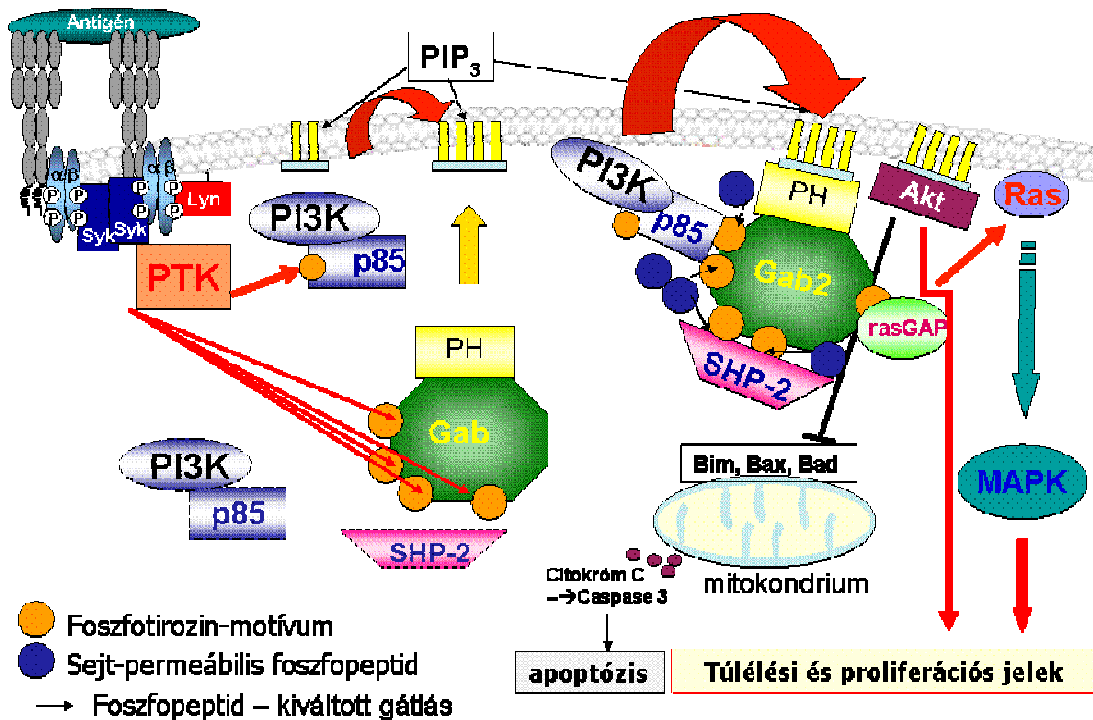
► A B sejt receptor komplexnek (BCR) a B sejtek érésében betöltött szerepét vizsgálva tisztáztuk azt a mechanizmust, ami az éretlen B sejtek antigénfelismerését követően a sejtek apoptózisához vezet. **Megállapítottuk, hogy éretlen B sejtekben az antigén felismerés által elindított jelpályák csak rövid életidejű Erk és Akt foszforilációt/aktivációt tesznek lehetővé, ami nem elégséges a sejtek túléléséhez, így a sejtek apoptózissal elpusztulnak.** Ez az Akt foszforiláció hiányában, mitokondrium membrán depolarizációt követő kaszpáz 3 aktiválódás eredményeként következik be (8). Feltételezésünk szerint **ez a mechanizmus szerepet játszik az éretlen B sejtek negatív szelekciójában, az autoreaktív sejtek elpusztításában.**

A B sejteket az Fc $\gamma$  receptorokon (Fc $\gamma$ RIIB)-on keresztül negatívan szabályozó konstrukciók tervezéséhez, éppúgy mint az ellenanyag terápiák fejlesztéséhez elengedhetetlen az Fc $\gamma$ RIIB-hez kötődő, legrövidebb, funkcionálisan aktív IgG szekvencia ismerete. **Fc $\gamma$ RIIB kötőhely feltérképezésére irányultó vizsgálataink során azonosítottunk olyan IgG Fc peptideket, amelyek Fc $\gamma$ RII által kiváltott jelek közvetítésére alkalmasak mind B sejtekben, mind makrofágokban, és így funkcionálisan is reprezentálják az IgG Fc $\gamma$ RIIB-hez kötődő részét (7).**

A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) és az Fc $\gamma$ RIIB közötti kapcsolat vizsgálata során igazoltuk, hogy aktív MAP kinázok kötődnek a B sejt receptorokon (BCR) keresztül stimulált sejtekben az Fc $\gamma$ RIIB-n levő dokkoló helyhez, és foszforilálják magát a receptort és/vagy más, ahhoz kötődő fehérjét. **A MAPK dokkoló helyeként jellemzett motívum szerinjének foszforilációja -valószínűleg az aktivációs küszöb emelésével- gátolja a BCR által indukált tirozin foszforilációt, s így részt vesz a B sejtek aktiválásának finomszabályozásában (5).**

Vizsgáltuk a Grb2 asszociált kötőfehérje, Gab1 és a Gab2 B sejtekben betöltött szerepét. A Gab1 időszakos kiütése az Erk foszforilációjának jelentős mértékű, és az Akt foszforiláció részleges csökkenésével járt. Ez arra mutat, hogy a Gab1 adaptor B sejtekben feltehetőleg az SHP-2 közvetítésével, elsősorban az Erk aktiválódását szabályozza. Ugyanakkor a Gab2 adaptor foszforilációja előfeltétele az SHP-2 és a PI3-kináz kötődésének, és eredményeink azt mutatják, hogy a **Gab2 foszforilációja, valamint kölcsönhatása az SHP-2 foszfatázzal és a PI3-kinázzal kulcsfontosságú az Erk és az Akt hosszan kitartott aktiválásához, így valószínűleg a B sejtek életbentartásához (4. ábra) (15,17,A6,A7).**

Igazoltuk, hogy **a sejtbe bejuttatható foszfopeptidok alkalmasak a B sejt receptoron keresztül kiváltott jelek pozitív és negatív szabályozására** a foszforilált aminosavat tartalmazó motívumtól, a dózistól és a kezelési időtől függő módon. Optimalizáltuk a sejtpermeabilis hordozópeptidet, és jellemeztük a Gab1 foszfortirozint tartalmazó motívumainak megfelelő, sejtpermeabilis foszfopeptid konjugátumok B sejt aktivációra gyakorolt hatását (16). Vizsgálataink alapul szolgálnak peptid alapú inhibitorok fejlesztéséhez. Megpróbáltuk azokat a mechanizmusokat összegezni, amelyek szerepet játszhatnak a B sejtek jelátvitel szintjén néhány fontos autoimmun betegség (RA, SLE, stb.) kialakulásában. Újabban a gátló funkcióval rendelkező receptoroknak, illetve a gátlás kialakulásáért felelős jelátviteli molekuláknak, számos más tényező mellett, egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásában/ fenntartásában, és ezek a molekulák, mint új gyógyszercélpontok is számításba jöhetnek (6). Munkahipotézisünkre alapozva elkezdődtek a célzott, jelátvitelre ható immunmodulánsok kifejlesztésére irányuló kísérletek is.



4. ábra: A B sejt aktivációs és sejthalál szignálok: az adaptor fehérjék mint szabályozási „csomópontok” és terápiás célpontok?

► További vizsgálataink a limfociták antigénreceptorai és az immunkomplexek kötésére képes receptorai – Fc- és komplement-receptorok – közötti kölcsönhatások megismerésére, azok molekuláris modellezésére, valamint élettani és kóros körülmények között megfigyelhető változásai leírására irányultak.

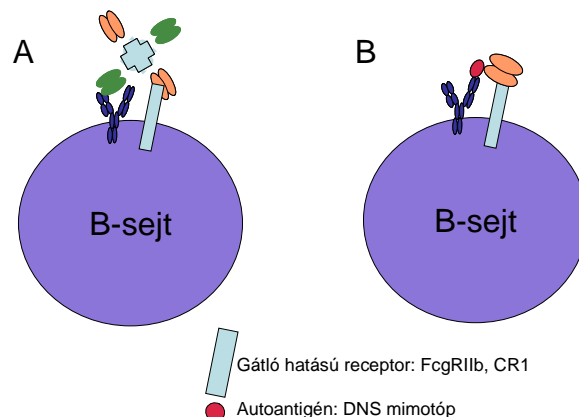
A komplementfragmentumok kötésére képes receptorok gátló és aktiváló hatást is kifejthetnek a receptor minőségétől, sejtfelszíni denzitásától, a ligandumok számától függően. Megvizsgáltuk az egér CR1/CR2 komplementreceptorok hatásait a B-sejtek túlélésére és szaporodására. Egér lép eredetű tranzicionális B-sejteket használva megfigyeltük, hogy a **CR1/2-t felismerő egyláncú ellenanyagaink képesek az indukált és a spontán apoptózist is gátolni**. Normál egér lép B-sejteken az egyláncú ellenanyagaink egymagukban és BCR-rel keresztkötvé is képesek proliferációt kiváltani. Ez a hatás kevésbé kifejezett CR2 hiányos egerekben, alátámasztva a CR1/2 szerepét. Az endotoxin szennyeződés szerepét endotoxin hiposzenzitív C3H/HeJ egértörzs használatával zártuk ki. **A pro-proliferatív hatás befolyásolható FcR-ok keresztkötvésével: az FcR bevonása gátolta a CR általt mediált hatásokat (30)**. Érdekes módon az emberi CR1 molekula B sejteken gátolja a BCR-en keresztüli jelátvitelt. A jelenség pontosabb megismeréséhez rekombináns ellenanyag fragmentumot állítottunk elő, ami lehetővé teszi a BCR és a CR1 receptor keresztkötvését kiváltó komplexek kialakítását.

A 2-es típusú komplementreceptor nagy mennyiségben B-limfocitákon és folliculáris dendritikus sejteken fejeződik ki. Emberben kimutatták azonban timocitákon és aktivált T-sejt szubpopulációkon is. Egyes irodalmi adatok melyek alapján, köztük saját korábbi eredményeink szerint, egérben is megjelenhet T-sejteken a receptor. Megvizsgáltuk lép, perifériás és mezenterialis nyirokcsomókban a CR2 expressziót RT-PCR, áramlási citometria és fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Eredményeink igazolják, hogy CD4 pozitív T-sejteken megjelenik a

receptor, azonban RNS szinten nem sikerült egyértelműen igazolni az expressziót. Így valószínűsíthető, hogy a **CR2 fehérje az intercelluláris kapcsolatok során, ún. adaptív transzfer révén kerülhet a T-sejtekre. Az immunkomplekkötő receptorok tehát feltételezhetően a B-sejtek és a dendritikus sejtek (28) mellett a T-sejtek aktivációs folyamataiba is beleszólhatnak.** A sejtek közötti kapcsolatokat a magukra a sejtekre „lerakódó” komplement fragmentumok is befolyásolják: az antigénprezentáló sejtekhez kapcsolódó C3b, iC3b és C3d javítja az antigénprezentáció hatásfokát. A folyamat jellemzéséhez olyan **egér C3 specifikus monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő (9), amelyek képesek a komplementdepozíciót elősegíteni vagy gátolni.** A reagensek segítségével tervezzük vizsgálni a komplement aktiváció befolyását az immunválaszra in vivo.

Az általunk korábban előállított CR1/2 specifikus egyláncú ellenanyag fragmentum (7G6scFv) szervezetben való eloszlását és életidejét áramlási citometria és immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján a konstrukció minden CR1/2 receptort hordozó sejtípussal képes reagálni intraperitoneális oltást követően (1). Ennek ellenére az oltást követően az IgM osztályra korlátozódó humorális immunválasz alakul ki, ami nem volt befolyásolható antigén-specifikus T-sejtek bevitelével sem. Emlékeztető oltáshoz használva a konstrukciót, az antigén specifikus IgG1 ellenanyag titer csökkenését figyeltük meg. Eredményeink arra utalnak, hogy a **CR1/2 receptor önmagában nem elegendő molekuláris célpont célzott oltóanyagok fejlesztéséhez (29).**

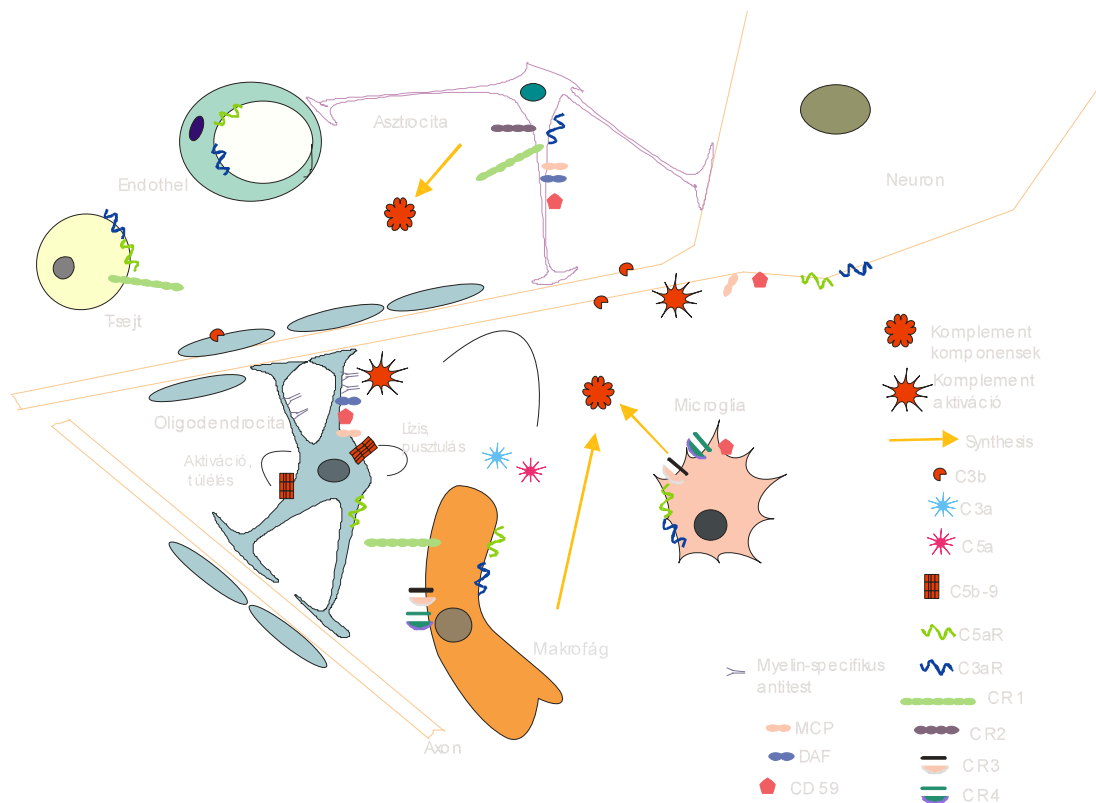
Az egyláncú ellenanyag fragmentumok (scFv) rekombináns úton előállítható, az antigénkötés szempontjából monovalens molekulák, kémiai módosításokra viszonylag érzékenyek. Az Fc rész hiánya ideálissá teszi azokat receptor kölcsönhatások vizsgálatára, mivel nem kell FcR hatásokkal számolnunk. Hátrányuk lehet viszont bizonyos alkalmazásoknál a monovalens antigénkötő képesség. **A valencia növelésének, valamint egy egyszerű és gyors konjugációs rendszer kialakításának érdekében egy biotin ligáz (BirA) szubsztrát peptidet építettünk az scFv molekula végére (A12).** E peptid lehetővé teszi egy darab biotin molekula irányított kovalens beépítését a konstrukciónkba. A monobiotinilált scFv sztreptavidinnel vegyítve tetramer formákat hoz létre, amit SDS-PAGE segítségével igazoltunk. Fluorokrómmal konjugált sztreptavidint használva specifikus, FcR-hoz nem kötődő reagens állítható elő. A monobiotinilált fragmentumok ekvimoláris mennyiségben keverve SA-nel bispecifikus komplexeket képeznek; ezekkel pedig modellezni lehet receptor keresztkötéseket. **A CR1/2 és az FcRII specifikus scFv molekulákból is előállítottuk az enzimatikusan biotinilálható formákat,** és ellenőriztük ezek kötődését a célreceptorokhoz. A konstrukciók (ld. 5. ábra) *in vitro* összehasonlítását követően egyenként, illetve kombinációban fogjuk jellemezni immunogenitásukat.



5. ábra: Egyláncú ellenanyagok felhasználása receptor keresztkötések modellezésére. A: Sztreptavidin és monobiotinilált scFv molekulák felhasználásával bispecifikus komplexek állíthatók elő. B: DNS mimotópot hordozó, gátló receptort felismerő scFv molekula felhasználása autoreaktív B-sejtek gátlására

A receptorok kölcsönhatásainak autoimmun folyamatokra kifejtett hatásait több szempontból is megvizsgáltuk. A komplementaktiváció és a komplementreceptorok immunválaszban betöltött szerepére utal, hogy **a C3 szint csökkentésével befolyásolható volt a sclerosis multiplex egérmodelljében (EAE) a megbetegedés incidenciája**. Az egerek kezelése kobra mérreg kivonattal, ami átmeneti komplementhiányt idéz elő, gátolta a betegség kialakulását (A11). A komplementreceptorok kölcsönhatásai számos sejten kifejthetik hatásukat sclerosis multiplexben (27), többek között az antigén specifikus limfociták aktiválódásának elősegítésén keresztül is (ld. 6. ábra).

A szisztémás lupus erithematosus (SLE) betegség egyik diagnosztikus és aktivitását jelző markere a DNS-t felismerő ellenanyagok jelenléte a szérumban. DNS ellenes antitestek termelődését kísérletes körülmények között nem csak DNS-sel hanem úgynevezett mimotóp peptidokkal is ki lehet váltani – e peptidok feltehetően valamilyen szerkezeti és töltéseloszlásbeli hasonlóságot mutatnak a DNS-el. Hipotézisünk szerint egy mimotóp peptid (BCR ligandum) és egy receptor ellenes antitest (ko-receptor ligandum) konjugátum segítségével modulálható a DNS-specifikus B-sejtek aktivitása. **Létrehoztunk egy mimotóp peptid (DWEYSLWLSN) egyláncú ellenanyag fúziós fehérjét**, hipotézisünk vizsgálatára. A DWEYS-scFv konstrukcióban az ellenanyag megtartotta funkcióját, azaz felismeri a BCR ko-receptort; a peptid felismerhető DNS-ellenes antitestek által (A13). További vizsgálatainkban tervezzük kideríteni, képes-e a konstrukció a DNS ellenes antitestek képződését befolyásolni.



**6. ábra Komplementreceptorok szerepe a sclerosis multiplex kialakulásában (potenciális komplement célpontok modellje)**

Az immunkomplekkötő receptorok expresszióját és működését SLE-ben szenvedő betegekben is megvizsgáltuk. Eredményeink alátámasztották azt a korábbi megfigyelést,



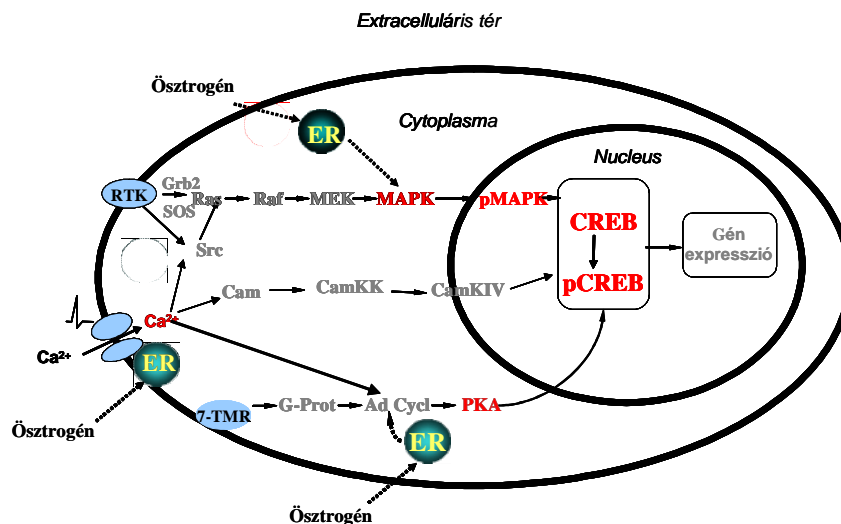
míserint a CR1 expressziója csökken eritrocitákon és B-sejteken is. Érdekes módon a receptor ennek ellenére megtartotta gátló hatását a BCR-en keresztüli stimulációra, ami terápiás beavatkozási lehetőséget is biztosíthat a jövőben. **A komplementreceptorok összetett szerepet töltenek be tehát az autoimmun folyamatok szabályozásában (26), s ezen szerep tisztázása segíthet terápiás stratégiák tervezésében is.**

**A C3a komplement faktor N és C terminális régióit összekötő hurok régió (56-64 aminosavak) származtatott szintetikus peptidekről kimutattuk, hogy a hízósejtek Fc $\epsilon$ RI receptor komplexének  $\beta$  alegységeihez kötődve jelentősen képesek gátolni a hízósejtek antigén (allergén)-keresztükötés által kiváltott jeltávitelét és degranulációs választ (23,25).** Ezen eredmények alapján egy struktúra-optimalizáción alapuló peptid-hatásmechanizmus kutatás indult be az **allergiás reakciók hatékony és antigén-receptorra irányuló (azaz megelőző hatású), terápiás célokra is alkalmazható gátlószerének kifejlesztésére.**

## **2. Az immun- és idegrendszer kommunikációja és működésük proteolitikus szabályozása**

► Az immunválasz során a proinflammatorikus citokinek jelentősen befolyásolhatják a neuronok elektromos aktivitását a központi idegrendszerben, így növelik az EEG szinkronizációt és a lassú hullámú alvás megjelenési valószínűségét. Ennek a talamokortikális rendszeren keresztül megvalósuló gátló hatásnak feltehetőleg nemcsak az alvás szabályozásában van szerepe, hanem az epilepszia genezisében is, azonban ennek pontos mechanizmusa nem ismert. Kísérleteink ezért arra irányultak, hogy meghatározzuk **hogyan hat egy LPS indukálta immunválasz az epilepszia genezisre *in vivo*.** Vizsgálatainkat genetikusan epilepsziás WAG/Rij patkánytörzsön végeztük, amelyekben a epilepsziás aktivitások (spike-wave discharge, SWD) spontán megjelennek. A WAG/Rij patkánytörzsön az LPS injekciót követő proinflammatorikus citokin termelés időbeli változása a normál patkányokhoz hasonló lefutást mutatott, mely azt jelzi, hogy a megváltozott genetikai háttér nem érintette a proinflammatorikus immunválaszt. Eredményeink megmutatták, hogy az LPS adása dózis függő módon emeli az SWD-k számát, mely nem mutat korrelációt a testhőmérséklet változásával. Indometacin alkalmazása csökkentette az LPS indukálta SWD növekedést, mely azt jelzi, hogy az LPS hatásában a cyclooxygenáz-1,2 enzimen keresztül a prosztaglandin E2 is részt vesz. Az excitatorikus glutamát hatásokat követő NMDA receptor agonista az AP5 adása növelte az LPS-nek az SWD-kre gyakorolt hatását, amely az LPS-nek és az AP5-nek az SWD kialakításában közös molekuláris folyamataira utal (37). **Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a gyulladásos mechanizmusok jelentős hatást gyakorolnak a thalamokortikális elektromos aktivitásra és felhívják a figyelmet arra, hogy a bakteriális infekciók módosíthatják az epilepsziás folyamatokat a központi idegrendszerben.**

Az immunválaszban felszabaduló citokinek nemcsak a neuronok elektromos aktivitását változtathatják meg, hanem jelentős hatást gyakorolnak az intraneuronális jelátvivő utakra is a központi idegrendszerben. A gonádokból felszabaduló ösztrogén pl. jelentős hatást gyakorol az immunválaszra és lipofil tulajdonságai révén bejut a központi idegrendszerbe, ahol feltehetőleg a citokinek idegsejtekre gyakorolt hatását is módosíthatja. Munkahipotézisünk szerint ebben az ösztrogén indukálta modulációban az intracelluláris jelátvivő útvonalak jelentős szerepet töltenek be. Ezért kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az ösztrogén milyen hatást gyakorol az idegsejtek citokin-szenzitív jelátviteli útvonalaira. **Kimutattuk, hogy az ösztrogén jelentősen fokozza a MAPK- és a CREB-foszforilációt a központi idegrendszer különböző területein (hippocampus, medialis preoptikus area, ventromedialis hypothalamus) ösztrogén receptorokon keresztül *in vivo* (38,39,42).**



7. ábra: Az ösztrogén hatása citokin szenzitív jelátvivő útvonalakon a neuronokban, a központi idegrendszerben. ER: ösztrogén receptor, RTK: tirozín kináz receptor, 7-TMR: 7 transzmembrán régiót tartalmazó G proteinhez kapcsolt receptor

Érdekes módon az ösztrogén indukálta CREB és MAPK foszforiláció szexdimorfizmust mutatott (38,42). További kísérleteinkben egysejt szinten vizsgáltuk ezeket a folyamatokat, az ösztrogén szekréciót reguláló principális sejteken a *gonadotropin releasing hormon (GnRH) neuronokon* és memória kialakításában jelentős szerepet betöltő *előagyi kolinerg idegsejteken* (38). Elektrofiziológiai kísérleteinkben kimutattuk, hogy az ösztrogén jelentősen módosítja a membrán potenciált, mely MAPK majd CREB foszforilációhoz vezet. Az ösztrogén indukálta CREB foszforilációt a GnRH neuronokban az ER $\beta$ , míg a kolinerg neurokban az ER $\alpha$  receptorok közvetítik (38). Az általunk előállított GnRH neurospecifikus genetikai Ca<sup>2+</sup> szenzorral rendelkező egerekben kimutattuk, hogy az ösztrogén növeli a GnRH neuronokban a Ca<sup>2+</sup> spike-ok előfordulási gyakoriságát a sejtbe való Ca<sup>2+</sup> beáramláson keresztül, mely jelentősen hozzájárulhat a CREB foszforilációjához. Kimutattuk azt is, hogy az ösztrogén indukálta PKA és MAPK aktiváció jelentős szerepet játszik az ösztrogén CREB-re gyakorolt hatásában a kolinerg (38) és GnRH neurokban *in vivo*. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az ösztrogén jelentősen módosítja a citokin szenzitív másodlagos hírvivő molekulák működését az idegsejtekben, mely arra utal, hogy az ösztrogén és általában a steroidok a jelátvivő útvonalakon keresztül befolyásolhatja az immunrendszer hatását a központi idegrendszerben (42,43). (ld. 7. összefoglaló ábra)

► Az immun- és idegrendszer proteolitikus szabályozását illetően vizsgáltuk, hogy a tripszin-szerű illetve metalloproteáz aktivitások milyen összefüggést mutatnak egyes immun- és idegrendszeri funkciókkal, mint pl. B-sejtes immunválasz, autoimmun eredetű nurodegeneratív illetve egyes fényérzékelési folyamatok.

Kimutattuk, hogy az aktivált B limfociták membránjában (vagy annak közelében) egy 85-90 kD molekulatömegű proteáz aktivitással bíró fehérje expresszálódik, mely nyugvó B limfocitákban nincs jelen. A fehérje affinitás kromatográfiás tisztítását követő karakterizálása (szubsztrát-specifitás és gátlási profil) azt mutatta, hogy az aktiválódás során (a sejtek által szekretált formában is) megjelenő proteáz nem metalloproteáz, hanem egy tripszin-szerű szerin-proteáz enzimfehérje. Az enzim többek között felelős az Fc $\gamma$ -receptorok hasításáért, ill. szolubilis formáik megjelenéséért, mely fontos szabályozója lehet a B-limfocita

**funkciónak és a humorális immunválasznak (31).** (A fehérje tömegspekrometriás karakterizálása folyamatban van.)

Kimutattuk a számos neurodegeneratív betegségben érintett fehérje, a mielin bázikus protein (MBP) proteolitikus (kalpain, humán tripszin-1 és -4 proteázokkal kapott) hasítási termékeinek analízise során, hogy a szervezetben is kimutatható **MBP-specifikus autoantitestek által felismert epitópban is megtalálható hasítási helyet a humán tripszin-4 magas specificitással képes hasítani.** Eredményeink szerint a humán tripszin-4 egy olyan proteáz, mely fontos szerepet játszhat a Sclerosis Multiplex patomechanizmusában (33,36).

Tekintettel ezen felismerés jelentőségére, lépéseket tettünk a tripszin-szerű proteázok és potenciális inhibitoraik közötti kölcsönhatások szerkezeti hátterének feltárására (32,34,35), azzal a távlati céllal, hogy szerkezet-alapú tervezéssel hatékony inhibitorot fejlesszünk a tripszin-szerű proteázok, köztük a humán tripszin-4 számára, esetleges későbbi terápiás célú alkalmazásokra.

Az MMP9 indukálható metalloproteináz fontos szerepet játszik a szöveti szerkezet átalakításában. Felmerült azonban, hogy az enzim nem kizárólag a degradációs folyamatokban vesz részt. Fény-indukált retinopátia modellben vizsgáltuk az MMP9 indukcióját és megállapítottuk, hogy **reverzibilis retinopátiában és fényadaptációban is van MMP9 aktiváció (41, A14).** Megállapítottuk, hogy specifikus MMP9 inhibitor adása lassítja a szem regenerációját (A14). Az agyban, sejtpusztulást nem okozó AP4 epilepszia modellben is hasonló eredményeket kaptunk. LPS hatására az MMP9 indukálódik és az indukció szintje magasabb egy genetikusan epilepsziás WAGRij patkánytörzsben (A15). Mindezek az eredmények alátámasztják, hogy **celluláris stresszben illetve gyulladásos folyamatokban az MMP9 lehet citoprotektív és regeneratív hatású.**

A projekt során **mikrodisszekción, emésztésen és HPLC analízisen alapuló módszert dolgoztunk ki idegszövetek nukleozid szintjének meghatározására humán és állatmintákon (40).** Ez az eljárás, amellett hogy alkalmas a neuron- ill. limfocita-funkciók, ill. sejthalál szabályozására purinerg receptorokon keresztül képes nukleozidok mérésére, elvileg bármely más kismolekulasúlyú mediátor vagy szabályozó molekulák szintjének mérésére is alkalmazható.

► A sejthalál folyamatok egyre több típusát és diverz mechanizmusait írták le az utóbbi évek során. Mivel az immun- illetve az idegrendszer normális működése szempontjából egyaránt kritikus a programozott sejthalál folyamata és annak szabályozása, jelen projekt keretében az egyik talán legkevésbé ismert sejthalál forma, az autofágia klasszikus apoptózishoz való viszonyával és mechanizmusával is foglalkoztunk. **Drosophila modellrendszeren kimutattuk, hogy a programozott autofágia egyik fontos szabályozója a PI3K jelválya (44).** Azt is megmutattuk, hogy az autofágia indukciója „upstream” vagy parallel történik az apoptozóma kialakulásához képest a sejthalál folyamata során (45).

Összefoglalva, számos új receptor-kölcsönhatás/párbeszéd elemet sikerült azonosítanunk az immunrendszer működésében, és feltártunk több fontos, a limfocita effektor funkciókat illetve sejthalált szabályozó mechanizmust a lipid raftok és egyéb membrán mikro-kompartmentek, adaptor fehérjék részéről. Kimutattuk a tripszin-szerű proteáz aktivitások szabályozó szerepét a humorális immunválasz során, illetve valószínűsítettük szerepüket neurodegeneratív folyamatok (pl. Sclerosis Multiplex) során is. Sikerült kimutatnunk, hogy az immunrendszeri effektor funkciók és egyes idegrendszeri funkciók között, feltételezhetően a citokin hálózaton illetve steroid hormonokon keresztül kommunikációs útvonalak léteznek, melyek működése során jelentős egyes jelátviteli elemek szabályozó szerepe. Alapkutatási eredményeink mellett metodikai fejlesztést is sikerült megvalósítanunk (új módszerek, eljárások, diagnosztikum) és több újszerű, a jelátvitel célzásán alapuló hatóanyag-jelölt kifejlesztése is elkezdődött.

## A projekt eredményeit bemutató tudományos közlemények jegyzéke:

- [1.] Molnar E, Prechl J, Isaak A, Erdei A: Targeting with scFv: immune modulation by complement receptor specific constructs. 2003. *Journal of Molecular Recognition* 16: 318-323.
- [2.] Gombos I, Detre C, Vámosi G, Matkó J: Rafting MHC-II domains in the APC (presynaptic) plasma membrane and the thresholds for T-cell activation and immunological synapse formation. 2004. *Immunology Letters* 92:117-124.
- [3.] Vereb G, Matkó J, Szöllősi J: Cytometry of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). In: *Methods in Cell Biology* (Zbigniew Darzynkiewicz, Mario Roederer and Hans Tanke, Editors) 2004. 75:105-152.
- [4.] Gombos I, Bacsó Zs, Detre C, Nagy H, Goda K, Andrásfalvy M, Szabó G, Matkó J: Cholesterol-sensitivity of detergent resistance: A rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins. 2004. *Cytometry* 61: 117-126.
- [5.] Medgyesi D, Sárközi R, Koncz G, Arató K, Váradi Gy, Tóth GK, Sármy G: Functional consequences of a MAPK docking site on human FcγRIIb. 2004. *Immunology Letters* 92: 83-90.
- [6.] Zoualy M, Sármy G: B lymphocyte Signaling Pathways in Systemic Autoimmunity: Implications for pathogenesis and treatment. 2004. *Arthritis & Rheumatism* 50: 2730-2741.
- [7.] Medgyesi D, Uray K, Sallai K, Hudecz F, Koncz G, Abramson J, Pecht I, Sármy G, Gergely J: Functional mapping of the Fc gamma RII binding site on human IgG1 by synthetic peptides. 2004. *European Journal of Immunology* 34(4):1127-35.
- [8.] Kövesdi D, Paszty K, Enyedi A, Kiss E, Matko J, Ludanyi K, Rajnavölgyi E, Sarmay G. Antigen receptor-mediated signaling pathways in transitional immature B cells. 2004. *Cellular Signalling* 16 (8): 881-9.
- [9.] Mastellos D, Prechl J, Laszlo G, Papp K, Olah E, Argyropoulos E, Franchini S, Tudoran R, Markiewski M, Lambris JD, Erdei A: Novel monoclonal antibodies against mouse C3 interfering complement activation: description of fine specificity and applications to various immunoassays. *Molecular Immunology* 2004. 40: 1213-1221.
- [10.] Ludanyi K, Gogolak P, Rethi B, Detre C, Matko J, Rajnavölgyi, E: Fine tuning of helper T cell activation and cell death by antigen presenting cells. 2004. *Cellular Signaling* 16:939-950.
- [11.] Matkó J, Szöllősi J.: Regulatory Aspects of Membrane Microdomain (Raft) Dynamics in Live Cells: A Biophysical Approach. In: **“Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine” 2005.** (ed. M. Mattson), pp. 15-46., Humana Press, Totowa, NJ.
- [12.] Detre C, Kiss E, Varga Z, Ludányi K, Pászty K, Enyedi Á, Kövesdi D, Panyi G, Rajnavölgyi É, Matkó J: Death or survival: Membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T cells depending on signal strength and duration. 2006. *Cellular Signalling* 18: 294-306.
- [13.] Gombos I, Kiss E, Detre C, László G, Matkó J: Cholesterol and sphingolipids as lipid organizers of the immune cells' plasma membrane: Impact on the functions of MHC molecules, effector T-lymphocytes and T-cell death. 2006. *Immunology Letters* 104: 59-69.
- [14.] Kiss E, Sármy G, Matkó J: Ceramide-modulation of antigen-triggered Ca<sup>2+</sup>-signals and cell fate: diversity in the responses of various immunocytes. 2006. *Annals of New York Academy of Sciences* (accepted)
- [15.] Sármy G, Angyal A, Kertész Á, Maus M, Medgyesi D: The multiple function of Grb2 associated binder (Gab) adaptor/scaffolding protein in immune cell signalling. 2006. *Immunology Letters* 104: 76-82.
- [16.] Kertész Á, Takács B, Váradi Gy, Tóth GK, Sármy G: Design and functional activity of phosphopeptides with potential immunomodulating capacity, based on the sequence of Grb2 associated binder 1 (Gab1). 2006. *Annals of New York Academy of Sciences* (accepted)
- [17.] Angyal A, Medgyesi D, Sármy G: Grb2 associated binder 1 (Gab1) adaptor/scaffolding protein regulates Erk signal in human B cells. 2006. *Annals of New York Academy of Sciences* (accepted)
- [18.] Bíró A, Cervenák L, Balogh A, Lőrincz A, Uray K, Horváth A, Romics L, Matkó J, Füst G, László G: Novel Anti-Cholesterol Monoclonal IgG Antibodies as Probes and Potential Modulators of Membrane Raft-Dependent Immune Functions. 2006. *Journal of Lipid Research*, (közlésre elküldve)
- [19.] Debreczeni J, Farkas L, Harmat V, Hetényi Cs, Hajdú I, Závodszy P, Kohama K, Nyitrai L: Structural evidence for non-canonical binding of Ca<sup>2+</sup> to a canonical EF-hand of a conventional myosin. 2005. *Journal of Biological Chemistry* 280: 41458-41464.

- [20.] Hódi Zs, Németh A, Radnai L, Hetényi Cs, Schlett K, Bodor A, Perczel A, Nyitrai L: Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding of the tail light chain shared by dynein. 2006. *Biochemistry*, (közlésre elküldve)
- [21.] Hegyi G, Belagyi J. (2006) Intermonomer cross-linking of F-actin alters the dynamics of its interaction with H-meromyosin in the weak-binding state. *FEBS Journal* 273(9):1896-905.
- [22.] Toth J, Kovacs M, Wang F, Nyitrai L, Sellers JR. (2005) Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *Journal of Biological Chemistry* 280:30594-603.
- [23.] Erdei A, Andrásfalvy M, Péterfy H, Tóth G, Pecht I: Regulation of mast cell activation by complement derived peptides. 2004. *Immunology Letters* 92: 39-42.
- [24.] Markiewski MM, Mastellos D, Tudoran R, DeAngelis RA, Strey CW, Franchini S, Wetsel RA, Erdei A, Lambris JD : C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. 2004. *Journal of Immunology* 173:(2): 747-754.
- [25.] Andrásfalvy M, Péterfy H, Tóth G, Matkó J, Abramson J, Kerekes K, Vámosi G, Pecht I, Erdei A: The  $\beta$  subunit of the type I Fc $\epsilon$  receptor is a target for peptides inhibiting IgE-mediated secretory response of mast cells. 2005. *Journal of Immunology* 175: 2801-2806.
- [26.] Isaák A, Prechl J, Gergely J, Erdei A: The role of CR2 in autoimmunity. 2006. *Autoimmunity* (accepted, in press)
- [27.] Terényi N, Prechl J, Erdei A : The role of complement system in the pathogenesis of Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. 2006. in: **Current Topics in Complement** (Ed JD Lambris) pp. 177-188.
- [28.] Bajtay Zs, Csomor E, Sándor N, Erdei A : Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. 2006. *Immunology Letters* 104: 46-52
- [29.] Prechl J, Molnár E, Isaák A, Papp K, Balogh P, Erdei A: Peritoneally injected, murine CR1/2 targeted antigenized single-chain antibody fragments induce low affinity antibodies and no memory response. 2006. *Molecular Immunology* (közlésre elküldve)
- [30.] Molnár E, Prechl J, Papp K, Erdei A: Novel roles of CR1/2 (CD35/CD21) 2006. *Advances in Experimental Medicine & Biology* (közlésre elküldve)
- [31.] Biro A, Herincs Z, Fellinger E, Szilágyi L, Barad Zs, Gergely J, Graf L, Sarmay G: Characterization of trypsin-like serine protease of activated B cells mediating cleavage of surface proteins. 2003. *Biochimica. Biophysica Acta* 1624: 60-69.
- [32.] Fodor K, Harmat V, Hetenyi C, Kardos J, Antal J, Perczel A, Patthy A, Katona G, Graf L: Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. 2005. *Journal of Molecular Biology* 350 (1): 156-169.
- [33.] Medveczky P, Antal J, Patthy A, Kekesi K, Juhász G, Szilágyi L, Graf L: Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4. 2006. *FEBS Letters* 580(2):545-52.
- [34.] Fodor K, Harmat V, Neutze R, Gráf L, Katona G: Atomic resolution structure of a Trypsin: polypeptide inhibitor complex as a model of the catalytic Michaelis complex. 2006. *Biochemistry* (accepted, in press)
- [35.] Fodor K, Szenthe B, Medveczky P, Gráf L: The pacifastin inhibitor family: structure and specificity. 2006. *Current Protein and peptide Research* (accepted, in press)
- [36.] Tóth J, Medveczky P, Szilágyi L, Gráf L: Central nervous system serine proteases in health and disease. In: **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**, 3<sup>rd</sup> edition (Lajtha A ed.) Springer-Verlag, 2006., (in press)
- [37.] Kovács Z, Kékesi KA, Szilágyi N, Ábrahám I, Székács D, Király N, Papp E, Császár I, Szegő É, Barabás K, Péterfy H, Erdei A, Bártfai T, Juhász G: Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar albino GLAXO/RIJ/SWIJK rats. 2006. *Neuroscience* 140: 731-742.
- [38.] Szegő É, Barabás K, Balog J, Szilágyi N, Korach KS, Juhász G, Ábrahám I: Estrogen induces Estrogen Receptor  $\alpha$ -dependent cAMP Response Element-Binding protein phosphorylation via Mitogen Activated Protein Kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons. 2006. *Journal of Neuroscience* 26: 4104-4110.
- [39.] Barabás K, Szegő É, Kaszás A, Nagy GM, Juhász G, Ábrahám I: Sex differences in Oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain *in vivo*. 2006. *Journal of Neuroendocrinology* 18: 1-8.
- [40.] Kovács Zs, Kékesi KA, Bobest M, Török T, Szilágyi N, Szikra T, Szepesi Zs, Nyilas R, Dobolyi Á, Palkovits M, Juhász G: Post mortem degradation of nucleotides in the brain: Comparison of human and rat

brains for estimation of in vivo concentrations of nucleosides. 2005. *Journal of Neuroscience Methods* 148: 88-93.

[41.] Galambos R, Juhász G, Lorincz M, Szilágyi N: The human retinal functional unit. 2005. *International Journal of Psychophysiology* 57: 187-194.

[42.] Ábrahám IM, Herbison AE: Major sex differences in non-genomic estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain in vivo. 2005. *Neuroscience* 131: 945-951.

[43.] Ábrahám IM, Meerlo P, Luiten PGM: Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival. 2006. *Dose-Response*, 4: 38-54

[44.] Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Breck A, Stenmark H: Programmed autophagy in the drosophila fat body is induced by ecdysone and effected through the PI3K pathway. 2004. *Developmental Cell* 7: 179-192.

[45.] Akdemir F, Farkas R, Chen P, Juhász G, Medvedova L, Sass M, Wang L, Wang X, Chittarajan S, Gorski S, Rodriguez A, Abrams J: Autophagy occurs upstream or parralel to the apoptosome during cytolytic cell death. 2006. *Development* 133: 1457-1465.

#### **Citálható absztraktok listája (2005):**

**A1.)** Hódi Zs, Németh A, Kovács E, Hetényi Cs, Bodor A, Perczel A, Nyitray L : The dynein light chain binds to a non- coiled-coil tail domain of myosin-Va that includes an alternatively spliced exon coding for three amino acid residues. 2005. *FEBS Journal* 272 (suppl.1): 335.

**A2.)** Tóth J, Kovács M, Wang F, Nyitray L, Sellers JR : *Drosophila* myosin V: Solution kinetics and motile properties. 2005. *FEBS Journal* 272 (suppl.1): 336

**A3.)** Hódi Zs, Németh A, Hetényi Cs, Bodor A, Perczel A, Nyitray L Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding of the tail light chain shared by dynein. 2005. *J. Muscle Res. Cell Motility*. 26:73

**A4.)** Farkas L, Debreczeni J, Harmat V, Hetényi Cs, Hajdú I, Závodszy P, Kohama K, Nyitray L Ca<sup>2+</sup> inhibits the activity of a myosin II by binding to an EF-hand of a calmodulin-like light chain and altering the dynamics of the neck region. 2005. *J. Muscle Res. Cell Motility*. 26:72

**A5.)** Süveges D, Németh A, Gáspári Z, Tóth G, Nyitray L : Helical tail fragments of myosin VI exist as monomeric, highly flexible structures. 2005. *J. Muscle Res. Cell Motility*. 26:74

**A6.)** Sármay G, Kertész A, Takács B, Angyal A, Medgyesi D, Váradi G, Tóth G: The role of Grb2 associated binder 1 (Gab1) scaffolding adaptor protein on signal transduction in human B cells. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 323

**A7.)** Maus M, Kövesdi D, Medgyesi D, Sármay G: The role of Grb2 associated binder 2 (Gab2) scaffolding adaptor protein in B cell receptor signaling. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 322

**A8.)** Detre C, Kiss E, Varga Z, Ludányi K, Pászty K, Enyedi Á, Panyi G, Rajnavölgyi É, Matkó J: Dual face of ceramide: non-apoptotic Cer-stimuli modulate antigen-specific T-cell activation through blocking plasma membrane ion channels. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 193

**A9.)** Gombos I, Lőrincz A, Pomozi I, Steinbach G, Garab G, László G, Matkó J: How much do the different lipid raft markers overlap? A fluorescence imaging study on membrane organization. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 220

**A10.)** Csomor E, Erdei A, Bajtay Zs, Sándor N, Thiel S, Arlaud GJ: Immobilized C1q induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 288

**A11.)** Terényi N, Prechl J, Erdei A: MOG peptide specific antibody response in the mouse model of multiple sclerosis shows no correlation with the severity of the disease. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 293

**A12.)** Virág V, Prechl J, Erdei A: Production of tetrameric single-chain antibodies using enzymatic biotinylation. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 519

**A13.)** Szekeres Zs, Isaák A, Prechl J, Erdei A: generation of fusion protein containing DNA-like peptide and a single chain antibody. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl. 1): 529

**A14.)** Nyilas R, Szepesi Z, Papp AM, Lőrincz LM, Tóth J, Medveczky P, Szilágyi L, Juhász G: Spatio-temporal induction of matrix metalloproteases in a functionally reversible light damage of the rat eye. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl.1): 273.

**A15.)** Szepesi Z, Nyilas R, Takács E, Schaffer Gy, Szilágyi N, Juhász G: Upregulation of MMP-9 and tuning of intracellular signal elements in 4-AP-induced rat epilepsy model. 2005. *FEBS Journal*, Vol. 272 (Suppl.1): 274.

(A közleményekben a résztvevő kutatókat aláhúzással, a közreműködő PhD hallgatókat dőlt betűvel jelöltük.)