

**PhD értekezés**

**Bioinformatikai eljárások alkalmazása a molekuláris biológi-  
ában és az immunológiában**

**Dr. Nyárády Zoltán**

**PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

**PTE-ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika**

Témavezető: Prof. Dr. Németh Péter

PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

**Pécs 2005**

## Összefoglalás:

A bioinformatika az egyik legfiatalabb tudományág. Kialakulása a biostatistikai számítások és a molekulamodellek használatával több, mint fél évszázada kezdődött, ugyanakkor gyors fejlődését és önálló tudományá válását csak az elmúlt másfél évtizedben, a számítástechnika nagyarányú hardver- és szoftver-fejlesztései tették lehetővé. Napjainkra az **in silico bioinformatika** széles körben alkalmazott kutatási, kutatás-fejlesztési területté vált, mely egyenrangú partnere az *in vitro* és *in vivo* végzett kutatásoknak.

Munkám mind az adatfeldolgozásra, mind az adatbankok segítségével történő predikcióra kiterjedt. Mindkét témakör a biológiai kutatás szolgálata mellett felvetette a bioinformatikai módszerekkel kapott eredmények gyakorlati használhatóságának kérdését, ezért négy tématerületen végeztem vizsgálatokat. Az első időszakban a **DNS szekvenálást** megkönnyítő és az adatfeldolgozást **segítő szoftverek** fejlesztését tűztem ki célul. A mintafelvitelt és a mintakövetést biztonságossá tevő, ezzel a technikai hibákat csökkentő, a mérésbiztonságot növelő eszközt (SWriter program) sikerült kialakítanunk. A második témakörben kifejlesztett alkalmazások az EST **szekvenálás eredményeinek feldolgozását** és a nemzetközi adatbázisokba történő automatikus továbbítását tették lehetővé. Munkám harmadik szakaszában az **immunológiai predikciós technikák kritikai elemzését** tűztem ki célul. Elsők közt sikerült felhívunk a figyelmet arra, hogy az immunogenitást előrejelző algoritmusok (az *in silico* valószínűsített és az *in vitro* mért immunszerológiai adatok összehasonlítása kapcsán) csak megfelelő speciális adatbázisokon történő finomítás után válhatnak a napi kutatási és kutatás-fejlesztési gyakorlatban valóban nagyhatású eszközzé. A negyedik témakörben általánosan használt **biostatistikai** eljárások segítségével összeállított panel nagyszámú immunszerológiai mérési minta **multiparaméteres elemzését** tette lehetővé, olyan, új összefüggések feltárásával, melyek a klinikai prognózis megítélése szempontjából gyakorlati jelentőséggel bírnak.

Mind a négy témakörben munkám a bioinformatika aktuálisan legfontosabb irányaihoz kapcsolódott és a tudományág gyors fejlődését bizonyítja, hogy a tézisek benyújtása előtt nyolc évvel kezdődött munka egyes elemeit ma már túlhaladta a fejlődés. Ugyanakkor mind a négy tématerületen - a nemzetközi publikációinktól függetlenül is – a gyakorlati alkalmazás bizonyította a kutatási fázis eredményességét.

# Bevezetés

Az alap és alkalmazott biológiai kutatás egyik leggyorsabban fejlődő területe a molekuláris biológia. A biológiailag aktív vegyületek finomszerkezetének kutatásában a genetikai módszerek alkalmazása, a hagyományos fiziko-kémiai szerkezetvizsgálatok, valamint a biokémiai és funkcionális módszerek *együttes alkalmazása* általánossá vált napjainkra. Az immunológiai eljárásokon alapuló mikroanalitika a molekuláris felszínek térképezésében új lehetőségeket nyitott meg a monoklonális ellenanyagok felfedezését követően.

## Bioinformatika:

A **bioinformatikát** definiálhatjuk, mint a számítógépes módszerek kidolgozása és alkalmazása a biológiai információ kezelésére és elemzésére. Szélesebb körben érthetjük rajta bármilyen biológiai információ számítástechnikai eszközzel történő feldolgozását, szűkebb értelemben pedig, szekvencia adatok kezelését és elemzését. A bioinformatikai kutatások kilenc fő területre oszthatók Attwood szerint:

1. Biológiai adatbázisok létrehozása, analízisa, keresése
2. Molekulaszerkezet 3D modellezése
3. Molekulaszerkezeti és funkcionális predikció
4. Szekvencia összehasonlítás, illesztés
5. Filogenetikai számítások
6. Molekulainterakció vizsgálata
7. Génexpressziós elemzések
8. Biológiai kutatási folyamatok automatizálása
9. Biostatisztika

A biológiai adatbázisok kialakítása és a molekulamodellek megalkotása a XX. századi természettudományos kutatás, elsősorban a szerves kémia és biokémia, valamint a molekuláris biológia kirobbanó eredményeit használta fel, ugyanakkor a számítógépes adatfeldolgozás adta technikai háttér egy új dimenziót nyitott meg.

Az 1980-as években a korszerű molekuláris biológiai módszerek hatására jelentősen megnőtt az irodalomban közzétett biológiai (szekvencia) információ. Ezen adatok egy központi adatbázisban való elhelyezésének előnyeit látva egyszerre párhuzamosan több munkacsoport is elkezdte összegyűjteni a rendelkezésre álló szekvencia információt. Napjainkban több mint 500 az *Interneten* elérhető adatbázisok száma. Az adatbázisok integrálásával a keresési lehetőség és az információszerzés lehetősége jelentősen nőtt. Ma már számtalan más adatbázisokat integráló, keresztbe kapcsoló rendszer közül választhatunk.

A számtalan, új biológiai információt jelentő szekvencia-adatnak a kutatás számára való megosztását már a nyolcvanas években igényelték a kutatók. Ekkor születtek meg az első biológiai adatbázisok. Ezek a biológiai adatbázisok szekvencia, szerkezeti, immunológiai, fiziológiai információkat tartalmaznak. A biotechnológia és bioinformatika forradalmi fejlődése hatalmas adatmennyiséget eredményezett. A biológiai adatbázisokban elhelyezett szekvencia-adatok a **HUMAN GENOME PROJECT**nek és egyéb kutatási programoknak köszönhetően exponenciálisan nőnek.

Az adatok nagy része a kutatók számára szabadon elérhető a világhálón. Az adatok gyors és komplex elérhetősége, feldolgozása, összehasonlítása és értékelése a modern bioinformatikai módszerek nélkül nem lenne megoldható. A bioinformatika lehetővé teszi laboratóriumi kísérletek megtervezését, esetleges eredményeinek megbecsülését, felgyorsítva a biológiai információk

megszerzését. A laboratóriumi folyamatok automatizálása meggyorsítja a nagy mennyiségű adatot termelő (pl.: szekvenáló) projektekből nyerhető információ prezentálását, feldolgozását.

Nem elegendő és nem minden esetben lehetséges a nagy érzékenységű mérési adatok hagyományos statisztikai számolása és interpretálása. Fontossá vált a kapott adatok feldolgozására számítógépes molekulamodellek létrehozása, ezeknek a különböző biokémiai reakciókban történő elemzése, a szerkezetváltozások és biológiai kölcsönhatások szimulációja és virtuális ábrázolása. Ezen problémákkal foglalkozó új tudományt a bioinformatikát, a biotechnológia és a számítástechnika utóbbi tíz évben lezajlott rohamos fejlődése hívta életre. Az elmúlt években jelentősen nőtt a bioinformatikával foglalkozó publikációk száma, mely mára a PubMed-ben fellelhető új irodalom közel 2%-a.

A bioinformatikai és biotechnológiai módszerek jelentős fejlődése és a tervezett molekulák iránti igény általánossá válása lehetővé tette a kívánt biológiai hatásnak legjobban megfelelő, előre megtervezett molekulák széleskörű alkalmazását a biológiai kutatásban. A tervezett szerves molekulák célzott felhasználása és számítógépes szimulációja új utakat teremt az alapkutatásban és gyógyításban is. Lerövidíti, és olcsóbbá teszi a költséges laboratóriumi lépéseket.

Az immunológiai alapkutatás egyik költséges és továbbra is időigényes része a különböző mono- és poliklonális ellenanyagok előállítása. Gyakran fontos, hogy ellenanyagaink molekula specifikusak legyenek. A növekvő igények gyakran csak a molekula egy részét, esetleg speciális funkcionális csoportjának felismerését követelik meg, mely megnehezíti a kívánt ellenanyagok előállítását. Napjainkban a számítástechnika gyors fejlődése és az ellenanyagokról, ellenanyag-antigén kapcsolatokról szerzett ismereteink kiszélesedése és elmélyülése lehetővé teszi a két technológia ötvözését, és bioinformatikai módszerek bevonását az epitópok meghatározásába.

A bioinformatika módszereinek ilyen hasznosítása számos előnnyel jár. A költséges és időigényes ellenanyag előállítás jelentősen gyorsabbá, olcsóbbá válhat az erőforrás igényes peptidekkel történő immunizálás kiváltásával, miközben új perspektívák nyílnak meg. Az epitópok számítógépes tervezése lehetővé teszi a specifikus szintetikus vakcinák kifejlesztését és előállítását (pl.: diftéria, hepatitis, influenza, HIV ellenes szérumok), és gének meghatározását. Új fejezetet nyithat a tumor-terápiában és megelőzésben, speciális immunpeptidek kifejlesztésével, melyekkel immunizálva a szervezet a tumor ellen, vagy onkogének ellen immunválaszt generál.

### **Epitóp predikció:**

Az immunológiai felismerést befolyásoló molekuláris mikrokörnyezet, ezen belül az antigének alapvető fiziko-kémiai tulajdonságainak tanulmányozása napjaink immunológiai alapkutatásának egyik fontos kérdése. Az immunreaktivitást meghatározó elektrosztatikus és hidrofíl/hidrofób régiók térbeli elhelyezkedése az antigén molekula felszínén mind az immunológiai felismerésben, mind a kiváltott effektor válaszban meghatározó szerepet játszik. Egyre több adat utal fehérje és peptid antigének esetében arra, hogy az aminosav sorrendnek a töltéseloszlások meghatározásában van elsődleges szerepe. A monoklonális ellenanyag technika felfedezése teremtette meg a lehetőséget jól definiált modellvizsgálatok végzésére. A különböző, ismert biológiai aktivitással rendelkező fehérjék felszíni epitópjainak monoklonális ellenanyagokkal végzett térképezése kapcsán szerzett információk nagymértékben járultak hozzá az immunológiai felismerés mechanizmusának tisztázásához.

**Epitóp**nak, vagy antigén determinánsnak nevezzük egy protein azon meghatározott részeit, melyekhez specifikus felismerő részekkel az immunglobulinok kötődnek. Az epitópok relatív entitások, mivel komplementer paratópok szükségesek felismerésükhöz. Az epitópok ezért rendelkeznek antigén reaktivitással, képesek az immunglobulinokhoz kötődni, önmagukban is immunogenitással rendelkeznek, vagyis képesek immunválaszt kiváltani (un. anti-idiotípus immunválasz).

A fehérjék felszínét tehát felfoghatjuk, mint egymást átfedő epitópok halmazát, melyen belül megkülönböztetünk kiemelt immundomináns és kevésbé reaktív epitópokat. Az epitópok számát definiálhatjuk a fehérje ellen termelhető, egymástól különböző monoklonális antitestek számával.

Röntgen-krisztallográfiával megállapították, hogy az epitóp-paratróp kapcsolat egy kb. 20Å x 30Å területen történik a molekula felszínén. Nem valószínű, hogy ebben a három-dimenziós epitóp-

paratróp kapcsolatban elsősorban a polipeptidláncot felépítő, egymást követő aminosavak alkotta **lineáris epitópok** fordulnak elő. Valószínűbb az úgynevezett **konformációs epitópok** előfordulása.

Immunológiai szempontból, mind a lineáris mind a konformációs epitópok fontosak. Immunbiotechnológiai szempontból a lineáris epitópoknak van fontosabb szerepe egyszerűbb kezelhetőségük miatt.

Az epitóp-paratróp kapcsolatok pontos meghatározására fizikai módszereket alkalmaznak a leggyakrabban (MNR és röntgen-kristallográfia). Az egyéb módszerek (tömegspektrometria, átfedő peptid könyvtárak) csak valamilyen közelítést tesznek lehetővé. A különböző immunbiológiai kausalitások az ismerete feltétlenül szükséges, amikor epitópokat szeretnénk számítógéppel meghatározni.

A számítástechnika gyors fejlődése lehetővé tette a lineáris aminosav szekvencia ismeretében a fehérjék térbeli szerkezetének hozzávetőleges predikcióját, mely kulcsa az epitópok meghatározásának. Az eddig leírt epitóp predikciós módszerek a primer aminosav szekvencia ismeretében próbálnak a fehérje harmadlagos térbeli szerkezetére vagy egyéb attribútumára (másodlagos szerkezet, mobilitás, hidrofobicitás, hidrofilitás stb.) következtetni.

Általánosságban, minden predikciós módszer első lépéseként az ismert háromdimenziós szerkezetű fehérjék molekuláris hőmérséklet, szerkezet és mobilitás statisztikai analízisével mind a 20 aminosavhoz egy-egy értéket rendelünk relatív tulajdonságuk alapján, így egy táblázatot hozunk létre.

Predikciós profil készítésekor az előbbieken szerkesztett táblázatból minden pozícióban az ott helyet foglaló aminosavnak megfelelő értéket helyettesítjük be. Ezt követően egy 5-21 aminosav hosszúságú „ablakkal”, mely lehetővé teszi, hogy ezt a néhány elemből álló peptidszakaszt a molekula többi részétől függetlenül vizsgáljuk. Az ablakot végigfuttatva a szekvencián a táblázatból kiolvasott értékek ablakban lévő átlagát kiszámoljuk, majd hozzárendeljük a szekvenciához, és grafikonon ábrázoljuk. Pl. hidrofilitási profil számolása esetén, a magasabb értékű régiók a hidrofíl részeknek felelnek meg.

A profilban lévő kimagasló szélsőségek elkerülése végett a szokásos analízálás előtt a profil finomítása történik. Erre két módszer terjedt el: az egyikben, a régiókban lévő “fogakat” távolítják el, a másikban a változó értékeket egész számokkal helyettesítik. Az első finomítási módszer klasszikus megközelítse az ablakban lévő pozíciók súlyozása, mely legegyszerűbben *Karplus* és *Schulcz* szerint történik, egyszerűen az adott pozícióban lévő aminosav értékét a súlyszámmal megszorozzuk. *Van Regenmortel* e helyett egy Gauss-eloszlást használ.

A különböző profilok összehasonlíthatósága végett szokásos következő lépés az adatok normalizálása, ezt követően kerülhet sor az epitóp pozíciók meghatározására.

Az epitóp predikciós módszerek legtöbbször a primer szerkezetből következtet a másodlagos szerkezetre és az epitópokra az aminosavak valamely tulajdonságának analízisével. Vizsgálhatjuk, a fehérjét alkotó aminosavak hidrofobicitását, hidrofilitását, flexibilitást, az atomi mobilitást, az  $\alpha$ -helix és  $\beta$ -lemez szerkezeteket formáló hajlamot, akrofilitást és antigenitást, stb.. Ezen módszerek alkalmazásához, számtalan szoftvert fejlesztettek ki. Az egyszerűbbek egy módszert használnak (pl.: HYDRO), míg léteznek bonyolultabb rendszerek, melyekkel számtalan módszert ill. azok kombinációját különböző paraméterekkel kipróbálhatunk (pl.: Wisconsin GCG Package, PrediTop).

A fehérjék másodlagos szerkezete az  $\alpha$ -helix és  $\beta$ -lemez ismétlődő struktúrák, melyet az aminosavak, a köztük lévő hidrogén kötések és az oldószer és oldalláncok közötti kölcsönhatások révén alakítanak ki. A fehérjeszerkezetek kb. 50%-a hajlatok míg másik 50%-a ismétlődő struktúrákban helyezkedik el (25%  $\alpha$ -helix , 25%  $\beta$ -lemez). A másodlagos szerkezet jelentős mértékben összefügg a fehérjék antigenitásával.

Az  $\alpha$ -helixek és  $\beta$ -lemezek hidrofóbok, és általában a fehérjék belsejében helyezkednek el, míg a flexibilis hajlatok és kanyarulatok a molekulák hidrofíl felszínén.

Ezeket a törvényszerűségeket írják le a *Chou-Fasman* és *Garnier* algoritmusok, melyek 55-70% sikerrel detektálják az epitópokat.

A fehérjék hidrofil részeinek felszínen való elhelyezkedését használja *Hopp és Wood* algoritmus, *Kyte és Dolittle hydrophobicity index* az oldalláncok vízhez való kötődésével von párhuzamot. *Parker, Guo és Hodges* az aminosavak a hidrofilitást HPLC-vel való vizsgálattal állapította meg.

*Hopp akrofilitási indexe*, a 49 ismert szerkezetű fehérjében az aminosavak relatív felszíni expozícióját vizsgálja.

A nagyobb flexibilitású részek, felszínen való elhelyezkedését és így az immunválaszban való lehetséges részvételét mutatja meg *Karplus és Shultz-féle flexibilitási index*.

*Welling 20* sokat tanulmányozott fehérje 606 epitópjában előforduló aminosavakat dolgozta fel statisztikailag. Vizsgálatában az epitópok minden pozíciója hasonló fontossággal bírt, amit eredményeinek használatakor figyelembe kell venni. Ismertek ugyanis ún. kitüntetett pozíciók melyek, megváltoztatása egy-egy epitópban megszünteti az antitest-antigénkötődést, ugyanakkor más pozíciókban történő aminosav változás nem befolyásolja a reakciót.

*Jameson és Wolf* antigenitási vizsgálatait azt bizonyítják, érdemes több különböző módszer együttes alkalmazása. Vizsgálatainkban súlyozottan használtuk öt módszert.

Az epitóp meghatározást specifikusabbá tehetjük az érzékenység csökkenése nélkül, jelentősen növelve a találatok biztonságát, több különböző módszer párhuzamos használatával.

Egy-egy módszer eredményessége jelentősen függ az alkalmazott módszertől, a vizsgált fehérjétől és a korábban alkalmazott, a módszer paramétereinek beállításához használt adatbázistól. Az epitóp felismerés pontosabb, ha a módszert az általunk vizsgált fehérjéhez hasonló minőségű, funkciójú már vizsgált fehérjén tesztelt módszerrel analizáljuk. Így a statisztikai megfigyeléseinket a vizsgálandó szerkezethez hasonló mintán teszteljük. Ezekben az esetekben módszereink hibái kiegyenlíthetik egymást, jelentősen javítva az epitóp meghatározást.

Az epitóp predikció a bioinformatika önálló ága. Segítségével jelentősen lerövidíthető az új ellenanyagok előállítása, miközben új perspektívák nyílnak meg az immunológia területén. Lehetővé válik, új ellenanyagok előállítása számtalan kórokozóval és betegséggel szemben (pl. hepatitisz, HIV, influenza, kariesz stb), leegyszerűsíthetjük kutatásunkat, könnyebben eredményhez juthatunk.

A számítógépes predikció új perspektívákat nyitott az immunbiológia területén is. A módszer korlátainak ismerete nélkül azonban megnő a kapott adatok téves értelmezésének veszélye, hibás következtetésekre juthatunk, rosszabb esetben elérhetetlen célokat követünk.

Egyetlen predikciós módszer ismerete (egydimenziós – primer szerkezet - analízise) nem elég az érzékeny háromdimenziós információ kiszűréséhez, az epitóp meghatározásához. Az aminosavak minőségének gyenge korrelációja a fehérjék szerkezetével csak rontja a helyzetet, mivel 20-30%-ban szekvenciájukban hasonló fehérjék hasonló harmadlagos konformációt vehetnek fel. Emellett, hasonló szekvenciájú rövid peptidok gyakran különböző harmadlagos szerkezettel bírnak más, nem rokon fehérjeláncok alkotórészeként. Így, egy antigenitás szempontjából jól leírt minta alapján készült táblázat sem nyújt garanciát a sikerhez. Megoldásként a különböző algoritmusok és táblázatok olyan kombinációja juttat minket a legjobb eredményhez, amelyben a vizsgált molekula harmadlagos szerkezetét is figyelembe vesszük. A különböző algoritmusok interpretálásával számtalan epitóp prediktáló program született. Ezen programok felhasználását és eredményességét limitálják az algoritmusok és azok adaptálásának hiányosságai.

Szükséges a jelenlegi algoritmusok tökéletesítése, új algoritmusok keresése és az eredmények minél nagyobb, antigenitás szempontjából jellemzett mintán való ellenőrzése és finomhangolása.

Az epitóp predikció eredményessége számtalan módszerrel vizsgálható. Legegyszerűbb az ismert antigenitású fehérjemintán az epitópok elhelyezkedésének összehasonlítása az algoritmusok által meghatározott fehérjerészletekkel és ezen adatok statisztikai analízise. A módszerek leírása hasonlóképpen egy adott antigenitásában ismert adatbázison való tesztelés eredménye legtöbbször. A módszerek ezért az „ideális”-hoz az eredeti molekulákhoz hasonló szekvenciák esetében hoznak biztos eredményt.

Az irodalomban leírt epitóp prediktáló módszerek hatékonysága kétféleképpen vizsgálható: jól karakterizált ellenanyagok epitóp felismerésének összehasonlítása a becsült szekvenciával, vagy becsült szakaszok szintetizálása és ezek kötődésének vizsgálata ellenanyaghoz.

## Célkitűzések

Munkám célja a molekuláris biológiai és immunológiai kutatáshoz kapcsolódó bioinformatikai módszerek fejlesztése, optimalizálása és felhasználási területük kritikai elemzése volt. Négy fő területre koncentráltam:

1. DNS szekvenálás, laboratóriumi fázisát megkönnyítő szoftver fejlesztése,
2. DNS szekvenálás eredményeinek automatikus értékelését és adatbázisokba juttatását megkönnyítő szoftverek fejlesztése,
3. az *in silico* epitóp-predikció immunológiai használatának elemzése és validálása *in vitro* immunszerológiai mérésekkel
4. biostatistikai módszerek kombinált alkalmazása biológiai mérésekből származó nagy adathalmazok belső összefüggéseinek feltárására.

## Anyagok és módszerek

### Módszerek a DNS szekvenálás eredményeinek automatikus értékelésére

**Minta szekvenciák generálása és EST szekvenálás:** A referenciaként számon tartott *T. cruzii* CL Brenner klónból készítettünk cDNS könyvtárat. Az oligo(dT) szekvenciával normalizáltuk a poli(A<sup>+</sup>) RNS-t, hogy kiegyenlítsük az előforduló mRNS-ek számát. A cDNS könyvtárat transzformáltuk *E. coli* DH5- $\alpha$  törzsbe. Több mint 23000 klónt választottunk ki véletlenszerűen melyeket 384 lyukú mikrotitter lapra helyeztünk. Magas minőségű kettősszalú plazmid DNS-t tisztítottunk Wizard Plus SV miniperp DNS vagy PERFECTprep-96 szettel, ABI® Prism 21M13 fluorescens és DYEnamic festékekkel direkt jelölt T7 primerrel automata ciklus szekvenálást végeztünk. A mintákat ABI® 377XL szekvenátorokon analizáltuk.

**Szekvencia analizáló rendszer:** Az ABI 377XL szekvenátor adatait a hozzá kapcsolt Apple Power Macintosh 8600-on dolgoztuk fel. A kapott kromatogram fájlokat a netatalk programmal Linux IBM PC és Sun Sparc Ultra 5 számítógépekre másoltuk. Az adatok további feldolgozása és a szükséges szoftverek fejlesztése itt történt. A szkripteket bash-ben írtam. A szükséges saját alkalmazásokat C++-ban készítettük és GNU GCC-vel fordítottuk le.

### Laboratóriumi szekvenálást segítő szoftver fejlesztése

**Szekvencia analizáló rendszer:** Szekvenálásra egy ABI Prism ® 377XL szekvenátort használtunk. A szekvenátor adatait a hozzá kapcsolt Macintosh Power PC-n dolgoztuk fel az ABI Prism® DataCollection Software-rel.

**Minták géltre való juttatása:** Szekvenálás előtt az előkészített, 96-lyukú mikrotitter tálcákon lévő reakciókat 8 csöves Hamilton pipettával juttattuk a 64-lyukú géltre. A Hamilton pipetta csövei és a gél lyukai között osztásbeli eltérés van, ezért a pipettával minden második lyukba juttathatunk mintát. Először az 1. lemez 1. oszlopát (1a1 -1h1) mintát juttatjuk az 1. gél 1,3,5...15 oszlopára, majd a 1. lemez 2. oszlopát (1a2 – 1h2) mintákat juttatjuk a 1. gél 2,4,6...16 oszlopára. Ezután következik az 1. lemez 3 oszlopának (1a3-1h3) felhelyezése az 1. gél 17, 19, 21...31 oszlopára és így tovább. A 2. gél az 1. lemez harmadik harmadán (1a9-1h12) és a 2. lemez első harmadán lévő mintákkal töltjük fel (2a1-2h4). A harmadik géltre a második lemez 5-12 oszlopának mintái kerülnek. Ez a felhelyezés figyelmet követel, hogy a minták összekeveredését elkerüljük.

**Programozás és fordítás:** A szkripteket bash-ben írtam. A programot C++-ban programoztam és GNU GCC-vel fordítottuk le.

## Immunglobulinok által felismert epitópok térképezése

### *In silico* epitóp térképezés

**Humán mitokondriális CS B-sejt epitóp predikció:** Vizsgálatunkhoz a humán mitokondriális CS szekvenciát használtuk (EC 2.3.3.1) Gene Bank accession no. **PID O75390**) melyet az NCBI fehérje szekvencia adatbázisból töltöttünk le. A lehetséges antigének meghatározása céljából a *Chou-Fasman* másodlagos szerkezet és az *Eisenberg*-féle hidrofobicitás meghatározásokat végeztünk. Mindkét esetben, egy általunk elkészített *MS Excel* táblázatban, 7 aminosavra kiterjedő ablakkal végeztük a meghatározásokat, a szerzők által használt eredeti mátrixokkal. A kis valószínűséggel hidrofób ( $P_{\text{hydrophobicity}} < 0$ ) és nagy valószínűséggel  $\beta$ -csavar szerkezetet ( $P_{\beta\text{-turn}} > 1$ ) mutató szekvenciákat választottuk ki. A *GCG Wisconsin Programs*omaghoz tartozó *PepPlot*, *PeptideStructure* és *PlotStructure* alkalmazásokkal finomhangoltuk predikciónkat. Kiszámítottuk a molekula felületen történő elhelyezkedés valószínűségét ( $P_{\text{surface}} > 1$ ), a *Jameson-Wolf antigenitási indexet* ( $P_{\text{JW antigenity}} > 1$ ), a *Hopp és Wood féle hidrofilitási indexet* ( $P_{\text{HW hydrophilicity}} > 1$ ).

A Swiss-Model Automated Protein Modelling Server-en az *E. coli* CS (EC 4.1.3.7, Brookhaven Protein Data Bank No. 1K3P) való hasonlóság alapján szerkesztett 3D humán CS szerkezetét letöltöttük.

**Hepatitis B-vírus X-protein epitope predikció:** A *Chou-Fasman* és *Garnier-Osguthorpe-Robson* másodlagos szerkezet predikciós algoritmust ( $P_{\text{hydrophobicity}} < 0$ ;  $P_{\beta\text{-turn}} > 1$ ) és a *Jameson-Wolf* antigenitási indexet ( $P_{\text{JW antigenity}} > 1$ ) használtuk a HBX epitóp meghatározásához a *Wisconsin GCG Programs*omag *ProteinStructure* programjából.

**T-sejt epitóp térképezés:** T-sejt epitóp térképezést virtuális mátrix módszerrel végeztem, feltételezve, hogy kötés specifikus értékek hozzárendelésével és kombinálásával egy adott HLA szekvenciához történő hasonlóság alapján meghatározható a másik HLA zseb specifitása. A *TEPITOPE2000* programmal a rendelkezésre álló mind a 25 HLA-II alléllal vizsgáltuk a CS-t. (DRB1\*0101; DRB1\*0102; DRB1\*0301; DRB1\*0401; DRB1\*0402; DRB1\*0404; DRB1\*0410; DRB1\*0421; DRB1\*0701; DRB1\*0801; DRB1\*0802; DRB1\*0804; DRB1\*0806; DRB1\*1101; DRB1\*1104; DRB1\*1106; DRB1\*1107; DRB1\*1305; DRB1\*1307; DRB1\*1311; DRB1\*1321; DRB1\*1501; DRB1\*1502; DRB1\*0101). A HLA kötési zsebeket egyenlően súlyoztuk. Egy százalékos határértéket használtam a nagy valószínűséggel epitóp szekvenciák azonosítására.

### Epitóp predikció *in vivo* ellenőrzése

Rekombináns HBX (aminosav 1-154) glutathion S-transzferáz (GST) fehérjét készítettünk. A korábban kifejlesztett rekombináns HBX elleni ellenanyagot használtuk, mely a 3F6-G10 klón terméke.

#### Vizsgált minták:

a.) **CS:** Háromszáz-harmincnégy egészséges embertől származó 5 éves periódus alatt gyűjtött szérumot, valamint 326 autoimmun betegről származó és 52 szívtranszplantált beteg vérmintáit analizáltuk. A vizsgált csoportokban a kor és nem aránya megegyezett.

b.) **HBX:** Tizennégy HBV fertőzött akut hepatitiszes, 80 krónikus hepatitiszben szenvedő, 14 tünetmentes HBV hordozó és 22 egészséges donor mintáit vizsgáltuk.

**Anti-CS autoantitestek immunszerológiai detektálása ELISA-val:** Indirekt ELISA-t használtunk az anti-CS autoantitestek kimutatásához és az eredményeket CS-t nem, de a többi összetevőt tartalmazó kontrollal hasonlítottuk össze.

**Epitóp térképezés tühegy ELISA-val:** Negyven, egymást 5 aminosavval átfedő, decapeptideket szintetizáltunk a 9 prediktált epitóp régióknak megfelelően. A szintézis  $\beta$ -Ala-Gly-el funkcionizáltatott polietilén tükön történt Fmoc/tBu reagenssel a *Geysen* módszere szerint.

**CS azonosság keresése:** Az antitest kötődését vizsgáló kísérleteink mellett a humán CS azonosságát vizsgáltuk az NCBI non-redundáns fehérje adatbázisában. Összehasonlításra a BLASTP2 progra-



mot használtuk (E = 20000; Matrix PAM30; Gap cost Existence: 9 Extension: 1; Word size = 2, az adatbázis nagysága 2004 Szeptemberében 688 443 072 volt).

**Random peptid könyvtár szűrése:** A fágok dúsítását az irodalomban korábban közöltek szerint végezzük: anti-HBX antitesttel dúsítást végeztünk több ciklusban, majd neutralizálást követően XL1-Blue *E.coli*-t fertőzünk velük. M13KO7 helper fággal történt felülfertőzés után a egy második dúsítási ciklust iktattunk be. A második ciklus után a fágokkal fertőzött majd M13KO7 helper fággal felülfertőzött XL1-Blue *E.coli* telepek nitrocellulóz membrán replikáját anti-HBX antitesttel hívtuk elő, majd negyven pozitív klónt választunk ki, amelyeket ELISA-val tovább teszteltünk. Az ELISA alapján tíz klónból DNS-t izolálunk, amit szekvenálunk.

## **Biostatistikai módszerek kombinált alkalmazása**

A statisztikai analízist egy IBM PC kompatibilis személyi számítógépen futtatott SPSS 9.0 programcsomaggal végeztük. Az ELISA eredményeket regresszió analízisét mind a három csoportban (akut, krónikus és hordozó) minden mintával minden minta ellen mátrixban elvégeztük (N, C, C1, C2, C3, X, X<sup>14-16</sup>). A 0,4-nél kisebb abszolút értékű regressziós koeficienssel ( $|R| > 0,4$ ) rendelkező és/vagy ahol a P érték 0,05-nél nagyobb párokat elvetettük. Az eredményeket táblázatban ábrázoltuk.

## **Eredmények**

### ***Automated Sequence Annotator (AUSA)*- DNS szekvenálás eredményeinek automatikus értékelése**

A hozzáférhető szoftverek segítségével, valamint saját szkriptjeinkkel és programjainkkal sikerült létrehozni egy automatikus rendszert. Ez a rendszer, emberi beavatkozás nélkül, a szekvenálás eredményeként kapott kromatogramokat automatikusan, a szekvenátorra kötött Apple Power PC-ről Unix (Linux/Solaris) platformra juttatja, majd azt automatikusan szerkeszti, szűri és adatbázisokban hasonlóságot keres. Végül a szekvenciát és a hozzátartozó eredményeket, valamint az automatikusan fel nem dolgozható szakaszokat (pl: szekvenálási hiba, nem kielégítő minőség, rövidség) a felhasználónak elektronikus levélben elküldi.

Szkriptünket, melyet *AUSA* (*AU*tomated *S*equences *A*nnotator) névre kereszteltünk, rendszeres, előre programozható időközönként indít el az operációs rendszer ún. `cron job` formájában. Az *AUSA* szkriptgyűjtemény, a kromatogramokat egy kijelölt mappából, ahová a felhasználó másolta az annotálni kívánt szekvenciák kromatogramját, AppleTalk protokoll használatával a *netatalk* kapcsolaton keresztül Unix rendszerre másolja. Itt szkriptünk gondoskodott a kromatogram fájlok biztonsági másolásáról és az annotációjáról.

Az *AUSA* először a *phred* base-caller futtatásával meghatározta a kromatogramokból (`.chr` kiterjesztés) a szekvenciát (`.seq`) és az adott szekvencia bázisainak minőségét (`.qual`), vagyis a hiba valószínűségét. Ezt követően elindítja az *ACE* (*AU*tomated *C*DNAs *E*ditor) programot.

### ***Automated CDNA Editor (ACE)***

Az *ACE* tetszőleges minőségi paraméterek és primerek szerint képes egy adott szekvenált polinukleotidot szerkeszteni. A program bemeneti adatai a nukleotidhoz tartozó szekvencia (`.seq` file), a bázisokhoz tartozó minőségi értékek (`.qual` fájl) és konfigurációs file (`.aconf` file).

A program első lépésben egy helyi összerendezést (local alignmentet) végez az eredeti *Smith-Waterman* algoritmussal az általunk megadott insert primerekkel. Itt megadható a találat, eltérés és hiányokhoz rendelt ún. gap-penalty értéke. Mivel a vizsgált szekvenciák rövidek, ezért a futási idő kisebb teljesítményű számítógépeken (Intel Pentium MMX 166MHz) sem jelent problémát.

Ezt követően az általunk beállított paraméter segítségével a *phed* programmal meghatározott minőségi értékeknek megfelelően (.qual fájl) eltávolítja az alacsony, nem megfelelő minőségű részeket. Ennek az a szerepe, hogy az adatbázisokba beküldendő szekvenciák jó minőségűek legyenek.

Amennyiben a vizsgált szekvencia poli-A szakaszt tartalmaz, a program eltávolítja azt is.

*ACE* program kimenete egy az előbbieknek megfelelően „kurtított” szekvencia lesz, valamint egy pozitív egész szám. Ez a szám adja meg, hogy sikerült-e minden lépésnek eleget tenni, vagy valamilyen hibával történt a program leállása. Ezt a kilépéskor visszaadott értéket használja a programot meghívó szkript a későbbiekben arra, hogy mi történjen az adott szekvenciával. A rövid, vagy nem megfelelő minőségű cDNS-eket külön könyvtárba mentjük, és a felhasználót e-mailen értesíti a szkript.

A megfelelő minőségű és hosszúságú szakaszok alacsony komplexitású szűrését ezután a *dust* és *seq* programok végzik. A *blastcli*, kliens meghívásával, a BLASTN és BLASTX programokkal távoli szerveren végzünk hasonlóság keresést.

A keresési eredményeket a *ctab* programmal szkriptünk számára olvasható programmá alakítjuk. Ezt az általunk írt *ctab* programmal vizsgáljuk. A *ctab* a parancssorban megadott paraméterek alapján visszaadja a kért számú és valószínűségű keresési eredményt (BLAST E és P érték).

Ezt követően kerül hívásra a *MAKEMAIL* program.

## **MAKEMAIL**

A *MAKEMAIL* program kimenete egy elektronikus levélben elküldhető fájl, mely megfelel az NCBI ajánlásának a GENBANK-ba történő adat elhelyezésnek. A program bemeneti adatai egy konfigurációs fájl, vagy ennek hiányában a parancssori paraméterek, ahol a beküldéshez szükséges az adott projekt nem változó adatai megadhatóak. A szekvenciát és hozzá tartozó hasonlósági adatokat a program a szekvenciaadatokból (.fasta, fasta formátum) és *ctab/btab* formátumú fájllokból kapja.

A felhasználó a *MAKEMAIL* eredményét ellenőrizheti vagy beállítástól függően, kellő szigorú paraméterek esetén (*ACE* és *BLAST*) továbbíthatja automatikusan a GENBANK-ba. A nem megfelelő minőségű és hosszúságú szekvenciák manuálisan ellenőrizhetők.

## **SWriter (Sheet Writer) – laboratóriumi munkát segítő program**

Szekvenálás előtt, az előkészített, 96-lyukú mikrotitter tálcákon lévő reakciókat 8 csöves Hamilton pipettával jutattuk a 64-lyukú gélre, mely a minták összekeveredését eredményezheti. A Hamilton pipetta csövei, és gél lyukai között osztásbeli eltérés van, ezért a pipettával minden második lyukba juttathatunk mintát.

A munka eredménye a *SWriter* valamilyen Unix rendszeren (pl. Solaris, BSD, Linux) futtatható program lett. A program vagy a manuálisan beírt mintaneveket, vagy azokat egy előre elkészített fájlból beolvasva, vagy a laboratóriumban használt rendszernek megfelelően a 96-lyukú lemez névének és abban lévő pozíciónak megfelelően generál 3 gél fájlt. Ezek a fájlok használhatóak utána a szekvenálás futtatására.

A program használatával kiküszöbölhetővé váltak és megszűntek az elnevezésből adódó hibák. A név és gélfájlok archiválásával valamint egységes nevezéktan használatával nyomon követhetővé vált a minták gélre helyezése és a szekvenálás.

# Immunglobulinok által felismert epitópok térképezése

## *In silico* epitóp térképezés és a kapott adatok *in vitro* validálása

Normál és patológiás körülmények között nyert antitestekkel végeztük el a teljes konzervatív mitokondriális belső-membrán fehérje, a CS enzim, epitóp térképezését. Összehasonlítottuk az *in silico* predikciós és *in vitro* immunszerológiai eredményeinket.

### ***CS B-sejt epitóp predikció eredménye:***

Feltételezve, hogy az epitópok a fehérjék hidrofíl régióiban vagy azok közelében helyezkednek el, 15 nagy valószínűséggel  $\beta$ -csavart ( $P_{\beta\text{-turn}} > 1$ ) és kevésbé hidrofíl ( $P_{\text{hydrophobicity}} < 0$ ) régiót választottunk ki. Ezek a régiók a CS molekula következő részét fedték le: 51-78, 85-91, 103-119, 127-132, 138-161, 176-195, 217-239, 244-250, 261-269, 281-285, 302-309, 320-331, 354-364, 390-398, 409-414, 448-463.

A 3D modell figyelembevételével, két szekvenciaszakaszt kizárhattunk, mert bár megfeleltek az előbbi kritériumoknak, a molekula belső felszínén helyezkedtek el. A 103-119 és 302-309 szegumentumok a molekula belső részében az antitestek számára nehezen elérhetően helyezkedtek el.

A predikció és 3D szerkezet alapján 9 epitóp gyanús régiót különítettünk el: 51-90 (I), 124-163 (II), 176-195 (III), 216-250 (IV), 261-285 (V), 320-339 (VI), 354-373 (VII), 390-414 (VIII), és 447-466 (IX). Az eredmények immunszerológiai ellenőrzését tühegy rendszerben vizsgáltuk, egymást 5 aminosavval átfedő peptidekkel.

### ***CS T-sejt epitóp predikció eredménye:***

A 18-29, 35-88, 92-115, 119-131, 139-165, 195-237, 254-266, 306-319, 361-393, és 406-446 aminosav szekvenciákat predektáltuk mint lehetséges T-sejt epitópokat a virtuális mátrix módszerrel. Ezek a szekvenciák legalább az egyik virtuális HLA-hoz kötődést valószínűsítettek. A legalább 10 virtuális HLA hoz kötődő régiót nagy affinitású, erős epitóp potenciállal rendelkező szekvenciának minősítettük. Kilenc erős T-sejt epitópot találtunk: (18-29, 57-83, 91-103, 119-131, 201-215, 254-266, 306-319, 373-393, 415-427). A 3D modellezés szerint két szakasz a CS molekula belsejében lévő  $\alpha$ -helixen helyezkedik el. A prediktált 9 epitópból 4 átfedést mutat a feltételezett B-sejt epitópokkal: 57-60, 57-79, 255-266, 306-319, és 415-427. A 306-319 szakasz a molekula belsejében helyezkedik el. Három T-sejt epitóp a prediktált B-sejt epitópok mellett, azok közvetlen közelében helyezkedett el (T|B: 91-103|103-119, 119-131|103-119, 415-427|409-414).

### ***In vitro mért CS ELISA eredmények:***

A legalább az adott csoportban mért szérumok átlagánál két szórással (2SD) nagyobb szérumokat tekintettük pozitívnak. A pozitív anti-CS IgG szérumok aránya 2-4 % minden csoportban. Az IgM szérumok 7-12 %-a volt pozitív, kivétel az autoimmun betegek csoportja, ahol 24 % volt a pozitívok aránya. Az ELISA pozitív szérumát használtuk további CS vizsgálatunkban.

### ***Tühegy CS ELISA – immunszerológia epitóp térképezés eredményei:***

Az immunszerológiai epitóp térképezés eredményeit táblázatban foglaltuk össze. Jelentős különbségeket találtunk a különböző szérumcsoportok epitóp felismerési mintázatában.

A vizsgált 40 decapeptid a humán belső-membrán mitokondriális enzim a CS 49 %-át fedte le. A 40 decapeptidból 23-at (58%) több mint egy szérumcsoport ismerte fel; 8 peptidet (19%) csak egy valamelyik szérumcsoport ismerte fel. Kilenc eset (23%) egyetlen szérumcsoport sem ismert fel.

Harmincnégy peptid *in silico* jó immunológiai felismeréssel rendelkezett és 27-et (79%) bizonyítottunk ezek közül immunszerológiailag pozitívnak. Tizenegy peptidet (32%) a legtöbb szérumban felismert. Tizenhat peptid (47%) legalább 1 csoportban pozitív volt. Hét peptidet (21%) *in silico* prediktáltunk, de nem bizonyultak pozitívnak *in vitro*. Hat peptid nem prediktált régióban helyezkedett el. Ezek a szekvenciák egymáshoz közeli epitópok között helyezkedtek el, ezért történt szintézisük. Három peptidet egyetlen szérumban sem ismert fel, hármat legalább 1 csoportban felismert.

#### ***Bakteriofág könyvtárakkal végzett CS epitóp térképezés eredményei:***

A random peptid könyvtár segítségével két autoimmun beteg szérumban mintáiban a 145-150 aminosav szekvencia tartományban kaptunk pozitív eredményt. Ez beleesett az előzetes *in silico* predikcióval megjósolt 138-161 immunogén régióba. Egy, a teljes CS molekulával történt immunizálás után előállított monoklonális anti-CS ellenanyag specifitása (31-59 szekvencia) részleges egyezést mutatott a prediktált (51-78 szekvencia) régióval.

#### ***HBxAg B-sejt epitóp predikció eredménye:***

A HBxAg 3D szerkezete még nem meghatározott. A fehérje 84 hidrofób aminosavat tartalmaz, ami a teljes molekula 54%-a. A molekula másodlagos szerkezetének *in silico* elemzése a *Chou-Fasman* és *Garnier-Osbourne-Robson* algoritmusokkal kanyart valószínűsített a molekula N-terminálisán és C-terminálisához közel eső részeken. A 75-130 aminosavak közötti rész a predikció alapján  $\alpha$ -hélix szerkezetet valószínűsít.  $\beta$ -lemez struktúra a molekula egészében valószínűsíthető. Glikozilációs helyek nem ismertek.

A *Jamson és Wolf* antigenicitási index alapján két szekvenciát (22-31 és 100-114) valószínűsítettünk epitópnak. Az M13 filamentózus fág felszínen expresszált random peptidfragments könyvtár segítségével elvégeztük a monoklonális ellenanyag epitópspecifitásának meghatározását és a kapott – több módszerrel kontrollált – eredmények nem támasztották alá az epitóp predikciót. Az elvégzett epitópmeghatározás a 88-93 aminosav szekvencia területén igazolta az ellenanyag felismerőhelyét.

#### ***In vitro mért ELISA eredmények:***

A HBxAg szérumszinteket szendvics-ELISA-val vizsgáltuk (Pál, megjelenés alatt). Az abszolút koncentráció 18 – 1800 ng/ml között széles sávban mozgott. A HBxAg koncentráció csoportátlaga magasabb volt az akut és krónikus csoportban, mint a tünetmentes hordozókban. A legnagyobb szórást a krónikus hepatitiszes csoportban találtuk.

Az individuális különbségek homogének voltak csoportokon belül. Kivételt a krónikus hepatitiszben szenvedő betegek anti-HBX IgG izotípusában figyeltünk meg. A legerősebb HBX ellenes választ a leghosszabb rekombináns fragmentum (10-143) adta, IgM és IgG izotípusokkal. Az első, rekombináns C fragmentum (C1: 79-117) pozitív volt krónikus hepatitiszes betegek szérumban IgM és IgG izotípusokkal. Ugyanezen a szakaszon az IgG izotípus erős pozitívítást mutatott akut hepatitiszes és egészséges hordozó egyének esetében. A C1 fragmentumon jelentős pozitívítást nem mutatott krónikus hepatitiszben és hordozóknál. A többi vizsgált peptid kismértékű pozitívítást mutatott, minimális individuális variációval. Az egészséges kontrollok konzekvensen nem reagáltak az összes antigén esetében.

#### **A multiparametrikus biostatistikai kiértékelés eredményei**

A HBX szérumok koncentrációja és anti-HBX antitest titerek korreláció analízise tisztázta a rejtett összefüggéseket a különböző csoportok és paraméterek között.

Akut hepatitiszben erős és homogén korrelációt találtunk a szérumban anti-HBX IgM antitest és HBxAg szérumkoncentráció között. A IgG típusú antitestek magas korrelációt mutattak a C1 frag-

mentum felismerésében, míg összefüggést az N fragmentummal (N-terminális) nem találtunk. A szérumban HBxAg szint és a leghosszabb fragmentum (X: 10-143) közötti szoros összefüggés a matematikai módszer erősségét bizonyítja.

Krónikus hepatitiszben, IgG dominanciát találtunk és a C fragmentum (C: 79-143) felismerésével való fokozott korrelációt. Összefüggés az N-terminális fragmentum felismerésében és HBxAg szérumban koncentráció között nem tudtuk kimutatni. A HBxAg szérumszintje közepes mértékben befolyásolta a C terminális (C: 79-143) és a leghosszabb fragmentum (X: 10-143) elleni IgG választ. Az IgM reaktivitás tekintetében domináns régió az N és C terminális fragmentumok voltak (N: 1-31; C: 79-143), bár statisztikailag szignifikáns összefüggés nem volt kimutatható a hasonló szérumban csoportok között.

## Megbeszélés

A molekuláris biológiai és immunológiai laboratóriumi munka szerves részét képezik az *in silico* vizsgálatok. A statisztikai módszerek alkalmazása már a korai időszakban minőségi változást hozott az élő természettudományok eredményeinek kiértékelésében. A számítógépes programok megjelenése tette lehetővé a nagy adathalmazok gyors feldolgozását. További fejlődést hozott a korszerű programozási nyelvek kialakítása és a nagyteljesítményű hardverek – személyi számítógépek - piaci árának gyors csökkenése az 1990-es évek elején. Mivel a felhasználói kör gyorsan bővült és a biológiai kutatásban közvetlenül résztvevők is meg tudták oldani azokat a programozási feladatokat, melyeket korábban csak speciálisan képzett, alkalmazott matematikai és informatikai tudással rendelkező szakemberek voltak képesek. Így, az elmúlt tizenöt év során egy új tudományág, a bioinformatika fejlődött ki.

A fejlődés két irányban folytatódott: egyrészt a nagy adathalmazok kezelése és bonyolult belső összefüggéseinek analizálása, másrészt a meglévő adatokból új, még nem vizsgált, de valószínűsíthető összefüggések feltárása. Az adathalmazok kezelése nemzetközi összefogást is jelentett és kialakultak a világhálón bárhol elérhető biológiai adatbázisok, melyek a genetikai és proteomikai kutatásokban napjainkra már nélkülözhetetlenekké váltak.

Az élő szervezeteket felépítő molekulák 3D szerkezetének vizsgálata már fél évszázados múltra tekint vissza. Alapvető megfigyelések történtek a biomolekulák struktúráinak modellezésével (pl. a DNS vagy a különböző kötőszöveti rostok szerkezete). A bioinformatikai predikció, mint kutatási módszer első alkalmazása már az 1970-es években megkezdődött. Ez a terület is a hardver- és szoftver-fejlesztéseknek köszönhetően az elmúlt évtizedben általánosan használttá vált.

Mindezzel az extenzív fejlődési folyamattal párhuzamosan megjelentek a kritikai hangok is és szükségessé vált mind az adatbázis struktúrák, mind a predikciós technikák kritikai elemzése, az élő rendszereken mért adatokkal történő folyamatos összevetése.

Munkám mind az adatfeldolgozásra, mind az adatbankok segítségével történő predikcióra kiterjedt. Mindkét témakör a biológiai kutatás szolgálata mellett felvetette a bioinformatikai módszerekkel kapott eredmények gyakorlati használhatóságának kérdését.

Az első kutatási témakörben bemutatott, a szekvenálást segítő szoftver-fejlesztés a géltre történő mintafelvitelt és az adatok nyomon követését könnyítette meg és minimalizálta a mintatévesztésből adódó pontatlanságokat, nagyfokban megnövelve a mérési biztonságot. Fejlesztésünk megelőzte az azóta a piacon megjelent hasonló programokat. Az ***SWriter program***, melyet 1997-ben fejlesztettem ki, az Uppsalai Egyetemen 1997-től 2002-ig terjedő időszakban volt használatban. A professzionális szoftverfejlesztő cégek termékei hasonló problémákat oldanak meg, különböző algoritmusok alapján, de az általam kifejlesztett program a laboratórium speciális problémáit (az EST és minták elnevezései) figyelembe véve tudta az adatkezelést megoldani. A szoftver GPL (General Public Licence) engedély birtokában készült, Linux operációs rendszerben. A célalkalmazás – a széleskörű felhasználás lehetővé tétele – nem igényelte az iparjogvédelmet.

A második kutatási témakörben végzett munkám az **EST szekvenálás** eredményeinek automatikus **feldolgozását, annotálását** és nemzetközi adatbázisokba történő automatikus továbbítását tette lehetővé. Nagy mintaszámokon végzett szekvenálások esetében ez az automatizált feldolgozás és adattovábbítás meggyorsítja ugyan az eredmények kiértékelését és továbbítását, de bizonyos számú adatvesztéssel is együtt jár. Ez manuális munkával ugyan korrigálható, de az időközben végbement technikai fejlődés, a szekvenálás gyorsabbá és olcsóbbá válása mindenképpen igazolta eredeti elképzelésünket, jelentős munkaidő megtakarítást és költséghatékonyság növekedést eredményezett. Ugyan az operációs rendszerek fejlődése eredeti formájában már nem teszi lehetővé az 1998-ban kifejlesztett szoftverem mai használatát, de adaptálása folyamatban van. Ez a szoftverfejlesztés is GPL alapon történt, Linux operációs rendszerben. Az időközben végbement hardver és szoftverfejlesztések teszik szükségessé az új adaptációt.

A harmadik témakörben több **immunológiai predikciós** technika összehasonlítását és kritikai elemzését végeztük el. Az *in silico* epitóp predikció a bioinformatika gyorsan fejlődő ága volt az elmúlt évtizedben. Mind az elméleti kutatásban, mind a gyakorlati biotechnológiában új perspektívák nyíltak meg az immunológia területén a bioinformatikai módszerek kiterjedt használatával, ugyanakkor a számítógépes predikció korlátai is hamar felismerésre kerültek. Szisztematikus összehasonlító vizsgálatokat azonban csak elvétve végeztek az egyes predikciós technikák tesztelésére. Ezért kezdtünk célzott vizsgálatokat egy jól jellemzett modellben az előzetes *in silico* predikció és az *in vitro* mért immunszerológiai eredmények összehasonlításával.

A biológiai mintákon elvégzett *in vitro* méréseink az esetek jelentős részében egyeztek az *in silico* bioinformatikai eredményekkel, de igen jelentős számban kaptunk attól lényegesen eltérő adatokat is. Az általunk választott citrát szintáz modell alkalmas volt a technikai hibák kizárására azzal, hogy a predikció eredményei alapján kifejlesztett szintetikus peptidkönyvtáron mért adatok, valamint kétféle (M13 filamentózus, ill. lambda) random fágkönyvtárak segítségével végzett mérések eredményeit tudtuk összehasonlítani. A szintetikus peptid könyvtárral 40 szintetikus dekapeptid epitópot vizsgáltunk, melyek előzetes *in silico* predikció alapján kerültek kiválasztásra. Az immunszerológiai mérésekkel 32-50% között találtunk *in vitro* felismerést az egyes csoportokban (egészséges, autoimmun beteg és szívtranszplantáltak csoportjai). Az összes szérum a prediktált epitópok 79 %-át ismerte fel, azaz 21%-ban egyetlen szérum sem mutatott pozitívítást. Az *in silico* predikció és az *in vitro* mért eredmények közti eltérések ugyanolyan értékes kutatási eredménynek bizonyultak, mint a bizonyított egyezés az *in silico* és *in vitro* adatok közt és összhangban vannak a korábbi irodalmi adatokkal. Ugyan az elmúlt években sokat tökéletesedtek a predikciós algoritmusok, az általunk is leírt pontatlanságok felvetették egy „poszt-predikciós” irányzat szükségességét, melyben speciális biobankok mintáin végzett kontroll vizsgálatok felhasználásával a meglévő bioinformatikai technikák speciális irányokba továbbfejleszthetők. A predikciós technikák jelenleg ugyanis egy „általános” immunreaktivitást jósolnak meg, a mérések pedig konkrét egyének, aktuális immunreaktivitását tükrözik. A nagyfokú alkalmazkodóképesség, tehát a változékonyság éppen az immunrendszer egyik alapvető sajátja, ezért elméletileg is evidens, hogy a jelenleg használt adatbázisok finomításra szorulnak, szakosodott adatbankok kialakítására van szükség. Megállapításunk ugyan kézenfekvőnek tűnik, de a témában közölt dolgozatunk az egyik első, valós adatokon történt összehasonlítást bemutató munka volt és összhangban áll korábbi – részben saját - megfigyelésekkel.

A negyedik témakörben valójában már széles körben és régóta alkalmazott, egyszerű **biostatistikai technikákat** használtuk fel és a korszerű adatfeldolgozás segítségével tettük alkalmassá **nagyszámú immunszerológiai minta több szempontú kiértékelésére**. A mérés technikák fejlődése lehetővé teszi napjainkban, hogy nagyszámú mintát párhuzamos, több szempontból vizsgáljunk. Ezeknek a multiparaméteres vizsgálatoknak a kapott eredmények kiértékelése szab határt. Az általunk alkalmazott mátrixstatistikai eljárás (nagyszámú mérési mintán végzett regresszió analízis) segítségével sikerült jól jellemezhető prognosztikai csoportokat kialakítanunk és bizonyítanunk, hogy a Hepatitisz B vírusfertőzésen átesett és tünetmentes hordozóvá váltak csoportjában kik azok, akik fokozottan veszélyeztetettek az elsődleges májrák kialakulása szempontjából. A technikai szempontból egy adaptációt jelentő munka tehát új összefüggések feltárására vált alkalmassá és az

összeállított biostatistikai panel további, hasonló klinikai és epidemiológiai feldolgozásokban is alkalmazható).

Mind a négy témakörben munkám a bioinformatika aktuálisan legfontosabb irányaihoz kapcsolódott és a tudományág gyors fejlődését bizonyítja, hogy a tézisek benyújtása előtt nyolc évvel kezdődött munka egyes elemeit ma már túlhaladta a fejlődés. Ugyanakkor mind a négy tématerületen - a nemzetközi publikációinktól függetlenül is - gyakorlati felhasználás bizonyította a kutatási fázis eredményességét.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni fáradozásukat mindazoknak, akik segítettek és támogattak tudományos munkám megszületésében, összeállításában és végül a cél elérésében.

Ez a munka nem valósulhatott volna meg számtalan barát és kolléga nélkül, akik tanácsaikkal, munkájukkal közvetlenül vagy közvetve segítették téziseim elkészítését.

**Prof. Németh Péternek**, Témavezetőmnek, aki Svédországból való hazatérésem után a megkezdett tudományos munkámat felkarolta, és irányított kutatásaim folytatásában. Támogatásával és intelmeivel sikerült összeállítanom disszertációmat, a tudományos kérdéseimet megfogalmazni. Baráti (olykor éjszakákba nyúló) beszélgetésekkel bevezetett az immunológiába és az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet nagyszerű társaságába.

**Björn Anderssonnak**, **Martti Tamminak** a bioinformatika tudományának megismertetésért, az alapokba való bevezetésért, a hasznos tanácsokért és együtt töltött hosszú baráti diszkusszióért.

**Prof. Szabó Gyulának** a PTE-ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika vezetőjének, hogy határozott döntéseivel támogatta szakmai képzésem és munkám megszületését.

**Dr. Olasz Lajos Tanár Úrnak**, a Szájsebészeti Osztály vezetőjének, közvetlen munkahelyi főnökömnek, aki mellett a szájsebészetet tanulom, a biztatásért és támogatásért és ahhoz, hogy megfelelő gyakorlathoz juttattam, hogy értékes tanácsaival segített tudományos munkám létrehozásában.

**Dr. Berki Tímeának**, **Dr. Balogh Péternek** a kézirat készítése során nyújtott kritikus észrevételükért és hogy munkámhoz alapvetően szükséges, immunológiai problémákban irányítottak.

**Pál Józsefnek**, **Nagy Gergelynek**, **Dr. Czömpöly Tamásnak**, **Dr. Kvell Krisztiánnak**, **Dr. Boldizsár Ferencnek**, **Engelmann Péternek** és az Immunológia és Biotechnológiai Intézet PhD és TDK hallgatóinak a segítségét és kellemes hangulatban együtt töltött időt.

A **PTE-ÁOK Immunológia és Biotechnológiai Intézet dolgozóinak** a kísérletes munkában nyújtott segítségért, a baráti fogadtatásért.

A **PTE-ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika dolgozóinak**, a támogatásért és segítségért, hogy munkám, a napi rutin feladataim mellett kutatásaimat végezhessem.

Valamint utoljára, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és szívemhez közelálló gyámolítómnak, odaadó támogatásukat, állandó ösztönzésüket és a nyugodt háttér biztosítását!

## Saját publikációk

### Az értekezés témaköréhez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

#### Folyóiratban megjelent, eredeti közlemények:

1. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, **Nyárády Z**, Pálincás L, Berki T, Németh P: *A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?* Molecular Immunology (elfogadva, megjelenés alatt, MIMM-D-05-00212) **IF 2.827**
2. Pál J, Pálincás J, **Nyárády Z**, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik Gy, Younes SA, Berencsi Gy, Chen R, Varró R, Pár A, Németh P: *Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of Hepatitis B virus X antigen level in human sera.* J Immunological Methods (elfogadva, PMID: 16194545) **IF 2.744**
3. Pál J, **Nyárády Z**, Marczinovits I, Pár A, Younes SA, Berencsi Gy, Németh P: *The C-terminal sequence (aa79-117) of HBxAg plays key role in the immune response shown by fine epitope mapping and bio-statistical analysis.* Pathology Oncology Research (elfogadva, megjelenés alatt)
4. **Nyárády Z**, Czömpöly T, Bősze Sz, Nagy G, Petrohai Á, Pál J, Hudecz F, Berki T, Németh P: *Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies.* Molecular Immunology (elfogadva, PMID: 16087237) **IF 2.827**
5. Petrohai Á, Nagy G, Bősze Sz, Hudecz F, Zsiros E, Paragh Gy, **Nyárády Z**, Németh P, Berki T: *Detection of citrate synthase reacting autoantibodies after heart transplantation: an epitope mapping study.* Transplant International 2005 17: 834-840. **IF 1.858**
6. Pál J, Czömpöly T, **Nyárády Z**, Marczinovits I, Janaky T, Kele Z, Felici F, Németh P: *Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods.* Mol Immunol. 2003 40: 241-6. **IF 2.827**
7. Porcel BM, Tran AN, Tammi M, **Nyárády Z**, Rydaker M, Urmenyi TP, Rondinelli E, Pettersson U, Andersson B, Aslund L: *Nucleotide Gene survey of the pathogenic protozoan Trypanosoma cruzi.* Genome Res. 2000 10: 1103-1107. **IF 8.559**



## **Idézhető absztraktok:**

1. Olasz K, Czömpöly T, Simon D, **Nyárády Z**, Berki T, Czirják L, Németh P: *A citrát-szintáz-specifikus autoantitestek epitópmintázatának vizsgálata*. Magyar Immunológia 2005 4: 32.
2. **Nyárády Z**, Czömpöly T, Berki T, Németh P: *Az in silico predikció in vitro ellenőrzése citrát szintáz specifikus autoantitestek immunszerológiai epitóptérképezésével*. Magyar Immunológia 2005 4: 32.
3. Németh P, Czömpöly T, Simon D, **Nyárády Z**, Olasz K, Czirják L, Berki T: *Fiziológiás és kóros autoantitestek mintázatának összehasonlítása*. Magyar Immunológia 2005 4: 32.
4. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Pálinkás L, **Nyárády Z**, Berki T, Czirják L, Németh P: *Az autantitestek epitóptérképezése szintetikus peptid és fágkönyvtárakkal*. Magyar Immunológiai 2005 4: 14.

## **Kongresszusi előadások:**

1. Olasz K, Czömpöly T, Simon D, **Nyárády Z**, Berki T, Czirják L, Németh P: *A citrát-szintáz-specifikus autoantitestek epitópmintázatának vizsgálata*. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Október 19-22, 2005, Sopron (Poszter)
2. **Nyárády Z**, Czömpöly T, Berki T, Németh P: *Az in silico predikció in vitro ellenőrzése citrát szintáz specifikus autoantitestek immunszerológiai epitóptérképezésével*. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Október 19-22, 2005, Sopron (Poszter)
3. Németh P, Czömpöly T, Simon D, **Nyárády Z**, Olasz K, Czirják L, Berki T: *Fiziológiás és kóros autoantitestek mintázatának összehasonlítása*. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Október 19-22, 2005, Sopron
4. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Pálinkás L, **Nyárády Z**, Berki T, Czirják L, Németh P: *Az autantitestek epitóptérképezése szintetikus peptid és fágkönyvtárakkal*. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Október 19-22, 2005, Sopron (Poszter)
5. Nagy G, Bősze Sz, **Nyárády Z**, Berki T, Petrohai A, Czirják L, Hudecz F, Németh P: *Comparative Epitope Mapping Of Mitochondrial Innermembrane Specific Autoantibodies Which Participate In The Formation Of The Immunological Homunculus*. EFIS (European Federation Immunological Societies), 2003, Rhodos, Görögország (Poszter)
6. Bősze Sz, Nagy G, Uray K, **Nyárády Z**, Petrohai A, Németh P, Hudecz F: *Epitope mapping of human citrate synthase for searching linear autoantibody epitopes* 8th International Symposium on Solid Phase Synthesis and Combinatorial Libraries, Szeptember 2-6, 2003, London, UK (Poszter)
7. Németh P, Nagy G, Czömpöly T, **Nyárády Z**: *Mikroanalitikai és molekuláris biológiai lehetőségek az ellenanyagok és T sejtek epitóp specifikitásának feltérképezésében* XXth Conference of Hungarian Immunological and Clinical Immunological Associations, Május 9-10, 2003, Salgóbanya
8. **Nyárády Z**, Tammi M, Andersson B: *Automated bioinformatic tools to analyse T. cruzi genomic sequence data – ACE*. Victoria Conference, Október 1998, Uppsala, Svédország.

9. **Nyárády Z:** *Bioinformatic tools helping large scale sequencing.* UGSBR Poster, November 1997. Uppsala, Svédország (Poszter)

## **Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk:**

### **Folyóiratban megjelent, eredeti közlemények:**

1. **Nyárády Z,** Mörnstad H, Olasz L, Szabó Gy: *Dél-dunántúli gyermekek kormeghatározása a módosított Demirjian módszer alapján.* Fogorvosi Szemle 2005 98: 193-198.
2. Krajczár K, Tóth V, **Nyárády Z,** Szabó G: *Step-back technikával és GT Rotary File nikkel-titánium gépi forgóműszerrel végzett gyökércsatorna előkészítés in vitro vizsgálata* Fogorvosi Szemle 2005 98: 119-123.
3. **Nyárády Z,** Sári F, Olasz L, Nyárády J: *Modified submental endotracheal intubation in concurrent orthognathic surgery (Case report)* Mund-, Kiefer- und Gesichtskirurgie 2004 8: 387-389.
4. Olasz L, **Nyárády Z,** Németh A, Királyfalvi L, Ember I: *Failure of alkylating agents to improve induction chemotherapy of oropharyngeal squamous cell cancer.* Anticancer Res. 2004 24: 2557-2561. **IF 1.347**
5. Olasz L, Németh Á, **Nyárády Z,** Tornóczky T, Királyfalvi L: *Results and failures with or without cisplatin containing induction chemotherapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck.* Cancer Detect Prev. 2004 28: 65-71. **IF 1.18**
6. Németh A, Nádas E, Gyöngyi Z, Olasz L, **Nyárády Z,** Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Kiss I, Csejtey I, Ember I: *Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments.* Anticancer Res. 2003 23: 4831-4835.
7. Németh A, **Nyárády Z,** Ember Á, Beró T, Rodler I: *In vivo cisplatin kezelés hatása onkogének korai aktivációjára* Egészségtudomány 2003 47: 91-99.
8. Németh Á, Gyöngyi Z, Nádas E, Ember Á, Olasz L, **Nyárády Z,** Skapinyecz J and Ember I: *Effect of Cisplatin treatment on early oncogenes in vivo.* In Vivo 2002; 16: 307-310. **IF 1.115**
9. Olasz L, Németh Á and **Nyárády Z:** *Surgical closures of oropharyngocutaneous fistulas.* Plast Reconstr Surg. 2000 106: 1577-1581. **IF 1.423**
10. Olasz L, Németh Á, **Nyárády Z,** Tornóczky T and Királyfalvi L: *Kombinált ciszplatin-tartalmú kemoterápia randomizált vizsgálata a fej nyak régióban lévő planocelluláris rákok kezelésében.* Orvosi Hetilap 2000 141: 20433-2037.
11. Olasz L, Németh Á, Kubatov M and **Nyárády Z:** *Kiterjedt faciális defektusok kettős lebenyes rekonstrukciója.* Orvosi Hetilap 2000 141: 2079-2083.

### **Könyv fejezet:**

1. Olasz L, Gelencsér G, Rónai A, **Nyárády Z:** *Száj-garat daganatok terciér prevenciója.* In: Dózsa Cs, Sebestyén A: *Az onkológiai prevenció helyzete.* OEP, Pécs 2003, 175-186. ISBN 963 86339 0 5

## **Idézhető absztraktok:**

1. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Ember I, Olasz L: *Relieveing symptoms of xerostomia with oralpilocarpine (Salagen) during irradiation of the head and neck.* Int J Oral Maxillofac Surg 2005. 34: 149. **IF 0,754**
2. Olasz L, **Nyárády Z**, Tornóczky T, Kinczel G, Kulcsár Gy: *Neoadjuvant BMV chemotherapy + Culevit tablets in the treatment of head-and-neck cancer.* Int J Oral Maxillofac Surg 2005. 34: 26. **IF 0,754**
3. Németh Á, Nádas E, Gyöngyi Z, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Kiss I, Ember I: *Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancers on oncogene activation in animal experiments.* Hungarian Epidemiology 2005 1: S65
4. Olasz L, **Nyárády Z**, Tornóczky T, Kinczel G, Progner M, Kulcsár Gy: *Results of induction BVM chemotherapy + Culevit in treatment of head and neck cancer.* Hungarian Epidemiology 2005 1: S69
5. Németh Á, Varjas T, Beró A, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Csontos Zs, Arany I, Pázsit E, Czakó Gy, Ember I, Dombi Zs: *Early effects of transplatin on oncogene activation in vivo.* Hungarian Epidemiology 2005 1: S66
6. Németh Á, Varjas T, Beró A, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Csontos Zs, Arany I, Pázsit E, Czakó Gy, Ember I, Dombi Zs: *Investigation of gene expression levels of head and neck tumour patients.* Hungarian Epidemiology 2005 1: S67
7. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Mukics A, Szentirmai M, Ember I, Olasz L: *Short term results with pilocarpine (Salagen) during irradiation in oro-pharyngeal cancer releiving symptoms of xerostomia.* Hungarian Epidemiology 2005 1: S68
8. **Nyárády Z**, Olasz L, Gelencsér G, Kinczel G, Nyárády J: *Transgingival lag-screw (TLS) in osteosynthesis of alveolar process fracture.* J Craniomaxillofac Surg 2004 32: Suppl. **IF 0.75**
9. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Ember I, Olasz L: *Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head-and-neck cancer.* J Craniomaxillofac Surg 2004. 32: Suppl. **IF 0.75**
10. Olasz L, Kulcsár Gy, Tornóczky T, **Nyárády Z**, Kinczel G, Prantner I: *Results of neoadjuvant BVM chemotherapy + Culevit tablets for treatment of oro-pharyngeal cancer.* J Craniomaxillofac Surg 2004 32: Suppl. **IF 0.75**
11. **Nyárády Z**, Wingfeld J, Vástyán A, Lovász M, Olasz L, Pintér A: *Bone grafting of cleft lip and palate Patients: The experinence of the Pécs Cleft Team.* J Craniomaxillofac Surg 2004. 32: Suppl. **IF 0.75**
12. Olasz L, Kulcsár G, Tornóczky T, **Nyárády Z**, Kinczel G: *Improved results of neoadjuvant BVM chemotherapy using Culevit tablets as an adjuvant.* Cancer Detection and Prevention 2004. 28: Suppl. 410. **IF 1.18**
13. Olasz L, **Nyárády Z**, Németh Á, Rónai A, Gelencsér G: *The use of platysma myocutaneous transpositional flap to reconstruct massive trough-and-trough facial defects.* Int J Oral Maxillofac Surg 2003. 32: Suppl. 1.O 30.9. **IF 1.043**
14. **Nyárády Z**, Sári F, Olasz L, Gelencsér G: *Submental endotracheal intubation in concurrent orthognatic surgery.* Int J Oral Maxillofac Surg 2003. 32: Suppl. 1. O 39.8. **IF 1.043**
15. **Nyárády Z**, Olasz L, Németh Á: *Reconstruction of massive trough-and-trough facial defects using platysma transpositional flap.* J Craniomaxillofac Surg 2002. 30: Suppl.1. 33.
16. Olasz L, **Nyárády Z**, Németh Á, Rónai A, Gelencsér G: *Regional failure related to alkylating agents in neoadjuvant chemotherapy of oropharyngeal planocellular cancer.* J. Craniomaxillofac Surg 2002. 30: Suppl.1.103. **IF 0.75**
17. Rónai A, Olasz L, **Nyárády Z**, Gelencsér G: *A rare case of primary oral manifestation of malignant lymphoma.* J. Craniomaxillofac Surg 2002. 30: Suppl.1.165. **IF 0.75**
18. Németh Á, Gyöngyi Z, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Ember I: *The effect of cisplatin on early oncogene activation.* Anticancer Research 2001 21: Suppl **IF 1.324**

19. Olasz L, **Nyárády Z**, Szentirmay M: *Assessment of relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine during irradiation in head-neck cancer patients*. Cancer Detection and Prevention 2000. 24: Suppl. 1, 489. **IF 1.324**
20. Olasz L, **Nyárády Z**, Németh Á, Tornóczky T: *A randomized study of cisplatin-containing combined chemotherapy protocol*. Cancer Detection and Prevention 2000. 24: Suppl. 1, 665. **IF 1.324**

### Kongresszusi előadások:

1. **Nyárády Z**, Mandel I, Orsi E, Róthy Á, Németh Á, Nyárády J, Olasz L: *Felszívódó implantátumok traumatológiai alkalmazása az arc-állcsontsebészetben* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság IX. Nemzeti Kongresszusa, Október 20-22, 2005, Hévíz
2. **Nyárády Z**, Németh Á, Mukics A, Szentirmay M, Bán Á, Rónai A, Olasz L: *Sugárterápia alatt kialakuló szájszárazság (xerostomia) tüneteinek enyhítése pilokarpin tartalmú gyógyszerrel*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság IX. Nemzeti Kongresszusa, Október 20-22, 2005, Hévíz
3. **Nagy G**, Angyal M, Czömpöly T, **Nyárády Z**, Bajnóczky I: *Interpreting DNA evidence isolated from a self made firearm in a homicidal case*. 21st Congress of the International Society for Forensic Genetics, Szeptember 7-13, Ponta Delgada. Portugália
4. **Nagy G**, Nagy Zs, **Nyárády Z**, Bajnóczky I: *Y chromosome haplotypes in Roma and Caucasian populations from Hungary* 21st Congress of the International Society for Forensic Genetics, Szeptember 7-13, Ponta Delgada, Portugália
5. **Nagy G**, Nagy Zs, **Nyárády Z**, Bajnóczky I: *Allele frequencies for 15 STR loci in two populations from Hungary* 21st Congress of the International Society for Forensic Genetics, Szeptember 7-13, Ponta Delgada, Portugália
6. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Ember I, Olasz L: *Relieveing symptoms of xerostomia with oralpilocarpine (Salagen) during irradiation of the head and neck*. 17th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Augustus 29-Szeptember 2, 2005, Bécs, Ausztria (Poszter)
7. **Olasz L**, **Nyárády Z**, Tornóczky T, Kinczel G, Kulcsár Gy: *Neoadjuvant BMV chemotherapy + Culevit tablets in the treatment of head-and-neck cancer*. 17th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Augustus 29-Szeptember 2, 2005, Bécs, Ausztria
8. **Nyárády Z**, Rónai A, Kinczel G, Szalma J, Olasz L: *Kumarinizált betegek szájsebészeti ellátása LMWH védelemben*. Szeged 2005 Tudományos Továbbképző Konferencia és Fogorvostalálkozó, Április 22-24, 2005, Szeged
9. **Olasz L**, **Nyárády Z**, Tornóczky T, Kinczel G, Progner M, Kulcsár Gy: *Results of induction BVM chemotherapy + Culevit in treatment of head and neck cancer*. II<sup>nd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Április 1-2, 2005, Pécs
10. **Németh Á**, Varjas T, Beró A, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Csontos Zs, Arany I, Pázsit E, Czakó Gy, Ember I, Dombi Zs: *Early effects of transplatin on oncogene activation in vivo*. II<sup>nd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Április 1-2, 2005, Pécs (Poszter)
11. **Németh Á**, Varjas T, Beró A, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Csontos Zs, Arany I, Pázsit E, Czakó Gy, Ember I, Dombi Zs: *Investigation of gene expression levels of head and neck tumour patients*. II<sup>nd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Április 1-2, 2005, Pécs (Poszter)
12. **Németh Á**, Nádas E, Gyöngyi Z, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Kiss I, Ember I: *Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancers on*

- oncogene activation in animal experiments*. II<sup>nd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Április 1-2, 2005, Pécs (Poszter)
13. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Mukics A, Szentirmai M, Ember I, Olasz L: *Short term results with pilocarpine (Salagen) during irradiation in oro-pharyngeal cancer relieving symptoms of xerostomia*. II<sup>nd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Április 1-2, 2005, Pécs, Hungary (Poszter)
  14. **Nyárády Z**, Olasz L, Gelencsér G, Kinczel G, Nyárády J: *Transgingival lag-screw (TLS) in osteosynthesis of alveolar process fracture*. XVIIth European Congress for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 14-18, 2004, Tours, Franciaország
  15. **Nyárády Z**, Németh Á, Bán Á, Ember I, Olasz L: *Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head-and-neck cancer*. XVIIth European Congress for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 14-18, 2004, Tours, Franciaország (Poszter)
  16. **Olasz L**, Kulcsár Gy, Tornóczky T, **Nyárády Z**, Kinczel G, Prantner I: *Results of neoadjuvant BVM chemotherapy + Culevit tablets for treatment of oro-pharyngeal cancer*. XVIIth European Congress for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 14-18, 2004, Tours, Franciaország (Poszter)
  17. **Nyárády Z**, Wingfeld J, Vástyán A, Lovász M, Olasz L, Pintér A: *Bone grafting of cleft lip and palate Patients: The experience of the Pécs Cleft Team*. XVIIth European Congress for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 14-18, 2004, Tours, Franciaország (Poszter)
  18. **Olasz L**, Kulcsár Gy, Tornóczky T, **Nyárády Z**, Kinczel G, Prantner I: *Results of neoadjuvant BVM chemotherapy + Culevit tablets for treatment of oropharyngeal cancer*. 5th International Danubius Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Április 29 – Május 1, 2004, Budapest
  19. **Nyárády Z**, Olasz L, Gelencsér G, Kinczel G, Zoltán K, Göbel Gy, Nyárády J: *Transgingival dynamic compression screw (TGDCS) in osteosynthesis of alveolar process fractures*. 5th International Danubius Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Április 29 – Május 1, 2004, Budapest
  20. **Nyárády Z**, Sári F, Olasz L, Rónai A, Gelencsér G, Nyárády J: *Submental endotracheal intubation in concurrent ortognathic surgery*. The 7th European Craniofacial Congress, November 20 – 22, 2003, Bologna, Olaszország
  21. **Nyárády Z**, Olasz L, Vastyán A, Pintér A, Lovász M, Kopcsányi G, Vincze O, Kárpáthy M, Eperjesi B: *Bone grafting of cleft lip and palate children: The experience of the Pécs Cleft Team*. The 7th European Craniofacial Congress, November 20 – 22, 2003, Bologna Olaszország (Poszter)
  22. **Kinczel G**, Olasz L, Rónai A, Gelencsér G, **Nyárády Z**: *Benzynamid-chlorid lokális alkalmazása gyermekek fogeltávolítása során*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs (Poszter)
  23. **Olasz L**, Elek L, Rónai A, **Nyárády Z**, Gelencsér G: *Klinikai tapasztalataink szternokleidomastoideus myocutan lebennyel*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs
  24. **Gelencsér G**, Olasz L, **Nyárády Z**, Rónai A: *Kombinált zygomatico-orbitális törés ellátásának tanulságai – esetismertetés*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs
  25. **Nyárády Z**, Szentirmay M, Bán Á, Rónai A, Gelencsér G, Olasz L: *Sugárterápia alatt kialakuló szájszárazság (xerostomia) tüneteinek enyhítése pilokarpin tartalmú gyógyszerrel. (Előzetes eredmények)*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs (Poszter)
  26. Németh Á, **Nyárády Z**, Kámán A, Ember Á, Faluhelyi Zs, Csejtey I, Kvarda A: *Citosztatikus protokollok hatása onkogének korai aktivációjára* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs (Poszter)
  27. **Nyárády Z**, Mörnstad H, Olasz L: *Dél-dunántúli gyereke kormeghatározása matematikai függvényekkel a módosított Demirjain módszer alapján*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Nemzeti Kongresszusa, November 16-18, 2003, Pécs, (Poszter)

28. **Nyárády Z:** *Szubmentális intubáció az orthodonciai sebészetben.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság Pannon Szekciójának XI. Gyűlése, Május 31, 2003, Szekszárd
29. **Nyárády Z,** Sári F, Olasz L, Rónai A, Gelencsér G: *Submental endotracheal intubation in concurrent orthognathic surgery,* 16<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Május 14-20, 2003, Athén, Görögország
30. **Olasz L, Nyárády Z,** Gelencsér G, Rónai A: *The use of platysma myocutaneous transpositional flap to reconstruct massive through-and-through facial defects,* 16<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Május 14-20, 2003, Athén, Görögország
31. **Gelencsér G, Nyárády Z:** *Szájüregi daganatos betegek korszerű fájdalomcsillapítása.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság Pannon Szekciójának X. Gyűlése, November 23, 2002, Pécs
32. **Nyárády Z,** Olasz L, Németh Á, Gelencsér G: *Platysma lebeny alkalmazása nagy kiterjedésű defektusok zárására.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság Pannon Szekciójának X. Gyűlése, November 23, 2002, Pécs
33. **Nyárády Z,** Pintér A, Olasz L, Vastyán A, Lovász M, Kopcsányi G, Vincze O, Kárpáthy M, Eperjesi B: *Ajak és szájpadhasadékos gyermekek csontpotlásábvál szerzett tapasztalatink: A Pécsi Hasadék Munkacsoport előadása.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VI. Nemzeti Kongresszusa, November 10-12, 2002, Szombathely
34. **Rónai A, Nyárády Z,** Gelencsér G, Olasz L: *Malignus lymphoma primer orális manifestatiojanak ritka esete: Esetbemutatás. .* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VI. Nemzeti Kongresszusa, November 10-12, 2002, Szombathely
35. **Olasz L, Nyárády Z,** Gelencsér G, Rónai A: *Oro-pharyngeális daganatok kombinált kezelésének lehetőségei és előnyei. .* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság VI. Nemzeti Kongresszusa, November 10-12, 2002, Szombathely
36. **Nyárády Z,** Mörnstad H: *Mathematical functions for age estimation of Hungarian children using the modified Demirjian method.* HDA Árkövy – FDI World Dental Congress 2002, Október 1-5, 2002, Bécs, Austria
37. **Olasz L, Nyárády Z,** Németh Á, Rónai A, Gelencsér G: *Regional failure related to alkylating agents in neoadjuvant chemotherapy of oropharyngeal planocellular cancer.* XVI<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 3-7, 2002, Münster, Németország
38. **Nyárády Z,** Olasz L, Németh Á: *Reconstruction of massive through-and-through facial defects using platysma transpositional flap.* XVI<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 3-7, 2002, Münster, Németország
39. **Rónai A, Nyárády Z,** Gelencsér G, Olasz L: *A rare case of primary oral manifestation of malignant lymphoma.* XVI<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Szeptember 3-7, 2002, Münster, Németország
40. **Olasz L,** Gelencsér G, **Nyárády Z,** Rónai A: *Metastatic failure related alkylating agents in induction chemotherapy of oropharyngeal planocellular cancer.* 4<sup>th</sup> Danubius Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Április 24-27, 2002, Rovinj, Horvátország
41. **Rónai A,** Olasz L, Gelencsér G, **Nyárády Z:** *Rare case of primary oral manifestation of malignant lymphoma.* 4<sup>th</sup> Danubius Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, April 24-27, 2002, Rovinj, Horvátország (Poszter)
42. Németh Á, **Nyárády Z:** *Daganatok molekuláris epidemiológiája. „Mandulavirágzási Napok”* Március 4-8, 2002, Pécs—Szekszárd
43. **Olasz L,** Gelencsér G, **Nyárády Z,** Rónai A: *A kombinált terápia előnye előrehaladott carcinómás betegek ellátásában.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság V. Nemzeti Kongresszusa, November 30-December 1, 2001, Budapest
44. **Olasz L, Nyárády Z,** Pintér A, Vastyán A, Lovász M, Kopcsányi G, Vincze O, Kárpáthy M, Eperjesi B: *A Pécsi Hasadék munkacsoport klinikai gyakorlata.* Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság V. Nemzeti Kongresszusa, November 30-December 1, 2001, Budapest

45. **Nyárády Z**, Olasz L, Rónai A, Gelencsér G: *Alternatív megoldás az intraoperatív okklúzió biztosítására*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság V. Nemzeti Kongresszusa, November 30-December 1, 2001, Budapest (Poszter)
46. Rónai A, Olasz L, **Nyárády Z**, Gelencsér G: *Impactált és számfeletti fog együttes előfordulásának ritka esete*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság V. Nemzeti Kongresszusa, November 30-December 1, 2001, Budapest (Poszter)
47. **Nyárády Z**, Pintér A, Olasz L, Vastyán A, Lovász M, Kopcsányi G, Vincze O, Kárpáthy M, Eperjesi B: *Clinical practice of Pécs Cleft Lip and Palate Team. Video presentation*. The 9<sup>th</sup> International Congress on Cleft Palate and Related Anomalies, Június 25-29, 2001, Göteborg, Svédország
48. **Nyárády Z**, Pásztor E, Olasz L, Szabó Gy: *Submental endotracheal intubation in concurrent orthognatic surgery*. The 9<sup>th</sup> International Congress on Cleft Palate and Related Anomalies, Június 25-29, 2001, Göteborg, Svédország (Poszter)
49. Németh Á, Gyöngyi Z, Olasz L, **Nyárády Z**, Ember Á, Ember I: *The effect of cisplatin on early oncogene activation in vitro*. 2001, Görögország (Poszter)
50. **Pintér A**, Vastyán A, Vincze O, Lovász M, Kárpáthy M, Eperjesi B, Kopcsányi G, Olasz L, **Nyárády Z**: *Hasadékos betegek komplex ellátása*. "Zala" Szimpózium a Gyermekgyógyászat Aktuális Kérdéseiről. Május 16, 2001, Zalaegerszeg
51. **Nyárády Z**, Németh Á: *Effects of cisplatin-containing chemotherapy protocol on the molecular epidemiology of head-and-neck cancers*. FEBI Symposium of Young Oncologists, Május 11, 2001, Pécs
52. **Olasz L**, **Nyárády Z**, Szentirmay M: *Assessment of relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine during irradiation in head-and-neck cancer patients*. 5<sup>th</sup> International Symposium of Predictive Oncology and Therapy, Október 28-31, 2000, Genf, Svájc
53. **Olasz L**, **Nyárády Z**, Németh Á, Tornóczy T: *A randomized study of cisplatin-containing combined chemotherapy protocol*. 5<sup>th</sup> International Symposium of Predictive Oncology and Therapy, Október 28-31, 2000, Genf, Svájc
54. **Nyárády Z**, Olasz L, Németh Á, Tornóczy T: *A randomized study of cisplatin-containing combined chemotherapy in head and neck planocellular cancers*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság IV. Nemzeti Kongresszusa, Október 26-28, 2000, Debrecen
55. Németh Á, Ember I, **Nyárády Z**, Olasz L: *Molecular and predictive epidemiology of head and neck tumors*. Magyar Arc- Állcsont és Szájsebészeti Társaság IV. Nemzeti Kongresszusa, Október 26-28, 2000, Debrecen
56. **Szántó I**, **Nyárády Z**, Szabó Gy, Solti P: *Prosthetic rehabilitation of an advanced sclerodermic patient*. Magyar protetikai Társaság XIII. Kongresszusa, Szeptember 17-19, 1999, Pécs (Poszter)
57. **Olasz L**, Németh Á, **Nyárády Z**, Tornóczy T: *A randomized clinico-pathological study of cisplatin (preliminary results)*. A Magyar Kemoterápiái Társaság XIV. Kongresszusa, Június 2-4, 1999, Pécs
58. **Nyárády Z**, Mörnstad H: *Dental development of Hungarian Children*. UGSBR Conference, Február 1997, Uppsala, Svédország