

BIOKÉMIA

1987. VI. 2

A Magyar Biokémiai Egyesület
tájékoztatója

Quarterly Review of the
Hungarian Biochemical Society

Szerkesztő bizottság : Alkonyi István, Bagdy Dániel, Falus András
Gaál József, Gergely Pál, Huszti Zsuzsa,
Sarkadi Balázs, Solymosy Ferenc és Szász Ilma
Felelős szerkesztő : Bagdy Dániel
Technikai szerkesztő : Bagdy Erzsébet

+

A tartalomból :

Uridinben gazdag nukleáris kis RNS-ek és RNP-k
Géntechnológiai eredmények az ipari mikrobiológiában
FEBS - hírek
FEBS Advanced Course Gödön
FEBS Advanced Courses 1987
Guidelines for one year FEBS Fellowships

B(é)kadémiai szemle - a Biokémia satirikus melléklete)
Hírek és események

+

Contents

Nuclear small RNAs and RNPs rich in uridine
Genetic engineering in industrial microbiology
FEBS News
FEBS Advanced Course on Immunological Methods and
Application, Göd, 1986.
FEBS Advanced Courses 1987
Guidelines for one year FEBS Fellowships

A satirical report on science-politics

+

E számunk szerzői :

Arányi Péter SOTE II. Kémiai-Biokémiai Intézet
Kiss Tamás MTA SzBK Növényélettani Intézet
Sarkadi Balázs Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet
Solymosy Ferenc MTA SzBK Növényélettani Intézet
Szentirmay Attila KLTE Mikrobiológiai Intézet

Uridinben gazdag nukleáris kis RNS-ek és RNP-k[§]

Napjainkban a molekuláris biológia alapvető kérdése a génexpresszió szabályozása eukariótákban. Ennek az igen komplex folyamatnak egyik lépése a transzkripció során a sejtmagban keletkezett nagy molekulatömegű prekursor RNS molekulák (pre-mRNS, pre-rRNS) érése, vagyis a citoplazmában működni képes molekulákká alakulása. Újabban egyre több adat szól amellett, hogy itt a sokáig teljesen ismeretlen funkciójú U-snRNA-k legtöbb (valószínűleg valamennyi) tagja fontos szerepet játszik. Egyrészt emiatt, másrészt amiatt, mert az U-snRNA-k néhány tagjának működési módjára még mindig nem derült fény, ugyanakkor a közelmúltban sok olyan, merőben új módszerek (bevitt gének expresszáltatása *Xenopus* oocitákban, in vitro transzkripciós rendszerek használata) alapuló kísérleti megközelítési mód alkalmazására nyílt lehetőség, amelyek révén az U-snRNA-k és U-snRNP-k struktúrájának és főleg funkciójának felderítése területén nagy előrelépésekre számíthatunk, úgy gondoljuk, megérett a helyzet arra, hogy a sejtmagban előforduló RNS-ek eme érdekes csoportjáról jelenlegi ismereteink alapján összefoglaló képet adjunk. Harmadik indokunk az összefoglaló megírására az volt, hogy munkacsoportunk a növényi snRNA-k vizsgálata területén elért néhány eredményéről a VI. Nukleinsav Munkaértekezleten (Siófok, 1986 ápr. 27-30) beszámolt, és ezek rövid ismertetése teljesebb értékűnek tűnik, ha azt általános alapokra helyezve tesszük.

Előzmények: Az U-snRNA-k felismerése, izolálása és kezdeti karakterizálása

Sejtorganellumok izolálása, radioaktív izotóppal való jelölések, valamint a "klasszikus" nukleinsav-analitikai módszerek fejlődése révén a 60-as évek elejére egyre világosabbá vált, hogy a mRNS prekursorai (pre-mRNS vagy tágabb értelemben hnRNS) a sejtmagban, az rRNS-éi (pre-rRNS) pedig a sejtmagvacskában szintetizálódnak.

Amikor ezekkel a "klasszikus" módszerekkel Busch és munkatársai patkány májsejtek sejtmagvaiból és sejtmagvacskáiból izolálható RNS-fajtákat, különös tekintettel a prekursor RNS-ekre, mintegy feltérképezték, azt találták,

[§]Rövidítések: ANA, antinukleáris ellenanyag (antibody); c, komplementer; ETS, external transcribed spacer (külső átírt összekötő szakasz); h, heterogén; ITS1 és ITS2, internal transcribed spacers 1 and 2 (1. és 2. sz. belső átírt összekötő szakaszok); K, kilodalton; m, messenger; MCTD, mixed connective tissue disease (egy autoimmun betegség); N, purin vagy pirimidin nukleotid; n, nukleáris; PAG(E), poliakrilamid-gél (elektroforézis); Pu, purin nukleotid; Py, pirimidin nukleotid; r, riboszomális; RNA, RNS; RNáz, ribonukleáz; RNP, ribonukleoprotein; RNS, ribonukleinsav; s, kis (small); S, szedimentációs koefficiens; SLE, systemic lupus erythematosus (egy autoimmun betegség); t, transzfer; U-snRNA, uridinben gazdag kis sejtmagi RNS (a uridine-rich small nuclear RNA nemzetközi rövidítésnek megfelelően; ezt a rövidítést a szövegben magyar toldalékokkal látjuk el); U-snRNP, U-snRNA-t tartalmazó RNP; U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8, U9, és U10, az U-snRNA molekulacsoport meghatározott fajtái; X, ismeretlen szerkezetű molekula.

hogy a sejtmagban és nukleoluszban a nagy molekulatömegű prekursor RNS-ek mellett mindig jelentkezett a sűrűséggradiensekben egy kis molekulatömegű (4-6S) RNS "fajta" (Muramatsu és mtsai, 1963; Muramatsu és Busch, 1964), amelynek egy későbbi dolgozatukban leírtak alapján (Muramatsu és mtsai, 1966) A+U tartalma nagyobb volt, mint a többi nukleáris és nukleoláris RNS-é, és a nukleoláris 6S RNS a prekursor RNS-eknél lassabban jelölődött.

A Busch-laboratóriuméhoz hasonló felfedezést tettek Larsen és mtsai (1967) tenyésztett KB sejtekből extrahált össz-RNS frakcionálása során. A kapott "8S RNS"-ről kimutatták, hogy az a sejtmagokban lokalizált, hiányzik az extranukleáris (citoplazmatikus) frakcióból, és metabolikusan stabil, vagyis nem prekursor jellegű.

Későbbi vizsgálatok azt bizonyították, hogy megfelelő felbontóképességű rendszerben (PAGE) a korábban 4-6S-sel (8S) jelölt kis molekulatömegű nukleáris RNS valójában több, diszkrét RNS fajtából (snRNA-ból) álló molekulacsaldót képvisel (Knight és Darnell, 1967; Dingman és Peacock, 1968).

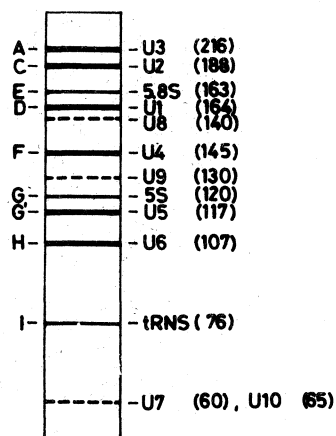
Ezek után került sor az egyes snRNA-k behatóbb vizsgálatára. Először a Busch-laboratórium egy par excellence nukleoláris snRNA jelenlétét mutatta ki patkánymáj sejtekből (Nakamura és mtsai, 1968) és utalt annak viszonylag nagy A+U tartalmára és aminosav akceptor-aktivitás mentességére. Később ezt az snRNA-t U3-nak nevezték el a szintén nagy (mintegy 27%) uridintartalmú (innen van az U betű) és aminosav akceptor-aktivitás nélküli egyéb (U1_a, U1_b és U2) nukleoplazmatikus kis RNS-ek mellett (Hodnett és Busch, 1968).

1. ábra

Eukarióták sejtmagvaiban jelenlevő kis molekulatömegű

RNS-ek (denaturáló) PAGE profilja

Az ábra bal oldalán a Weinberg és Penman (1968) által alkalmazott betűjelöléseket, jobb oldalán pedig a Busch-laboratórium által bevezetett és ma már csaknem kizárólag használatos jelöléseket tüntettük fel. A zárójelben lévő számok az egyes RNS molekulákat felépítő nukleotidok gerincesekre jellemző számát adják meg a "sapkát" nem számítva. A vastag vonalak a hat "fő" U-snRNA-t, a szaggatottak az igen kis mennyiségekben előforduló "minor" U-snRNA-kat jelölik, a vékony vonalak pedig a nem U-típusú, citoplazmatikus, de sejtmagpreparátumokban mindig jelen levő kis RNS molekulák pozícióit tüntetik fel.



A legalaposabb, legtisztább munka az U-snRNA-kat illetően 1968-ban Weinberg és Penman (1968) tollából jelent meg (1. ábra). Ők a sejtmagi kis RNS-ek izolálásához jól jelölhető HeLa sejteket használtak, tehát végig könnyen kezelhető mennyiségekkel dolgoztak. Munkájuk úttörő jellege, azon kívül, hogy

(i) négy (U7-U10) kivételével valamennyi ma ismert U-snRNA molekulafajtát detektálták, sőt egy sejtmagra vonatkoztatott számát (molekulafajtától függően 10^4 - 10^6 között) is megadták

(ii) és ezek eloszlását a sejtmagon belül (bár helyenként tévesen) leírták, abban van, hogy

(iii) az snRNA-k nagyságát (bár alábecsülve) meghatározták,

(iv) kimutatták, hogy az snRNA-k közül legalább 4 fajta metilált nukleozidokat tartalmaz és ezek számát is megbecsülték molekulánként,

(v) valamennyi snRNA bázisösszetételét meghatározták,

(vi) megerősítették, hogy az snRNA-k "hosszú élettidejűek", tehát nem prekursor jellegűek (lásd még Weinberg és Penman, 1969),

(vii) felhívták a figyelmet arra, hogy ezek a sejtmagi kis RNS molekulák a HeLa sejteken kívül egyéb gerincesek sejtjeiben is előfordulnak és lehet, hogy általában az eukarióta sejt általános alkotórészei, és végül

(viii) felvetették annak lehetőségét, bár nem tartották valószínűnek, hogy az U-snRNA-k in vivo nukleoprotein komplexek formájában fordulnak elő.

Még 1968-ban Prestayko és Busch (1968) elsőként mutattak rá arra, hogy az U-snRNA-k in vivo proteinekkal komplexálva fordulnak elő: az U-ban gazdag ú.n. "7S RNS" 90%-át egy ú.n. kromatin frakcióban találták. Szinte jövendőlésszámba megy dolgozatuk utolsó mondata, amely szerint "lehetséges, hogy ezek a kis molekulák fontosak a kromoszómák génexpressziójának regulálásában".

Az U-snRNA-k kutatásának eddig ismertett kezdeti korszaka azzal a felismeréssel zárult, hogy az U-snRNA-k a gerincesek sejtmagjainak univerzálisan előforduló molekulakomponensei (elsősorban Rein és Penman, 1969).

Az 1963 és 69 között eltelt 7 év alatt, mint láttuk, az U-snRNA-k mind a mai napig számon tartott 6 "fő" tagjának kezdeti karakterizálása megtörtént:

1. Szerkezetükre vonatkozólag hozzávetőleges nagyságuk és bázisösszetételük ismertté vált és kiderült az is, hogy metilált nukleozidokat tartalmaznak. Ahhoz, hogy primér (1.1) és szekundér (1.2) struktúrájuk is meghatározható legyen, olyan további metodikák kifejlesztésére volt szükség, amelyek a 60-as évek végén éppen születőben, vagy meg sem voltak. Bár az kiderült, hogy ezek a molekulák valamennyi addig vizsgált eukariótában előfordulnak (PAGE profilok hasonlósága), e tény filogenetikai vonatkozásainak (1.3) finomabb analízise éppen a szerkezetvizsgáló módszerek kezdetlegessége miatt nem történhetett meg.

2. Lokalizációjukat illetően egyértelmű igazolást nyert, hogy a sejten belül (2.1) a sejtmagban vannak, az U3 a nukleoluszban, ezenkívül néhány kezdeti adat mellett szót, hogy a sejtmagon belül (2.2) proteinekkal komplexálva fordulnak elő, de e komplexeket, elsősorban egy csak később felfedezett immunológiai megközelítési mód (Lerner és Steitz, 1979) hiányában, pontosan nem tudták jellemezni.

3. Bioszintézisüket illetően ismertté vált, hogy metacolikusan stabilak, tehát nem prekursor jellegű molekulák. Olyan kérdések azonban, hogy a transzkripció során az U-snRNA-knak önmaguknak milyen természetű prekursorai (3.1) keletkeznek, hogy ezek létrejöttében milyen enzimek (3.2) szerepelhetnek és hogy az átírás milyen génszakaszokról (3.3) történik, még gondolati szinten sem jelentkeztek.

4. Funkciójukat illetően kiderült, hogy nincs aminosavceptor aktivitásuk.

De arra a kérdésre, hogy valóban mi a funkciójuk, az akkori ismeretek birtokában meg sem lehetett kísérelni konkrét választ adni. Előbb a nagy molekulatömegű prekursor RNS-ekérésével járó nukleáris és nukleoláris folyamatokról kellett egy általános képnek (4.1) kialakulni ahhoz, hogy az egyes U-snRNA-k (U-snRNP-k) funkciójára (4.2) eleinte modell-szinten, majd áttörés jellegű kísérleti szinten fény derüljön, sőt kirajzolódjanak az idevonatkozó kutatások jövő várható irányai (4.3).

A továbbiakban a felsorolt témák sorrendjében foglaljuk össze az U-snRNA-kra vonatkozó jelenlegi ismereteinket, és kiemelten vázoljuk a

5. Növényi U-snRNA-k szerkezetéről (5.1.), lokalizációjáról (5.2.), bioszintéziséről és transzkripciójáról (5.3.) valamint funkciójáról (5.4.) tudottak mai állását.

1. Az U-snRNA-k szerkezete

1.1. Primér struktúra

Helyhiány miatt képtelenség azokon a heroikus munkát tükröző kísérleteken részleteikben végigmenni, amelyeknek klasszikus, ma már idejétmúltnak számító, nehézkes módszerekkel elért eredményei a 70-es évek elején kerültek közlésre az U-snRNA-k primér struktúráját illetően. Erről a korszakról jó áttekintést ad Ro-Choi és Busch (1974).

A nyolcvanas évek legelejére mind a hat "fő" U-snRNA teljes primér szerkezete megvolt patkányból, a 80-as évek közepéig pedig a legkülönbözőbb, filogenetikailag igen távol álló organizmusokból izolálták és, elsősorban a gyors RNS és DNS szekvenálási módszerek kidolgozásának jóvoltából, szekvenálták a "fő" U-snRNA-kat (a szekvenciákat lásd Reddy, 1986), valamint néhány új U-snRNA fajtát írtak le (lásd lejjebb).

Valamennyi eddig szekvenált U-snRNA primér szerkezete az alábbi közös vonásokat mutatja:

(i) 5' végükön sapkázottak. A sapka az U6 kivételével $m_3^{2,2,7G}$.

(ii) A sapkát rendszerint közvetlenül két 2'-O-metilált nukleozid követi, amelyek közül az első 2'-O-metil adenzin.

(iii) A molekula belsejében modifikált nukleozidok vannak. Ezek: pszeudouridin, 2'-O-metilnukleozidok, N6-metiladenozin és N2-metil guanozin.

(iv) Számos U-snRNA, különösen az U5 (cf. Krol és mtsai, 1983), kisebb mértékben az U1, U3, és U4 (cf. Jacob és mtsai, 1984), a forrásként szolgáló organizmusra jellemző módon több variáns formájában fordul elő. Ezek a variánsok vagy a 3' vég heterogenitásban vagy molekulán belüli báziscserékben (mikroheterogenitás) különböznek egymástól.

(v) A különböző U-snRNA fajták egymás között kisebb-nagyobb fokú szekvenciahomológiát mutatnak, amely azonban csak részben kolineáris, egyébként bizonyos homológ szekvenciablokkoknak az egyes U-snRNA-kban váltakozó sorrendben való elhelyezkedésében jelenik meg (cf. Reddy és Busch, 1981). Kimondott kolineáris szekvenciahomológia van az U1 és U4 között (cf. Busch és mtsai, 1982).

A hat fő U-snRNA-n kívül ma már további két U-snRNA (1. ábra) szekvenciája ismert: az egyiket tengeri sünből izolálták és U7-nek nevezték (Strub és mtsai, 1984), a másikat mind egér (Kato és Harada, 1984) mind patkány Novikoff hepatoma sejtek nukleuszaiból (Reddy és mtsai, 1985a) izolálták és

az U8 nevet adták neki. Reddy és mtsai (1985a) a preferenciálisan nukleoláris lokalizációjú U8 kimutatása során a PAG-en még két kis nukleáris RNS fajta jelenlétét detektálták. Ezeket tentative U9 és U10-nek nevezték el (1. ábra).² Még semmi közelebbi nem ismeretes róluk, csak annyi, hogy 5' végükön $m_3^{2,2,7}$ G-vel sapkázottak és nem a "fő" U-snrRNA-k degradációs termékei.

E "minor" U-snrRNA-k izolálását, de számos "fő" U-snrRNA detektálását is a legkülönbözőbb organizmusokból egy alapvető metodika hallatlanul megkönnyítette. A módszer lényege az, hogy az U6 kivételével valamennyi U-snrRNA molekula az 5'-végén jelenlevő $m_3^{2,2,7}$ G-sapkájánál fogva mintegy kihalászható valamely RNS-molekula populációból az $m_3^{2,2,7}$ G-vel mint haptennel szemben készített specifikus ellenanyag alkalmazása révén (Lührmann és mtsai, 1982).

1.2. Szekundér struktúra

Az U-snrRNA-k legvalószínűbb szekundér struktúráját első fokon komputeres modellezéssel a maximális termodinamikai stabilitást biztosító paraméterek figyelembevételével, másodfokon az így nyert adatokat felhasználva kísérleti úton határozták meg. Ez utóbbi esetben egyfonalas és kétfonalas régiókat specifikusan hasító nukleázokat alkalmaztak, nem-denaturáló és részlegesen denaturáló körülmények között. Ezeknek a vizsgálatoknak legérdekesebb eredménye annak kimutatása volt (Branlant és mtsai, 1982), hogy pl. patkány májsejtek magvaiból izolált U1, U2, U4 és U5 másodlagos szerkezete közös strukturális elv szerint épül fel (2. ábra). A nukleotidok döntő többsége hajtú-struktúrákban (I-V) van, és csak I (U5), 2 (U1 és U4) vagy 3 (U2) szabad egyszálú régió található bennük. A III és IV (U1, U2 és U4) illetve II és IV (U5) hajtú-struktúra között levő szabad egyszálú régió mind a négy U-snrRNA esetében egy Pu-A-(U)-G-Pu konszenzus szekvenciájú domént tartalmaz (A domén). Az A domént a 3' vég felől határoló IV hajtú-struktúra hurkjában szintén egy konszenzus szekvencia (Py-N-Py-G) található. A patkány U6-ra (Harada és mtsai, 1980; Epstein és mtsai, 1980) és U3-ra (Bernstein és mtsai, 1983,) kapott másodlagos szerkezet-modellek egyike sem rendelkezik a fenti jellemzőkkel (2. ábra).

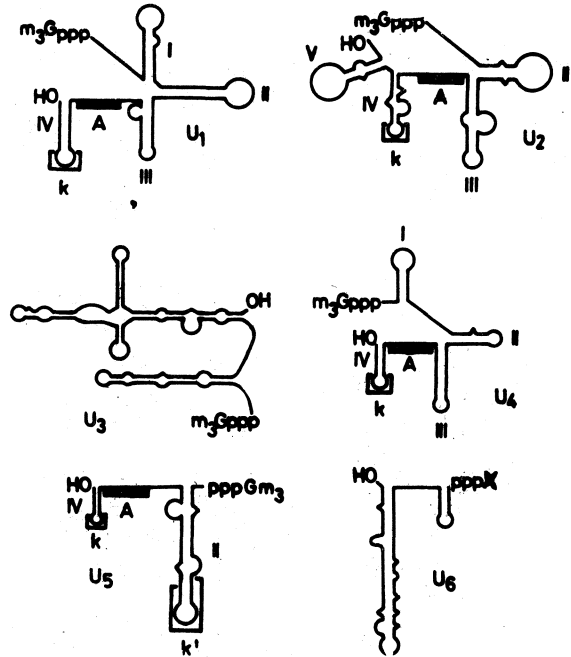
1.3. Filogenetikai vonatkozások

A legkülönbözőbb, filogenetikailag olyan távol álló organizmusokból, mint egy növény és az ember, származó U-snrRNA-k szerkezeti vizsgálatából levonható alapvető következtetés az, hogy ezek a molekulák az eukarióta organizmus sejtmagvainak univerzális és erősen konzervált struktúrájú (tehát feltehetően nélkülözhetetlen funkciójú) komponensei. Ezt a megállapítást az alábbi adatok támasztják alá:

1.3.1. Az azonos típusú U-snrRNA-k molekulahossza gyakorlatilag nem változott a törzsfajlás során, általában 3-5 nukleotid a hosszkülönbség. Még a legnagyobb különbség (dinoflagellata U5 és borsó U5 között) sem több 14 nukleotid-hossznál (cf. Reddy, 1986). Ujabban olyan kép van kialakulóban, amely szerint egyes organizmus(csoport)okban a "klasszikus" U-snrRNA profilt egy (annál heterogénebb) "U-snrRNA ekvivalens" profil helyettesíti (egészíti ki). Jellemző példa erre a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő (Tollervey és mtsai, 1983; Guthrie, 1986; Riedel és mtsai, 1986; Ares, 1986) és bizonyos fokig a *Trypanosoma brucei* (Tschudi és mtsai, 1986).

2. ábra
U-snrRNA-k szekundér struktúrái

Az U1, U2, U4 és U5 szekundér struktúráit Jacob és mtsai (1984), az U3-ét Bernstein és mtsai (1983), az U6-ét pedig Harada és mtsai (1980) munkáiból vettük. A római számok a karokat jelentik, A az A domént, k a IV kar véghurokjában lévő konszenzus szekvenciát, k' pedig az eddig szekvenált valamennyi U5 II karjában meglévő azonos és az avocado sunblotch viroiddal nagyfokú szekvenciahomológiát (Kiss és Solymosy, 1982, Solymosy, 1983; Solymosy és Kiss, 1985) mutató szakaszt jelöli.



1.3.2. Az azonos típusú U-snrRNA-k primér struktúrája meglehetősen konzervált, de tükrözi az egyes organizmusok törzsfajlódási távolságát. Így pl. csirke U1A és patkány U1A között 96% (Branlant és mtsai, 1980), *Drosophila* U1 és humán U1 között 72% (Mount és Steitz, 1981), *Tetrahymena* U5 és humán U5 között 56% (Branlant és mtsai, 1983) *Dictyostelium* U3 és patkány U3 között pedig 40% (Wise és Weiner, 1980) szekvenciahomológia van.

1.3.3. Ezzel szemben valamennyi eddig vizsgált esetben az azonos típusú U-snrRNA-k szekundér struktúrája teljesen azonos az evolúció szempontjából egymástól igen távoli organizmusok esetében is. Legszébb példa erre az U5 szekundér struktúrája, amely teljesen azonosnak adódik, akár emlősből, madárból, *Tetrahymena*-ből, borsóból, dinoflagellátából, vagy selyemhernyóból származik (Branlant és mtsai, 1983; Krol és mtsai, 1983; Liu és mtsai, 1984; Adams és mtsai, 1985). Ugyancsak meggyőzőnek tűnik a patkány U3B, a *Dictyostelium* U3 és a lóbab U3 másodlagos szerkezetének teljes azonosága (Bernstein és mtsai, 1983; Kiss és mtsai, 1985). Úgy látszik tehát, hogy az snRNA-k primér struktúrájában a törzsfajlódás során bekövetkező változások kompenzatórikusak voltak, tehát nem érintették a másodlagos szerkezetet. Ez arra mutat, hogy a másodlagos szerkezetnek meghatározó szerepe van az egyes U-snrRNA-k funkciójában.

1.3.4. Törzsfajlódásileg egymástól igen távol levő organizmusokból izolált azonos típusú U-snrRNA-k konszenzus szekvenciákat tartalmaznak. Több ilyenre van példa:

(i) Az A domén (2. ábra) az egész törzsfajlódás során abszolút konzervált. Eredeti felfedezése (Branlant és mtsai, 1982) óta valamennyi forrásból izolált U1, U2, U4 és U5-ben a másodlagos szerkezet azonos helyére illeszthetően megtalálták (cf. Reddy, 1986).

(ii) Hasonló konzerváltságot mutat a 2. ábrán k-val jelölt konszenzus szekvencia.

(iii) Valamennyi eddig szekvenált U5 (gerinces, növényi, dinoflagellata) hajtú-szerkezetében (2. ábra) a k'-vel jelölt szekvencia teljesen homológ szakaszként benne van (cf. Branlant és mtsai, 1983; Krol és mtsai, 1983; Liu és mtsai, 1984). Érdekes, hogy pontosan ez az a szakasz, amely a legkiterjedtebb szekvenciahomológiát mutatja az avocado sunblotch viroiddal (2. ábra).

(iv) Két konszenzus szekvencia (PuAGCGUGA és GAUGAPyCG/U/UC) mind lóbabból, mind Dictyostelium-ból, mind pedig patkányból izolált U3-ban a szekundér struktúra azonos helyén megtalálható (Kiss et al., 1985).

(v) A fentiekén kívül még számos olyan szekvenciát tártak fel (Myslinski és mtsai, 1984), amely Drosophila és gerinces U1, U2 és U4 szekundér struktúráinak azonos helyein homológ szakaszként megvan.

(vi) Legújabban derült fény arra, hogy az eddig vizsgált valamennyi U2-ben és U2 ekvivalensben a molekula 5' végétől számított mintegy 100 nukleotid hosszú szakasz nemcsak szekundér struktúráját tekintve abszolút konzervált, hanem primer struktúráját illetően is konszenzus szekvenciát képvisel (U2 domén). Vonatkozik ez a már régebb óta ismert gerinces és Drosophila U2-kön (cf. Reddy, 1986) kívül a lóbab (Kiss és mtsai, 1987b) és Arabidopsis (van Kan és Filipowicz, 1986) növényekből származó "szabályos" hosszúságú U2-kre, valamint a Saccharomyces cerevisiae élesztőből (Ares, 1986) származó (1175 nukleotidhosszúságú) és tripanoszómából (Tschudi és mtsai, 1986) származó (148 nukleotid hosszúságú) U2 ekvivalensekre egyaránt.

2. Az U-snRNA-k lokalizációja

2.1. Lokalizáció a sejten belül

Az U-snRNA-k érett formáinak sejtmagon belüli akkumulációja bizonyított tény, hisz innen történt felfedezésük (elnevezésük is innen származik) és innen is izolálhatók. A korai irodalom néhány ellentmondásos adata az U-snRNA-k lokalizációját illetően egyrészt az alkalmazott sejtmagizolálási módszer tökéletlenségének (cf. Gurney és Eliceiri, 1980), másrészt feltehetően annak tulajdonítható, hogy az érett formák és prekurzorok között nem történt egyértelmű megkülönböztetés.

2.2. Lokalizáció a sejtmagon belül

2.2.1. Három iránymutató kísérlet

(i) Kínai hörcsög sejtek nukleáris extraktumainak cukorgrádiensek 10-30S régiójában ülepedő nukleoprotein frakciójából Enger és Walters (1970) kis molekulatömegű metilált RNS jelenlétét mutatták ki. Ez volt az első kezdetleges adat arra, hogy az U-snRNA-k U-snRNP-k formájában fordulnak elő.

(ii) Patkány Novikoff hepatoma ascites sejtekben Prestayko és mtsai (1970) az U3 molekulapopuláció egy részét nagy molekulatömegű nukleoláris RNS-hez kapcsolódva találták. Ez volt az első adat arra, hogy az U3 a pre-rRNP-hez kapcsolva fordulhat elő, tehát részt vehet a pre-rRNS éréseben.

(iii) Rein (1971) HeLa sejtmagvak bufferes extraktumainak különböző ionerősségű cukorgrádiensekben történő ülepedését vizsgál-

va azt tapasztalta, hogy az U1, U2 és U3 kis ionerősségnél 30S és 180S tartományban ülepedett, az ionerő növelésével azonban ülepedésük lényegesen lassúbb lett, de nem érte el a szabad U-snRNA-kra jellemző ülepedési sebességet. Ebből a szerző arra következtetett, hogy a fenti U-snRNA-k valamilyen nagy molekulatömegű anyaggal komplexálva fordulnak elő a sejtmagban. Ez a nagy komplex sóérzékeny. Az ionerő növelésével az sn-RNA-k erről a komplexről leválnak, de még mindig valamelyes fehérjét is tartalmazó "kéreg részecskék" formájában maradnak. Ez volt az első adat arra, hogy az U-snRNA-k általában U-snRNP-k formájában hnRNP-hez kapcsolva fordulnak elő, tehát részt vehetnek a pre-mRNS érésében.

A kérdés ezek után az volt, milyen természetű a nagy molekulatömegű komplex, és milyen paraméterekkel jellemezhető a "kéreg részecskék".

2.2.2. Az U-snRNA-k U-snRNP-k formájában a sejtmagból hnRNP-hez kapcsolódva izolálhatók (az U3 kivételével)

Sekeris és Niessing (1975) intraperitonealis injektálással patkánymájsejtek sejtmagjait rövid (³H) és hosszú (¹⁴C) ideig jelölték. Az így kettősen jelölt sejtmagvakból kioldott RNP cukorgrádiensen történő analízise azt mutatta, hogy a nagy ülepedési sebességű RNP-frakcióban (200-250S) egy gyorsan jelölődő nagy molekulatömegű RNS (=hnRNS) komponens mellett egy lassan jelölődő RNS komponens is jelen volt, amely az RNP-ből extrahálva és újabb cukorgrádiensen futtatva a 3-11S régióban ülepedett, tehát kis molekulatömegű volt. A szerzők felvetették a gondolatot, hogy ez az RNS frakció részben megfelelhet az U-snRNA-knak. Két év múlva Guimont-Ducamp és mtsai (1977) HeLa sejtek hnRNP frakciójának analízise során szintén kaptak kis molekulatömegű RNS-eket, amelyeket PAG-eken való mobilitásuk alapján tentative U1, U2, U5 és U6-nak azonosítottak. Hasonló eredményekre jutottak Deimel és mtsai (1977) is patkánymáj sejtmagvak hnRNP frakciójának analízise révén. Később Flytzanis és mtsai (1978) egy sor kritérium alapján meggyőzően igazolták, különösen az U1 és U2-ről, hogy ezek a molekulák mintegy 15-25 nukleotid hosszú fragmentjük révén a hn-RNP-komplexen belül közvetlenül a hnRNS-sel bázispárosodnak. Ezt a megállapítást azóta pszoralenes in vivo keresztkötési kísérletekkel mind az U1-re (Calvet és Pederson, 1981) mind az U2-re (Calvet és mtsai, 1982) vonatkozóan megerősítették. Szintén patkánymáj sejtmagvak analízise útján Seifert és mtsai (1979) az U3 kivételével valamennyi U-snRNA molekulafajta (U1, U2, U4, U5 és U6) jelenlétét kimutatták hnRNP-ben.

Sekeris és mtsai (1980) eredményei nem sokkal ezután arra engedtek következtetni, hogy az U-snRNA-k hnRNP-hez való kapcsolódásuk során U-snRNP-k formájában vannak jelen. Ezt a következtetést, amely azóta újabb alátámasztást nyert (Prüsse és mtsai, 1982; Guialis és mtsai, 1983; Sri-Widada és mtsai, 1984; Setyono és Pederson, 1984), Gallinaro és Jacob (1981) megerősítették, sőt sóval és proteináz K-val végzett disszociációs, illetve emésztési kísérleteik eredményeiből az U-snRNP-k és hnRNP közötti kapcsolódás mechanizmusát illetően további konklúziót vontak le: az U-snRNP-k és hnRNP egymáshoz való kötődése során RNS-RNS szegmentumok közötti bázispárosodáson kívül protein-protein interakciók is szerepet játszanak.

A fentiek alapján tehát a Rein (1971) által kimutatott nagy molekulatömegű komplex, amelyhez az U-snRNA-k (az U3 kivételével) ún. "kéreg részecskék" formájában kötődnek, hnRNP, vagyis a pre-mRNS-ek érésének színtere.

Az U3, jelenlegi ismereteink alapján úgy tűnik, szintén RNP formájában pre-rRNP-hez kapcsolódik (Epstein és mtsai, 1984; de lásd a 4.2.-ben az U3-ról írtakat).

2.2.3. Az U-snRNP-k jellemzése klasszikus biokémiai módszerekkel

Tudomásunk szerint a Rein-féle "kéreg részecskék", vagyis mai szóhasználattal U-snRNP-k, első egyértelmű jellemzése Raj és mtsai (1975)-tól ered. Ők Novikoff hepatoma ascites tumor sejtek sejtmagextraktumainak Sepharose 6B-n történő előtisztítását követő ülepitése után cukor grádiensben egy 10S szedimentációs koeficiensű csúcsot kaptak, amelynek anyaga nukleoproteinnek adódott (úszó sűrűség 1.46 g/cm³, 64% protein, 36% RNS), a fehérjekomponens 10 polipeptidből, az RNS komponens egyértelműen identifikált U1 és U2-ből állt. Hasonló eredményt kapott egér erythroleukemia sejtek nukleoplazmatikus kivonataira Howard (1978). Ő valamennyi U-snRNA-t megtalálta ezekben az RNP-kben. Mivel egyik esetben sem történt külön beavatkozás a hnRNP-komplexek disszociálására, úgy tűnik, hogy az U-snRNP-knek legalábbis egy része szabad állapotában is előfordul in vivo a nukleoplazmában.

2.2.4. Az U-snRNP-k jellemzése immunológiai módszerekkel

Már a 60-as évek elején felfigyeltek arra a jelenségre, hogy SLE-ben szenvedő páciensek széruma valamilyen, egészséges emberekben is jelenlévő "oldható" szöveti komponenssel precipitin reakciót ad. A reakciót adó antigén természetére vonatkozóan többféle, itt nem részletezett feltételezés látott napvilágot, míg végül Tan és Kunkel (1966) szép kísérletekkel igazolták, hogy a predomináns antigén a reakcióban sejtmagi eredetű. Ezt az antigént Sm antigénnek (az antigén egy Smith nevű SLE-páciens szérumában lévő ANA-val reagált) nevezték el. Később Northway és Tan (1972) kimutatták, hogy SLE-ben szenvedő betegek egy részének szérumában a korábban identifikált anti-Sm-ellenanyagon kívül egy másik típusú ellenanyag is előfordul. Mivel ez utóbbi ellenanyaggal reagáló antigén precipitin aktivitása nemcsak tripszin, hanem RNáz kezelés hatására is megszűnt, ezt az antigént RNP-nek, az újonnan talált ANA-t pedig anti-RNP (mai nomenklatúra szerint anti-(U1)RNP; Steitz és mtsai, 1983) ellenanyagnak nevezték el.

Az "áttörés", amely ezeknek a klinikai megfigyeléseknek eredményeit az U-snRNP-k struktúra-vizsgálatával összehozta és az U-snRNA-k (U-snRNP-k) bioszintézisének (3.) és funkciójának (4.) kutatását mérhetetlenül felgyorsította és hatékonyá tette, 1979-ben következett be:

Lerner és Steitz (1979) egér Ehrlich ascites tumor sejtek nukleáris kivonatait reagáltatták SLE-ben szenvedő páciensek szérumaiból tisztított anti-Sm és anti-RNP ellenanyaggal. A precipitátumok analízise azt mutatta, hogy az anti-RNP U1-snRNP-vel (innen származik az anti-(U1)RNP elnevezés), az anti-Sm pedig U1, U2, U4, U5 és U6-snRNP-kkel reagált. A kapott immunoprecipitátum 7 polipeptidet tartalmazott (A-G; 3. ábra). Ezek nem származhattak hiszton proteinekből, vagy a hnRNP proteinjeiből. A szerzők valószínűnek tartották, hogy minden egyes U-snRNA azonos polipeptideket tartalmazó, de különálló RNP-partikulumokban van, és a hnRNP-vel való asszociációban is ezek az U-snRNP-k szerepelnek, valamint azt, hogy a sejtmagban egyáltalán fellelhető U-snRNA-k teljes populációja U-snRNP-k formájában fordul elő. Egy évvel később a Steitz-laboratórium (Lerner és mtsai., 1980) már arról számolt be, hogy humán ANA-k egy sor eukarióta (tengeri sünn, Spodoptera frugiperda nevű rovar, béka, csirke, egér) U-snRNP-it specifikusan kicsapják (nem kaptak reakciót E.coli, élesztő, Dictyostelium discoideum (egy amőba faj) és dohánysejtek kivonataival). Wooley és mtsai (1982) kimutatták, hogy humán anti-Sm antiszérum Drosophila melanogasterből hét U-snRNP-fajtát ismer fel, Francoeur és mtsai-nak (1985) pedig a malária kórokozójában, Plasmodium falciparum-ban sikerült humán ANA-kkal reagáló és az eukarióta U-

snRNA-kkal azonos PAGE mobilitású kis RNS-eket tartalmazó RNP-eket kimutatni. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy az U-snRNP-knek nemcsak RNS-, hanem protein-komponense is erősen konzervált az eukarióták körében. Saját vizsgálataink (Kiss és mtsai, 1986) során azt találtuk, hogy humán anti-Sm ellenanyag növényi sejtmagvak nukleoplazmatikus antigénjeivel, humán anti-U3 ellenanyag pedig növényi sejtmagvak nukleoláris antigénjeivel indirekt immunofluoreszcenciával detektálható specifikus reakciót adott.

A Steitz-laboratóriumnak ma már monoklonális anti-Sm ellenanyag (Lerner és mtsai, 1981), valamint U2-snRNP-t specifikusan felismerő ellenanyag (Mimori és mtsai, 1984) áll rendelkezésére, legújabbán pedig a Lührmann-laboratórium (Reuter és mtsai, 1986) U1- és U2-snRNP-kre egyaránt (de csak erre a kettőre) specifikus monoklonális ellenanyagot állított elő, miután a Steitz-laboratóriumhoz hasonlóan U2-snRNP-vel szemben specifikus ellenanyagot is izolált (Habets és mtsai, 1985). Ezek a specifikus ellenanyagok az U-snRNP-k további vizsgálatának módszertani tisztasága és megbízhatósága szempontjából lényegesek, hiszen úgy tűnik, a különböző autoimmun reumatikus betegségekben szenvedő páciensek szérumai egy sor egyéb, egymástól merőben különböző specificitású ANA-t tartalmaznak (cf. Matter és mtsai, 1982; Hardin és mtsai, 1982).

Az U-snRNP-kkel specifikusan reagáló ellenanyagok felfedezésével megnyílt az út az U-snRNP-k finomabb strukturális és funkcionális karakterizálásához.

2.2.5. Az U-snRNP-k finomabb struktúrája

2.2.5.1. Az U-snRNP-k polipeptidjei

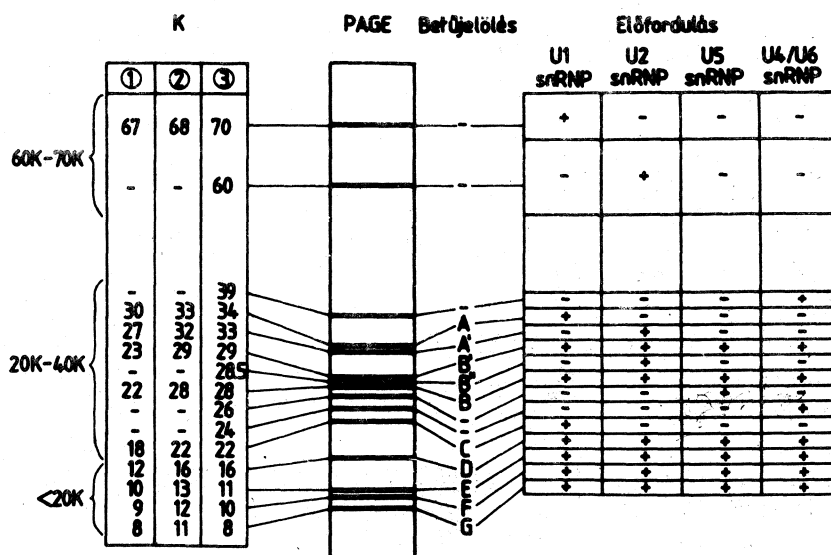
Az egyes U-snRNP-k polipeptid komponenseinek meghatározásához könnyen beláthatóan mindenekelőtt arra volt szükség, hogy az U-snRNA-kat feltételezetten egyenként külön-külön tartalmazó U-snRNP-k egymástól elválaszthatók és külön izolálhatók legyenek.

Az úttörő kísérlet ezen a vonalon a Jeanteur-laboratórium nevéhez fűződik. Egy korábbi, pusztán biokémiai módszereket felhasználó és itt helyhiány miatt nem részletezhető kísérletsorozatukban (Brunel és mtsai, 1981; Sri-Widada és mtsai, 1981) "drasztikus" tisztítási eljárással hnRNP frakcióból olyan U-snRNP preparátumot állítottak elő, amely az U3-on kívül valamennyi fő U-snRNA-t, de csak a <20 K polipeptideket tartalmazta (3. ábra). Ezeket a partikulumokat "kéreg partikulumoknak" (nem tévesztendő össze a Rein (1971)-féle "kéreg részecskék"-kel!) nevezték. A későbbiekben kidolgozták a "kéreg" U1-snRNP speciális izolálásának módszerét (Sri-Widada és mtsai, 1982). Az így kapott "kéreg" U1-snRNP polipeptid összetétele pontosan ugyanaz volt, mint az U2, U4, U5 és U6-ot egyaránt tartalmazó "kéreg" U-snRNP frakcióé. Ezzel valószínűvé vált, (és ma már tudjuk, hogy ez így is van), hogy a "kéreg" U-snRNP-k mindegyike 4 azonos (D-G, 3. ábra) polipeptidet tartalmaz és az egyes U-snRNA-kat tartalmazó U-snRNP-k specificitását elsősorban a bennük lévő U-snRNA-fajta, valamint a fenti polipeptideken kívül a drasztikus tisztítás során elvesztett addicionális polipeptidek jelenléte határozza meg (3. ábra).

Egyedi U-snRNP-k izolálása és ezek polipeptid-összetételének meghatározása még számos további dolgozat tárgya: Hinterberger és mtsai-nak (1983) sikerült sok lépcsős tisztítási módszerrel egér Friend eritreuleukémia és HeLa sejtekből olyan U-snRNP frakciót kapni, amely döntően U2-snRNP-t tartalmazott. Kinlaw és mtsai (1983) korábbi kísérleteik (Kinlaw és mtsai, 1982) tapasztalatait felhasználva, teljesen tiszta U2-snRNP-t izoláltak hasonló módszerrel HeLa sejtekből. Az U6 kivételével az összes U-snRNA-kra

3. ábra
 HeLa U-snRNP-kben található polipeptidek

A K értékeket mutató hármastetején levő bekarikázott számok az adatok forrásait jelölik: ① Kinlaw és mtsai (1983), ② Steitz és mtsai (1983) és ③ Bringmann és mtsai (1986).



jellemző $m_3^{2,2,7}G$ sapkára specifikus ellenanyag felhasználásával Ehrlich ascites tumor sejtek nukleáris kivonataiból Bringmann és mtsai (1983) utólag U-snRNA tartalmuk alapján és anti-(U1)RNP és anti-Sm ellenanyagokkal leellenőrzött U-snRNP-eket izoláltak és ezek polipeptid összetételét lényegében azonosnak találták a Hinterberger és mtsai (1983) és Kinlaw és mtsai (1983) által közöltekkel. A rejtély ebben a kísérletben az volt, hogy az U6, annak ellenére, hogy köztudottan nem tartalmaz $m_3^{2,2,7}G$ sapkát, mégis jelen volt az erre a sapkára specifikusan reagáló ellenanyaggal nyert U-snRNP frakcióban. A szerzők felvetették a gondolatot, hogy az U6 esetleg valamely más sapkázott U-snRNA-t tartalmazó snRNA-val közösen fordul elő U-snRNP-ben. Ezt a feltételezésüket egy későbbi dolgozatukban (Bringmann és mtsai, 1984) végtelen nagy körültekintéssel, számos szép kontroll kíséretében igazolták. Tőlük függetlenül Hashimoto és Steitz (1984) ugyanerre az eredményre jutottak. Mindkét szerző végkövetkeztetése az volt, hogy (i) az U6 az U4-gyel együtt 1:1 arányban egyetlen U-snRNP-ben fordul elő, és (ii) az U6 és U4 együttes előfordulásának molekuláris háttere a két molekula közötti bázispárosodás, amelynek mikéntjére mindkét szerző elképzelhető, de egymástól kissé eltérő modelleket is közölt az U4 és U6 nukleotid szekvenciáinak ismeretében. Később pszoralenes keresztkötéses vizsgálatok (Rinke és mtsai, 1985) eredményei arra engedtek következtetni, hogy a fenti modellek egyike sem tükrözi az in vivo helyzetet: az U4- és U6-ban a bázispárosított régió in vivo sokkal rövidebb, mint ahogy azt a modell alapján feltételezték.

Még számos további dolgozat jelent meg az U-snRNP-k különböző polipeptidjeinek, mint antigén-determinánsoknak, az anti-Sm és anti-(U1)RNP ellenanyagokkal való reaktivitását illetően (pl. Pettersson és mtsai, 1984; Billings és Hoch, 1984), de az ezekben közölt eredmények, jelenleg úgy tűnik, inkább a jövő metodológiai fegyvertárát növelik, és nem adnak közvetlenül hasznosítható és általános biológiai szempontból könnyen értékelhető információt.

Az egyes U-snRNP-k polipeptid összetételéről legújabban Bringmann és mtsai (1986) hoztak nyilvánosságra összeállítást. A 3. ábrán feltüntetjük

eredményeiket, összevetve azokat két másik laboratórium adataival. Habár az ábrán szereplő laboratóriumokban kimutatott egyes polipeptidek molekulatömegei nem egyeznek pontosan egymással, lényegében azonos tartományon belül vannak, és a Kinlaw és mtsai által kapott értékekre vonatkozóan egy általános molekulatömeg-alábecsülést feltételezve, egymáshoz önkényesen hozzárendelhetők.

2.2.5.2. RNS-fehérje kölcsönhatások az U-snRNP-kben

A kérdés különböző reagensek (anti- $m_3^{2,2,7G}$ -vel és/vagy az egyes U-snRNP polipeptidekkel specifikusan reagáló ellenanyagok, valamint nukleolitikus enzimek) alkalmazása révén közelíthető meg.

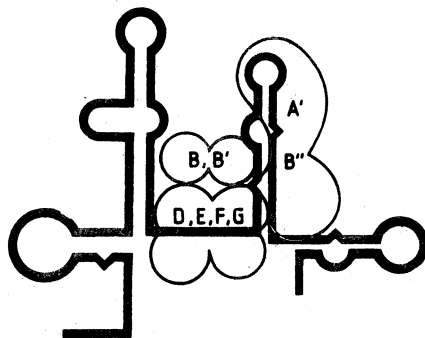
(i) Az a tény, hogy az U-snRNA-k az 5' végükön levő $m_3^{2,2,7G}$ sapkával szemben készített specifikus ellenanyaggal akkor is reagálnak, ha RNP formában vannak (Bringmann és mtsai, 1983) azt jelenti, hogy 5' végük "szabad", tehát feltehetőleg reaktív (funkcióképes).

(ii) HeLa-ból izolált U-snRNP-k mikrokokkális nukleázos emésztése és az ezt kiegészítő analízisek azt mutatták (Liautard és mtsai, 1982), hogy a 2. ábrán jelölt A domén proteinkötő hely, amennyiben az a 2.2.5.1. fejezet második bekezdésében említett "kéreg U-snRNP" polipeptidjeihez ($< 20K$) szorosan kapcsolódik. A vizsgált U1- és U2-snRNP-k esetében alacsony ($\leq 5 \text{ mM}$) Mg^{++} koncentrációnál ez az egyedüli proteinkötőhely, magasabb ($\geq 7 \text{ mM}$) Mg^{++} koncentrációnál azonban mindkét U-snRNA-nak hosszabb régiói válnak védettekké mikrokokkális nukleázzal szemben, ami arra enged következtetni, legalábbis e két U-snRNP esetében, hogy a $> 20 K$ polipeptidek megkötése Mg^{++} koncentrációtól függő folyamat (Reveillaud és mtsai, 1984).

4. ábra

Az U2-snRNP topográfiai modellje
(Mattaj és mtsai /1986/ után)

A vastag vonal az U2 másodlagos szerkezetét, a vékony vonal a kapcsolódó polipeptidek határvonalait jelöli. A betűk a 3. ábrán szereplő jelöléseknek felelnek meg.



(iii) Legújabban Mattaj és mtsai (1986) nagyon korszerű és sokoldalú metodológia felhasználásával topográfiai modellt (4. ábra) készítettek az U2-snRNP szerkezetéről, pontosan lokalizálva a 3. ábrán felsorolt valamennyi polipeptid lehetséges kötődési helyét az U2-höz. Érdekes az a következtetésük, hogy az U1- és U2-snRNP-k egymással feltehetően kölcsönhatásban vannak, amelyhez mind az U1, mind az U2 RNS struktúrájának érintetlensége szükséges.

(iv) Az egyes U-snRNP-kben az RNS és protein közötti kölcsönhatások vizsgálatának néhány további, a funkciót érintő eredményét a 4. fejezetben vázoljuk.

3. U-snRNA-k (U-snRNP-k) bioszintézise és transzkripciója

3.1. Prekurzorok és maturáció

Először Eliceiri (1974) talált két, jelölési kinetika alapján prekurzoroknak tűnő metilált kis molekulatömegű RNS-t emlős sejtek citoplazmájában. Felvetette annak lehetőségét, hogy ezek a molekulák valamelyik két U-snRNA prekurzorai. Frederiksen és Hellung-Larsen (1975) BHK sejtek össz-RNS kivonataiban olyan rövid, prekurzor-jellegű molekulákat detektáltak, amelyek az U1-nél 5, az U2-nél 10 és az U3-nál szintén 10 nukleotiddal tűntek hosszabbaknak. Eliceiri és Sayavedra (1976) ennél tovább mentek: HeLa sejtek citoplazmájában talált két prekurzor-jellegű kis RNS-t T1 RNáz-zal emésztettek, és a kapott fingerprinteket összehasonlítva a nukleáris U1-ével és U2-ével azt kapták, hogy az egyik citoplazmatikus kis RNS az U1-nek, a másik az U2-nek csak néhány nukleotiddal (3 ill. 10) hosszabb prekurzora. Lényeges az a feltételezésük, amely szerint az U1 és U2, nyilván a sejtmagban történő transzkripció után, a citoplazmában "érik" és végül visszaáramlik a nukleoplazmába. Ezt a feltételezést később Brown és Marzluff (1978) egér mieloma sejtekkel végzett kísérletek eredményeivel megerősítették, kiterjesztve azt az U3-ra és kiegészítve azzal a megállapítással, hogy a vizsgált U-snRNA-k metilezésének legalább egy része valószínűleg szintén a citoplazmában történik. Az U-snRNA prekurzorok vizsgálatának "klasszikus" korszakát lezárva Eliceiri (1980) HeLa sejtek vizsgálata alapján az U1-re és U2-re vonatkozólag összefoglalólag az alábbiakat állapította meg:

(i) Az U1 prekurzorának "rövidülése" a citoplazmából a sejtmagba való áramlás során következik be, az U2 prekurzor "főlös" nukleotidjainak egy részét ugyanakkor, másik részét azonban csak a sejtmagban vesztí el.

(ii) Mindkét U-snRNA érése cikloheximiddal gátlható, tehát fehérjé(k) szintézisével kapcsolt.

(iii) Mindkét U-snRNA esetében az 5' sapkához közel eső ribóz-metilációk az érésnek már a prekurzor citoplazmatikus stádiumában befejeződnek, a belső metilálások azonban csak közvetlenül a citoplazma → sejtmag áramlás idején mennek végbe.

(iv) Mindkét U-snRNA jelölt prekurzorai a sejtext-raktum fenol-kezelése nélkül gyorsabban ülepednek (\approx 12S), mint fenol-extrakció után (\approx 8S), tehát feltehetően proteinnel komplexálva, RNP formájában fordulnak elő (\approx 50K).

Az U-snRNA-k érésére vonatkozó ismereteinket De Robertis és mtsai (1982) helyezték végülis megbízható alapokra. Ők *Xenopus* oociták citoplazmájába HeLa sejtekből tisztított jelölt kis RNS-eket injektáltak. Kimutatták, hogy a nukleoláris U3 a citoplazmában degradálódik, a nukleoplazmatikus U1, U2, U4, U5 és U6 azonban, szemben az egyébként közismerten citoplazmatikus tRNS-ekkel, a sejtmagba vándorolnak és ott preferenciálisan felhalmozódnak. Kísérleteik különös értéke annak kimutatása anti-(U1)RNP és anti-Sm ellenanyagok alkalmazása révén, hogy az RNS formában injektált fenti fő U-snRNA-k a sejtmagba való áramlásuk előtt a *Xenopus* oociták citoplazmájában eleve jelen levő kötő-fehérjékkel specifikus antigén reakciót adó U-snRNP-kké komplexálódnak. Ezt a megállapításukat később a sejtdifferenciáció szintjén részletesen analizálták (Zeller és mtsai, 1983) és kimutatták, hogy az U-snRNA kötő-fehérjék (Sm antigén) az oogenezis során már a gasztrola stádium előtt nagy mennyiségekben felhalmozódnak a citoplazmában és mintegy "ugrásra készen" várják a sejtmagból kiáramló U-snRNA prekurzorokat, hogy azokhoz az RNS maturáció során kötődjenek és azokkal együtt, U-snRNP-k formájában a sejtmagba áramoljanak.

Korszerű technikák (anti-m₃^{2,2,7}G ellenanyag, anti-Sm ellenanyagok, szekvenciaspecifikus próbák, molekulahosszok pontos mérését lehetővé tevő PAGE, in vitro rendszerek) alkalmazásával végzett kísérletekről az U-snRNA prekursorok érését illetően újabban a Pederson-laboratórium számolt be több dolgozatában. Először az U1 prekursor érését vizsgálták HeLa sejtekben (Madore és mtsai, 1984a). Megerősítették, hogy az U1 prekursora a citoplazmában érik. Az érési folyamat az érett U1 3' végén levő legalább 8 "föls" nukleotid feltehetően egyenként történő eltávolításából áll. Az egész folyamat anti-Sm ellenanyaggal reagáló U-snRNP partikulumokban zajlik le. Ugyanilyen módon történik az U4 prekursorának érése, legalább 7 "föls" nukleotid feltehetően fokozatos lehasítása útján (Madore és mtsai, 1984b). Az U2 prekursorának érését HeLa sejtekben in vivo és HeLa citoplazmatikus extraktumokban in vitro egyaránt vizsgálva hasonló általános kép adódott (Wieben és mtsai, 1985): Itt a prekursor mintegy 16 nukleotiddal bizonyult hosszabbnak, mint az érett forma és már eleve sapkázva volt. Ez utóbbi megállapításon túlmenően e dolgozat különös értékét az a megállapítás adja, amely szerint az U2 prekursor érése in vitro rendszerben is U-snRNP komplexben zajlik le. A Pederson-laboratórium további idevonatkozó dolgozatában (Kunkel és Pederson, 1985) az U1 transzkripciójának néhány jellemzőjét izolált HeLa sejtmagvakban vizsgálta. Megállapították, hogy az átírás az érett molekula 5' végén levő sapkánál vagy ahhoz igen közel kezdődik, és az érett U1 3' végéhez viszonyítva mintegy 60 nukleotid-távolságnál nem megy tovább. Ez az adat már átvezet az U-snRNA-k transzkripciójának (3.2. és 3.3.) tárgyalásához.

3.2. Enzimek

Az U-snRNA-k transzkripcióját katalizáló enzimek természetét illetően a régebbi irodalom adatai, amelyeket elsősorban az α -amanitin és egyéb, enzimaktivitást gátló szerek koncentrációtól függő differenciális enzimaktivitás (RNS polimeráz I, II és III) gátló hatásának megállapítása révén kaptak, ellentmondóak.

Hellung-Larsen és mtsai (1974) csak annyit állapítottak meg, hogy humán limfocitákban az U1 és U2 szintézise aktinomycin D és cikloheximid hatására gátlódik. Udvardy és Seifart (1976) HeLa sejtmagvak kis RNS-einek (közelebbi jellemzés nem történt) transzkripciójáért α -amanitines gátlási kísérletek alapján az RNS polimeráz III-t tették felelőssé. Az első adat, amely szerint, legalábbis Novikoff hepatoma ascites sejtekben; az U1-t és U2-t az RNS polimeráz II írja át, Ro-Choi és mtsai-tól (1976) származik. Sklar és Roeder (1977) arról számoltak be, hogy tumor sejtek izolált sejtmagvaiban kívülről adott RNS polimeráz III az őáltaluk nem identifikált, de PAG-eken levő pozíciójuk alapján U1, U2 és U3-nak tűnő molekulafajták szintézisét serkenti. Zieve és mtsai (1977) intakt HeLa sejtekkel végzett kísérletek alapján valószínűnek tartották, hogy az U1, U2, U3, U4 és U6 transzkripcióját az RNS polimeráz I végzi.

Ezek után a dán Frederiksen-laboratórium munkájának jóvoltából a kép egyre egyértelműbbé vált. Egy sor adat látszott bizonyítani azt, hogy legalábbis az U1, U2 és U3 transzkripciójáért végső soron az RNS polimeráz II felelős:

(i) BHK sejtekben az U1, U2 és U3 szintézisét az α -amanitin abban a koncentrációban (0.5-5 μ g/ml) gátolta, amelyben a hnRNS-ét (RNS polimeráz II transzkriptuma) is és amelyben nem hatott sem a tRNS és 5S RNS (RNS polimeráz III transzkriptumok), sem a rRNS (RNS polimeráz I transzkriptum) bioszintézisére (Frederiksen és mtsai, 1978).

(ii) α -amanitinre rezisztens RNS polimeráz II-t tartalmazó mutáns kínai hörcsög sejtekben az U1, U2 és U3 szintézisét a 0.5-5 μ g/ml koncentrációban adott α -amanitin nem gátolta (Gram-Jensen és mtsai, 1979).

(iii) Hőérzékeny RNS polimeráz II-t tartalmazó és tiltott (non-permissive) hőmérsékleten (40°C) növesztett mutáns BHK sejtekben az U1, U2 és U3 szintézise preferenciálisan gátlódott (Hellung-Larsen és mtsai, 1980).

(iv) Az 5, 6-diklór-1- β -D-ribofuranozil-benzimidazol, amelyről már korábban kimutatták, hogy a hnRNS egyértelműen RNS polimeráz II által katalizált átírásának idő előtti terminációját indukálja (Tamm és Kikuchi, 1979); az U1, U2 és U3 szintézisét is gátolta (Hellung-Larsen és mtsai, 1981). A gátlás mértéke: U1, U2, U3 \gg rRNS \gg tRNS, 5S RNS.

Az egyes U-snRNA-k transzkripciójának enzimátikus vonatkozásait újból felülvizsgálva Chandrasekharappa és mtsai (1983) egyértelműen igazolták, hogy az U1, U2, U3, U4 és U5-t az RNS polimeráz II írja át, de az U6-ot valószínűleg nem. Legújabb adatok szerint (Reddy és mtsai, 1986; Kunkel és mtsai, 1986) az U6 transzkripciójáért az RNS polimeráz III felelős.

3.3. Gének és pszeudogének

Már a korai hibridizációs vizsgálatok rámutattak arra, hogy az U-snRNA-k génjei nagy kópiaszámban (mintegy 100-2000) fordulnak elő a genomban (Marzluff és mtsai, 1975). A 80-as évek elején, amikor is lényegében befejeződött az emlős U-snRNA-k elsődleges szerkezetének feltárása, lehetőség nyílt a génjeik közelebbi tanulmányozására is. Az utóbbi 4-5 év alatt több munkacsoport jóvoltából hatalmas ismeretanyag gyűlt össze az U-snRNA-kat kódoló gének struktúrájára és működésére nézve. Ez egyrészt a modern rekombináns DNS technológia és gyors DNS szekvenálási módszerek rohamos terjedésének és fejlődésének, másrészt az eukarióta génexpresszió újonnan kidolgozott vizsgálati módszerének (géninjektálása *Xenopus* oocitákba) köszönhető.

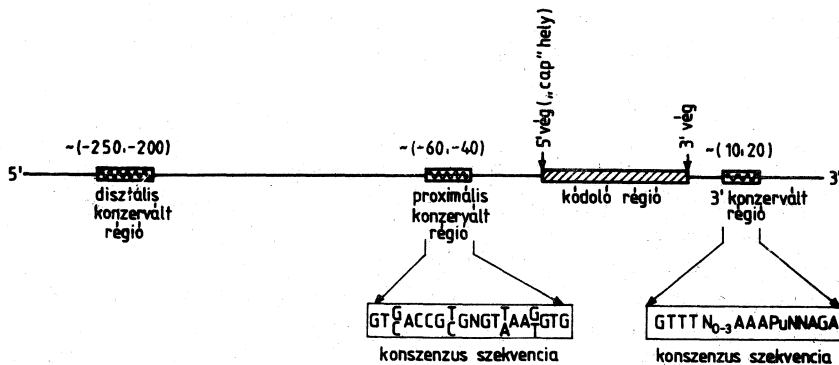
3.3.1. Az U1 és U2 RNS gének molekuláris analízise

Napjainkig elsősorban az U1 és U2 génjeit tanulmányozták a legmélyrehatóbban. Ezek molekuláris vizsgálatakor, jóllehet ismert volt, hogy az U-snRNA-kat az RNS polimeráz II enzim írja át, nem találták meg a jellemző polimeráz II promóter elemeket, a TATA vagy Hogness boxot és a CAAT boxot (Manser és Gesteland, 1982; Marzluff és mtsai, 1983; Watanabe-Nagasu és mtsai, 1983; Skuzeski és mtsai, 1984). Összehasonlítva a különböző fajokból származó U-snRNA gének kódoló szekvenciáit határoló DNS szakaszokat, három konzervált régióra figyeltek fel (Marzluff és mtsai, 1983; Tani és mtsai, 1983; Mattaj és Zeller, 1983; Early és mtsai, 1984; Zeller és mtsai, 1984; Westin és mtsai, 1984 a, b; Krol és mtsai, 1985; Ares és mtsai, 1985). Az U1 és U2 gének kódoló szekvenciáinak 5' végétől (sapka hely) mintegy 40-60 és 200-250 nukleotid távolságra található az ún. proximális és disztális konzervált régiók (5. ábra). In vitro mutagenézissel előállított deléciós és pontmutációs *Xenopus laevis* U1 (Ciliberto és mtsai, 1985; Krol és mtsai, 1985), emberi U1 (Skuzeski és mtsai, 1984) és emberi U2 (Westin és mtsai, 1984b; Ares és mtsai, 1985) géneket injektáltak béka petesejtekbe, majd vizsgálták az egyes mutációknak a génexpresszióra gyakorolt hatását. A proximális konzervált régió maradéktalan meglétét elengedhetetlenül szükségesnek találták az U-snRNA gének expressziójához, így arra

a következtetésre jutottak, hogy az 5. ábrán feltüntetett konszenzus szekvencia funkcióját tekintve megegyezik a már ismert polimeráz II transzkripció egységek TATA boxával, azaz a transzkripció korrekt iniciációjáért felelős (Skuzeski és mtsai, 1984). A disztális konzervált régió egy aktivátor elemnek bizonyult, amelynek megléte általában nem szükséges a helyes transzkripcióhoz, de annak hatásfokát mintegy 10-50-szeresére emelheti (Ciliberto és mtsai, 1985; Ares és mtsai, 1985). Ez a régió mind strukturálisan, mind funkcionálisan nagyon sok hasonlóságot mutat a klasszikus polimeráz II aktivátor (enhancer) szekvenciákkal (Korf és Stumph, 1986).

A harmadik konzervált régió mintegy 10-20 nukleotid távolságban található az U1 és U2 gének 3' kódoló végétől (5. ábra), és a pre-U-snrRNA-k korrekt 3' vég formálásáért felelős (Hernandez, 1985; Yuo és mtsai, 1985).

5. ábra
U1 és U2 gének általánosított molekuláris szerkezete



3.3.2. Az U1 és U2 RNA-kat multigén család kódolja

Az emberi U1-t és U2-t kódoló gének kb. 30 (Lund és Dahlberg, 1984) illetve 10-20 (Van Arsdell és Weiner, 1984a) kópiában található a haploid genomban. Ezzel szemben *Xenopus laevis*-ben az U1 gén több ezer (Lund és Dahlberg, 1984), az U2 gén 500-1000 kópia számban fordul elő; ugyanakkor a csirke U1-t csak 6-10 gén kódolja (Roop és mtsai, 1981).

3.3.3. Az U1 és U2 gének szerveződése a kromoszómán

Az utóbbi három évben egyre több adat bizonyítja, a korábbi uralkodó nézettel szemben, hogy az U-snrRNA gének egy kromoszóma meghatározott szakaszán csoportosulnak általában tandem ismétlődő, U-snrRNA-nként változó hosszúságú DNS szakaszokon belül (Van Arsdell és Weiner, 1984a; Early és mtsai, 1984; Bernstein és mtsai, 1985; Korf és Stumph, 1986). In situ hibridizációs kísérletekkel kimutatták (Lund és mtsai, 1983; Naylor és mtsai, 1984; Lindgren és mtsai, 1985), hogy az emberi U1 és U2 gének lokalizációja a humán kromoszóma-szerelvényen egybeesik az adenovírus 12 kromoszóma modifikációs helyeivel. Feltételezhetően az U-snrRNA gének a virális kromoszóma-módosítás legfőbb célpontjai (Lindgren és mtsai, 1985).

3.3.4. A többi U-snrRNA-t kódoló génekről jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. Az utóbbi időben izolált patkány U3 (Stroke és Weiner, 1985) és *Drosophila* U4 gének (Saba és mtsai, 1986) nagy strukturális hasonlóságot mutatnak az U1 és U2 génekkel. U6-specifikus szekvenciákat nordozó DNS fragmentumokat sikerült izolálni humán (Hayashi, 1981) és egér génbankból (Ohshima és mtsai, 1981a), míg U5-specifikus DNS szekvenciákról még nem

számolt be az irodalom. Az eddig megismert U-snRNA gének közös jellemzője a hasonló transzkripció szignálszekvenciákon túl, hogy egyikük sem tartalmazott intron régiót.

3.3.5. Az U-RNS-ek pszeudogénjei

Az U-snRNA-*ket* valóban kódoló (átíró) géneken kívül az eukarióta genom nagy számú pszeudogént is hordoz. A humán haploid genom mintegy 30, U1-t kódoló génje mellett legalább 500-1000 pszeudogén található (Denison és Weiner, 1982), így nem csoda, hogy az U-snRNA gének izolálására tett erőfeszítések legtöbbször deficiens, *in vitro* körülmények között nem expresszálódó pszeudogéneket eredményeztek (Denison és mtsai, 1981; Van Arsdell és mtsai, 1981; Westin és mtsai, 1981; Hayashi, 1981; Bernstein és mtsai, 1983; Van Arsdell és Weiner, 1984b; Reddy és mtsai, 1985b; Stroke és Weiner, 1985; Theissen és mtsai, 1985). Strukturális jellemzőik alapján - néhány kivételtől eltekintve (Theissen és mtsai, 1985) - az U-snRNA-k pszeudogénjei négy csoportba sorolhatók (Denison és Weiner, 1982):

(i) Megtalálható a teljes U-snRNA szekvencia, de szétszórt báziscserékkel. A határoló DNS szakaszok kiterjedt szekvencia-homológiát mutatnak a kódoló gének hasonló régióival.

(ii) Az RNS szekvencia báziscseréket tartalmaz, 3' végéből hiányzik egy rövid szakasz, ehelyett egy A gazdag régió található.

(iii) Megtalálható a teljes RNS szekvencia néhány báziscserével, a 3' végen A vagy AT gazdag régióval. Ezt a struktúrát mind a 3' mind az 5' végen rövid (16-19 bp) direkt ismétlődő szekvenciák határolják.

(iv) Az RNS szekvenciában nincs (vagy csak néhány) báziscsere (van), de a 3' végszekvenciából egy hosszú szakasz hiányzik. Rövid direkt ismétlődő szekvenciák határolják.

Az U-snRNA pszeudogének molekuláris vizsgálata nagyon sok új információval szolgált a DNS (/i/ csoport) és az RNS (/ii-iv/ csoport) irányította gén sokszorozódás (gene amplification) alaposabb megértéséhez (Van Arsdell és mtsai, 1981; Denison és Weiner, 1982; Monstein és mtsai, 1983; Bernstein és mtsai, 1983; Van Arsdell és Weiner, 1984b).

4. Az U-snRNA-k (U-snRNP-k) funkciója

4.1. Általános kép

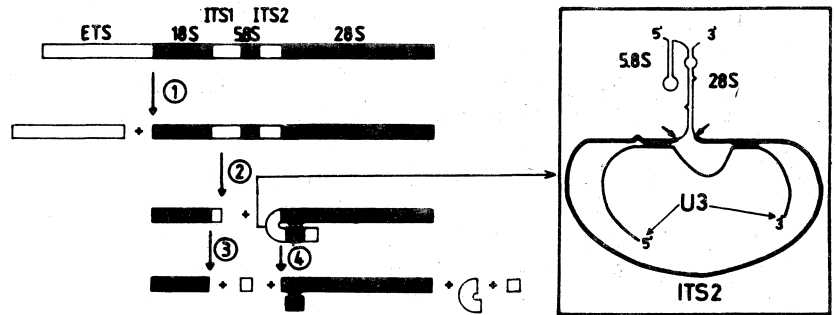
Az a tény, hogy az U-snRNA molekulákat U-snRNP komplexek formájában a sejtmagon belül és ott is a mRNS (U1-U2, U4-U6) és rRNS (U3) prekursorait hordozó struktúrákhoz asszociálva találták, arra engedett következtetni, hogy ezek a kis RNS molekulák, vagy még inkább az őket hordozó RNP-k a pre-mRNS és pre-rRNS érési során lejátszódó nukleáris (pre-mRNS) és nukleoláris (pre-rRNS) folyamatokban vesznek részt. Addig azonban, míg a fent említett érési folyamatok egyes lépései és az ezek során képződött intermedierek strukturális részletei nem voltak ismertek, természetesen nem lehetett modellt sem alkotni és még kevésbé egzakt kísérleteket folytatni az U-snRNA-k és U-snRNP-k részvételére e folyamatokban, hiába volt az U-snRNA-k szerkezete már a legnagyobb részletekig tisztázott.

A pre-rRNS érési folyamatának részletei viszonylag korán, a 70-es évek elejére kirajzolódtak (Penman, 1966; cf. Adams és mtsai, 1981; cf. Hadjiolov, 1985; 6. ábra).

6. ábra

A pre-rRNS érése eukariótákban (általánosított vázlat)

A pre-rRNS érésében résztvevő feltételezett endonukleázok támadási helyeit nyilak jelzik, amelyek számozása (1-4) a folyamat lépéseinek sorrendjét jelenti. Az ITS 2 kivágásában az U3 feltételezett szerepét bemutató modellt (Bachellerie és mtsai, 1983) külön kiemeltük (jobb oldalt beke-retezve).

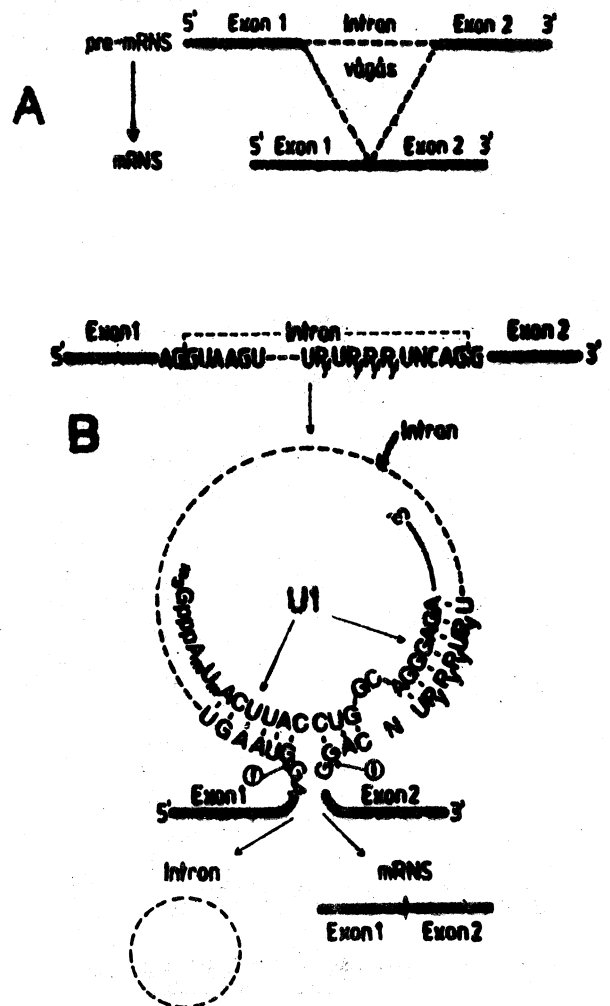


Az eukarióta pre-mRNS érésével kapcsolatban először azt mutatták ki (cf. Perry és mtsai, 1976), hogy a naszcens pre-mRNS hosszabb az abból keletkező érett mRNS-nél, majd bizonyították, hogy a "rövidülés" a pre-mRNS átalakulása során a primér transzkriptum középső részének (intron, helyesebben intron-transzkriptum) /ki/vágása (splicing) majd a két szélső szekvencia (exon 1 és exon 2, helyesebben exon-transzkriptum 1 és 2) ligálása révén történik (7.A. ábra). Gyakran ezt a két, szorosan kapcsolt folyamatot együtt nevezik /ki/vágásnak (splicing = splicing out + splicing together). Szekvenciavizsgálatok később arra mutattak, hogy gyakorlatilag valamennyi vizsgált eukarióta pre-mRNS-ben az exon-intron választóvonalától jobbra és balra (donor szekvencia, helyesebben 5' /ki/vágási hely), valamint az intron-exon választóvonalától is jobbra és balra (akceptor szekvencia, helyesebben 3' /ki/vágási hely) ún. konszenzus szekvenciák vannak. E felfedezés legáltalánosabb tétele az, hogy az eukarióta pre-mRNS intronok GU...-val kezdődnek (5' vég) és ...AG-vel végződnek (3' vég) (7.B. ábra). E megállapításoknál tovább csak az ún. in vitro kivágó rendszerek (in vitro splicing systems) kidolgozása után lehetett lépni.

Ezeknek a rendszereknek ma már csaknem kizárólag HeLa nukleáris kivonat (Dignam és mtsai, 1983) az alapja, amelynek működéséhez ATP, MgCl₂ és monovalens kationok, valamint természetesen a szubsztrát szükségések. Szubsztrátként in vitro szintetizált jelölt pre-mRNS-t adnak. Ez rendszert vagy egy adenovírus-2 fő késői (major late) transzkripciós egység (AdML) vagy a humán β -globin gén transzkriptuma. Az előbbi úgy készül, hogy HeLa összsejt kivonatban egy olyan plazmid DNS-t íratnak át, amely hordozza a promotert és az AdML transzkripciós egységet, az utóbbi úgy, hogy az SP6 RNS polimerázzal in vitro olyan plazmid DNS-t íratnak át, amely SP6 fág promoterhez fuzionált humán β -globin gént tartalmaz. A fenti rendszerekkel végzett vizsgálatok eredményét az 7.C. ábrán szemléltetjük. A lényeg az, hogy a pre-mRNS vágása több lépcsőben történik. Először az 5' vágási helynél szabaddá válik az exon 1. Ezt követően az exon 2-vel 3' végénél fogva még kapcsolt intron felszabadult 5' vége hurok alkotással egy új, saját belső kitüntetett helyéhez kapcsolódik 2'-O-difoszfát kötéssel. Ezután következik be az intron 3' végénél is a vágás, amelynek terméke a külön izolálható

7. ábra
Eukarióta pre-mRNS vágása

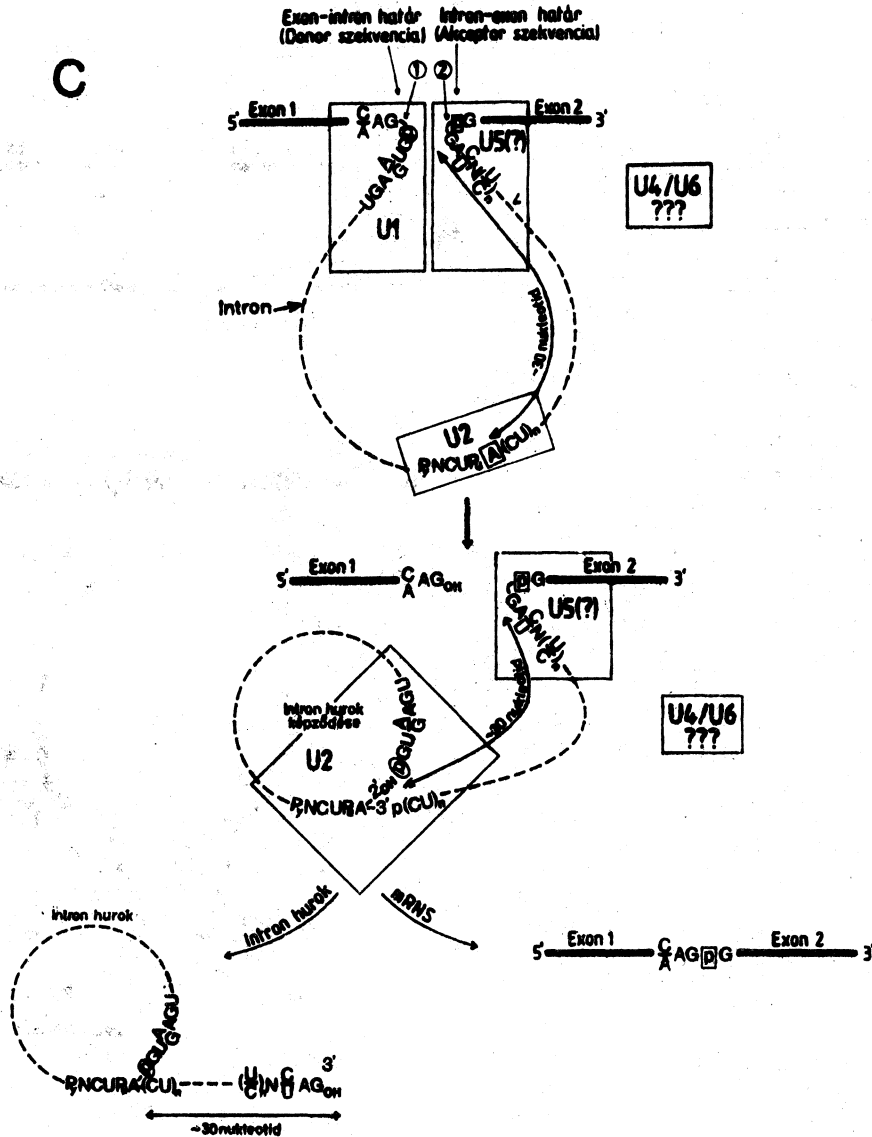
A, Szkematikus vázlat (Crick 1979/ után). B, Finomabb részletek korábbi elképzelés szerint (Knowler és Wilks /1980/ után). C, Finomabb részletek jelenlegi elképzelés szerint (lásd a szöveg). A B és C ábrán az exonokban és intronban kiírt szekvenciák az ún. konszenzus szekvenciák, a bekarikázott számok pedig a vágási folyamatok sorrendiségét jelölik. A B ábrán az U1 kiírt szekvenciájára említs konszenzus szekvencia. A C ábrán a vágás során az intron hurokba kerülő foszfát-csoportot (D) -vel, a két exon ligálódása révén az érett mRNS-be került pedig (P) -vel emeltük ki. Az intron hurok képződése során az elágazást lehetővé tevő nukleotid valamennyi eddig vizsgált esetben adenilát-nak adódott. Az egyes U-snRNP-k kísérletileg alátámasztott helyeit a vágási komplexben (bekeretezett részek) a bennük levő U-snRNA-k jeleivel ábrázoltuk. A 3' vágási helynél az U5 snRNP nincs még egyértelműen identifikálva (/?/), az U4/U6 snRNP-ről pedig csak annyit lehet tudni, hogy jelenléte a vágás sikerességéhez szükséges, de helye a komplexben egyelőre ismeretlen (???). További részleteket lásd a szövegben.



intron-hurok struktúra és az exon 1 és exon 2 ligálódása révén keletkezett érett mRNS.

A pre-mRNS /ki/vágásával kapcsolatban a tiszta képződés végett hangsúlyoznunk kell, hogy a 7. ábrában közöltek kizárólag a proteinek kódoló eukarióta pre-mRNS-ek, és itt is elsősorban a humán β -globin- és az adenovírus kódolta pre-mRNS-ek kivágására vonatkoznak. E skémán kívül még számos /ki/vágási mechanizmus ismert különféle RNS-prekurzorokra (cf. Padgett és mtsai, 1986; Cech és Bass, 1986).

A legelső felvetés, amely szerint nagy prekurzor RNS molekulák vágásában kis RNS molekulák egyáltalán szerepet játszhatnak, Murray és Holliday (1979) tollából származott. Modell szintjén a megfelelő szekvenciák ismeretében bemutatták, hogy az adenovírus-2 hexon gén transzkriptumának egyik vágási helyén a szintén a vírus által kódolt egyfajta kis ún. vírus-asszociált RNS (virus-associated RNA, VA-RNA) mind az intronnal, mind pedig a két exonnal egy 9 és 10 nukleotid-hosszú szakaszon bázispárosodásra képes, és



ezáltal illesztés útján meghatározhatja a vágás pontos helyét. A szerzők utaltak arra, hogy az eukariótákban levő U-snRNA-k hasonló mechanizmus szerint vehetnek részt a pre-mRNS-ek vágásában. Bár a VA-RNA ilyenféle szerepét később cáfolták (Gallinaro és mtsai, 1980), az alapötletnek az U-snRNA-kra vonatkozó része, ha részlegesen is, de igazolást nyert.

E bevezetés után nézzük az egyes snRNP-k feltételezett, vagy egyes esetekben bizonyítottan tűnő részvételét a pre-mRNS-ek vágásában.

4.2. Az egyes U-snRNA-k (U-snRNP-k) funkciója

U1. A Nature 1980, jan. 10. számában jelent meg Lerner és mtsainak (1980) dolgozata, amelyben beszámoltak arról, hogy különböző gerincesekből izolált U1 molekulák 5' végén olyan, 18 nukleotidból álló konszenzus szekvencia van, amely számos ismert pre-mRNS intron 5' és 3' végein található nukleotidszekvenciából levezetett konszenzus szekvenciával komplementer. E komplementaritás alapján a 7.B. ábrán bemutatotthoz hasonló modellt al-

kottak. Mivel modelljük alapján az intron-végek összetartásához a lehetséges bázispárosodás önmagában nem lehet elég erős, feltételezték, hogy ebben a folyamatban az U1-snrRNA mint U1-snrRNP vesz részt, tehát a kivágandó intron 5' és 3' végeinek egymáshoz illesztésében feltehetően fehérje-RNS kölcsönhatások is szerepet játszanak. E dolgozatukban egyébként a modell igazolására valamennyi addig ismert, és néhány általuk kísérletileg alátámasztott érvet is felhoztak. Alapvető az a jóslásuk, amely szerint nagy valószínűséggel a többi nukleoplazmatikus U-snrRNP is részt vesz a pre-mRNS vágásában és az az elképzelés (bár erre a mai napig sincs egyértelmű kísérleti bizonyíték), hogy az U-snrRNP-k proteinkomponenseinek valamelyike lehet maga a kivágó enzim. Gyakorlatilag ugyanilyen modellt közölt 4 hónap múlva Rogers és Wall (1980).

E modell megjelenése után nemsokára azonban két olyan közlemény jelent meg, az egyik az eredeti modellt közlő Steitz-laboratóriumtól, amely a modell módosítását tette szükségessé.

(i) A Steitz laboratórium egyik közleményéből (Mount és Steitz, 1981) kiderült, hogy a várakozással szemben a *Drosophila* U1 5' végének csak az a 9 nukleotidból álló szakasza teljesen konzervált, amely a modell szerint az 5' vágási helyet határoló nukleotidokkal képes bázispárosodásra. Ez a szakasz az U1 szekundér struktúrája alapján egyfonalú formában van jelen, tehát bázispárosodásra potenciálisan képes. Az U1-nek az eredeti modell szerint a 3' vágási hellyel bázispárosodó része azonban a *Drosophila*-ban nem tartalmazta a feltételezett konszenzus szekvenciát és egy része a komputeres számítások alapján legvalószínűbbnek adódó szekundér struktúrában már eleve intramolekulárisan egy kétfonalú szakasz egyik fonalaként szerepel, tehát további bázispárosodásra potenciálisan képtelen.

(ii) A fenti megállapítást igen szellemes megközelítéssel Rinke és mtsai (1984) kísérletileg igazolták. Ők HeLa sejtmagvakból U-snrRNP-t tisztítottak és ennek a molekula-populációnak alikvótjait olyan szintetikus oligodeoxiribonukleotidokkal reagáltatták, amelyek átfedőleg komplementerek voltak az U1 5' végének mind az 5' vágási hellyel, mind a 3' vágási hellyel komplementer szakaszaival. A reakció (bázispárosodás létrejötte) után a komplexeket RNáz H-val emésztették, amely köztudottan RNS-DNS hibridszakaszok RNS szálát bontja. Az így kezelt snrRNP-kből az U-snrRNA-kat kivonva és PAG-eken frakcionálva azt tapasztalták, hogy az U1 esetében csak olyankor kaptak rövidebb molekulát, amikor a hibridizációhoz használt oligodeoxinukleotid az U1-nek az 5' vágási hellyel, de nem a 3' vágási hellyel feltehetően hibridizáló szakaszával volt komplementer. Az U1 snrRNP-ben eszerint az U1 5' végének csak az a része szabad, amely az 5' vágási hellyel képes komplementálni. Egyébként a fent leírt alapvető módszert (szekvenciaspecifikus hidrolízis) az snrRNP-k funkciójának vizsgálata során egyre kiterjedtebben alkalmazzák (lásd lejjebb).

Jelenlegi felfogás szerint tehát az U1-snrRNP eukarióta pre-mRNS-ek vágása során az exon-intron határ (5' vágási hely, donor szekvencia) vágásában játszik szerepet (cf. Mount és mtsai, 1983), ahogyan azt a 7.C.ábrán jeleltük, bár a donor és akceptor szekvenciákat képviselő szintetikus egyfonalú DNS-sel és alaposan és csak durván tisztított U-snrRNP-ekkel végzett kötési kísérletek alapján Tatei és mtsai (1984) arra következtettek, hogy vagy maga az U1-snrRNP a lazábban kötött fehérjékkel együtt, vagy az U1-snrRNP+valamilyen faktor együttese mind a donor, mind az akceptor szekvenciát felismeri.

Az U1-snrRNP (az (ii)-ben általában az U-snrRNP-k) nélkülözhetetlenségét a (korrekt) intronvágáshoz egyéb dolgozatok sora támasztja alá:

(i) Izolált sejtmagvakban (HeLa) az adenovírus két

korai génjéről átírt RNS prekursorok vágása érett mRNS-ekké gátlódott, ha a sejtmagvakat U1-snRNP-re specifikus ellenanyaggal preinkubálták (Yang és mtsai, 1981).

(ii) Intakt sejtekbe (HeLa) liposzómával bevitt, MCTD-től szenvedő páciens szérumból tisztított, az U-snRNP-k fehérjéit felismerő IgG frakció gátolta az adenovírus két késői génjének kifejeződését (Lenk és mtsai, 1982).

(iii) In vitro kivágási rendszerben (HeLa sejtekből) U1-snRNP-vel specifikusan reagáló antiszérumok gátolták az adenovírus késői mRNS első és második vezető (leader) exon-jainak vágását (Padgett és mtsai, 1983).

(iv) In vitro kivágási rendszerben (HeLa sejtmagvakból) az adenovírus fő késői (major late) pre-mRNS vágása nem történt meg, ha a rendszerből az U-snRNP-eket az azokat felismerő autoimmun ellenanyagokkal elvonták. Tisztított U-snRNP-k visszaadása a rendszerhez visszaállította a vágási aktivitást. A kivágási rendszer hibátlan működéséhez az U1-snRNP-ben levő U1 RNS 5' végének intakt voltára volt szükség, mert a kivágás nem történt meg, ha a) akár anti-m_{3,2,2,1}G antiszérumot adtak a rendszerhez, b) akár az U1 5' végén levő nyolc nukleotidot a már fentebb ismertetett "RNáz H-val történő szekvensspecifikus hidrolízissel" (Rinke és mtsai, 1984) eltávolították (Krämer és mtsai, 1984).

(v) In vivo Xenopus laevis oocitákba injektált gén (egy riboszomális fehérje génje) transzkriptuma (pre-mRNS) nem ment át a szabályos (ki)vágási folyamaton, ha a gén injektálása előtt az oocitákba U1-snRNP-re specifikus ellenanyagot juttattak be (Bozzoni és mtsai, 1984).

U2. Az U2 lehetséges részvételére a pre-mRNS vagasában először csakúgy, mint az U1 esetében, modell jelent meg (Ohshima és mtsai, 1981b), amely azonban nem az intronok konszenzus szekvenciáit vonta be az U2 egyes régióival történő lehetséges bázispárosodás létrejöttébe, hanem egyes eukarióták pre-mRNS-eiben jelenlévő exon-szekvenciákat ("exon modell"). Ezt a modellt kísérletileg azóta sem támasztották alá, egy másik modell azonban (Keller és Noon, 1984), annak ellenére, hogy a felállításához felhasznált U2 szekvenciák valószínűleg nem vesznek részt bázispárosodásban az intronnal, egy részét illetően kísérleti alátámasztást nyert. Fenti szerzők kiterjedt komputeres analízissel azt találták, hogy az eukarióta U2 41. és 53. nukleotidjai közé eső szakasz két vége 3' GACUAGUC 5' elvileg bázispárosodni képes az emlős intron-hurok-képződésben résztvevő 5' CUGAU 3' és a 3' vágási helyen lévő 5' CAG 3' szekvenciákkal (lásd a 7.C.ábrán az 5' CUPuAC 3' és 5' CAG 3' konszenzus szekvenciákat). Ezt a komplementaritást később Keller és Noon (1985) a Drosophila U2-re és számos Drosophila intronra nézve is megtalálták. A dolog pikantériája az, hogy a Steitz-laboratórium (Black és mtsai, 1985) in vitro rendszerben, a manapság maximálisan elérhető metodológiai fegyvertár egészét (szintetikus oligodeoxiribonukleotidokkal való hibridizálást követő szekvensspecifikus hidrolízis RNáz H-val (Rinke és mtsai, 1984), in vitro vágási rendszer sejtmagextraktumban (Dignam és mtsai, 1983), immunoprecipitáció és T1-hidrolízis kivédésén alapuló analízis) felhasználva arra a következtetésre jutott, hogy az U2-snRNP a pre-mRNS vágása során valóban az intron-hurok elágazási helyéhez kapcsolva fordul elő (7.C. ábra), de a kísérleti adatok inkább támogatják azt a feltételezést, hogy ebben a kapcsolatban nem a Keller és Noon (1984) által feltételezett U2-szekvencia vesz részt, hanem az U2 molekula 5' vége. Az U2 5' végének érintetlensége a Maniatis-laboratórium adatai (Kraimer és Maniatis, 1985) szerint is szükséges az eredményes vágáshoz. Ugyanakkor arra, hogy az U2 az intron 3' vágási helyéhez is kapcsolódna, mint ahogy ezt

kor, ha az oocitákhoz komplementációs tesztben egy olyan tengeri sünn kromoszomális komponenst adnak, amelynek aktív faktora 12S-sel ülededik (Stunnenberg és Birnstiel, 1982). Erről a faktorról később kiderült, hogy az egy olyan RNP, amely egy kb. 60 nukleotidból álló RNS-t tartalmaz, és ez az RNS önmagában is képes a H3 mRNS korrekt terminációját a 3' végnél elősegíteni (Galli és mtsai, 1983). A részletes analízis (Strub és mtsai, 1984) végül azt az eredményt adta, hogy a tengeri sünnből izolált fenti RNP anti-Sm ellenanyaggal reagál, tehát valódi U-snRNP-nek tűnik. A cDNS alapján szekvenált RNS komponens (U7) 5' vége pedig komplementernek bizonyult a hiszton pre-mRNS-ek 3' végének konzervált szekvenciájával.

4.3. A jövő várható irányai

Mint láttuk, az egyes U-snRNA-k lehetséges funkcióinak felderítése a múltban legtöbbször modellek felállításával indult. Ezek a modellek mindig RNS molekulaszakaszok között elméletileg várható bázispárosodások feltételezésén alapultak, és hol beváltak (több-kevesebb módosítással), hol nem. Az ilyen modellek hiányosságának egyre világosabban kirajzolódó oka az, hogy ezek szükségszerűen figyelmen kívül hagyták azokat az RNS-fehérje és fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, amelyeknek a pre-mRNS-vágás szinteréül szolgáló és nemrég in vitro vágási rendszerek beható karakterizálása során felfedezett u.n. spliceosomák (Grabowski és mtsai, 1985; Frenthewey és mtsai, 1985; Grabowski és Sharp, 1986; Kaltwasser és mtsai, 1986) működésében alapvető szerepük kell, hogy legyen. Ezek a spliceosomák durva megközelítésben mintegy ekvivalensei az intakt sejtmagvakból már nagyon régen leírt hnRNP-knek (Samarina és mtsai, 1968). A legújabb eredmények arra engednek következtetni, hogy e két, eredetileg más és más kísérleti megközelítés eredményeként leírt RNS-protein komplexnek mind RNS-, mind polipeptid-komponensei között strukturális, és mi több, funkcionális összefüggés van (Skoglund és mtsai, 1986; Mayrand és mtsai, 1986; Hwang, 1986; Sierakowska és mtsai, 1986; Choi és mtsai, 1986; Sperling és mtsai, 1986). A jövőben a spliceosomák modern technikákkal in vitro rendszerekben nagy efficienciával végezhető strukturális és funkcionális analízise, különös tekintettel a fehérjék szerepére, várhatóan közelebb fog vinni az in vivo kimutatható hnRNP-k funkciójának sensu lato molekuláris biológiai értelmezéséhez. Érdekes módon egyre több párhuzamot fedeznek fel a spliceosomák és riboszómák "összeállításának" (assembly) részletfolyamatai között (Perkins és mtsai, 1986; Grabowski és Sharp, 1986). Természetesen a rekombináns DNS technológia fejlettségének jóvoltából az eddig kapott eredmények finomítására (U-snRNA gének szignálszekvenciáinak (cf. Huang, 1986) és a pre-mRNS-ek korrekt vágásához szükséges szignálszekvenciáknak analízise szekvensspecifikus "mutáns" gének, prekursorok, és U-snRNA-k alkalmazása révén) is számítani kell. Az egyéb vágási mechanizmusok (pl. a "self-splicing" /cf. Cech és Bass, 1986/) részletes további analízise várhatóan még sok érdekes adattal fog szolgálni. A legérdekesebb kérdés azonban az, hogy az U-snRNA-knak milyen szerepük lehet a génexpresszió sensu stricto regulálásában, vagyis meghatározott pre-mRNS-ek kitüntetett vágásában. Ebből a szempontból nem érdektelen az egyes U-snRNA fajták variánsainak /lásd 1.1. (iv)/, a "minor" U-snRNA-knak (lásd 1.1. utolsó előtti bekezdés) és nem utolsósorban az "U-snRNA ekvivalenseknek" (lásd 1.3.1.) feltérképezése és különösen annak vizsgálata, hogy ezek miként viselkednek a sejtdifferenciáció folyamán (Forbes és mtsai, 1984).

5. Növényi U-snrRNA-k

A növényi U-snrRNA-k vizsgálata pontosan 20 évvel később indult, mint az emlős U-snrRNA-ké. A kutatások beindulását hátráltató leglényegesebb körülmény az volt, hogy egészen a legutóbbi időkig nem sikerült olyan növényi sejtmagizolálási módszert kidolgozni, amely intakt növényekből degradációmentes nukleáris kis RNS-ek extrakciójához megfelelő kiindulási anyagul szolgáló sejtmag-preparátumot eredményezett volna.

5.1. Szerkezet

Az első eredményről Krol és mtsai (1983) számoltak be. Ők a specifikus m₂^{2,2,7}G sarkával rendelkező U-snrRNA-eket (kézenfekvő okból az U6, és ismeretlen okból az U3 és U4 kivételével) tudták immunológiailag detektálni és sejtmagvakban dúsított preparátumból extrahálni. Az U5 öt variánsának teljes szekvenciáját, valamint az U1 és U2 3' végszakaszának szekvenciáit közölték. Skuzeski és Jendrisak (1985) búzanövények citoplazmájából (!) izoláltak és részlegesen szekvenáltak egy U2-höz hasonló kis RNS-t. Végül Kiss és mtsai (1985)-nak sikerült lóbablevelekből és még egy sor növényi anyagból olyan tiszta sejtmagpreparátumokat kapni, amelyekből a nukleáris kis RNS-ek várhatóan valamennyi "fő" tagja (az U4 kivételével) további analízisre alkalmas mennyiségekben és degradációmentes állapotban extrahálható volt. Ezzel a módszerrel sikerült először

(i) nukleoláris U3-t növényi anyagban detektálni, nukleoluszból izolálni és a molekula nagyobb részét a 3' vég felől szekvenálni (Kiss és mtsai, 1985),

(ii) az U6-t lóbablevelek sejtmagvaiból izolálni és annak teljes szekvenciáját meghatározni (Kiss és mtsai, 1987a), valamint:

(iii) az U2-t lóbservablevelek sejtmagvaiból izolálni és annak szintén teljes szekvenciáját meghatározni (Kiss és mtsai, 1987b).

A fenti eredmények alapján dióhéjban annyit mondhatunk, hogy az eddig szekvenált növényi U-snrRNA-k, a feltűnően homológ növényi U6 kivételével, az emlős U-snrRNA-kkel nem mutatnak valami nagyfokú szekvenciahomológiát, a szekunder struktúra tekintetében azonban teljesen konzerváltak és valamennyi eddig meghatározott konszenzus szekvenciát is a várható pozíciókban tartalmazzák.

Érdekes, hogy az U4-et növényi anyagban eddig senki sem detektálta, beleértve saját laboratóriumunkat is.

A növényi U-snrRNA-k struktúrájának vizsgálata azért tűnik perspektivikusnak, mert hozzájárulhat további, feltehetően funkcionális szempontból jelentős konszenzus szekvenciák feltárásához (Kiss és mtsai, 1985; Jakab és mtsai, 1986; Kiss és mtsai, 1987a; Kiss és mtsai, 1987b), amelyek ezideig, főleg az eddig vizsgált eukarióta U-snrRNA-k között meglevő nagyfokú szekvenciahomológia miatt, "rejtve" maradtak. Ezen túlmenően az U-snrRNA-k és viroidok (cf. Solymosy, 1983) között felfedezett szekvenciahomológiák (Kiss és Solymosy, 1982; Kiss és mtsai, 1983; Solymosy, 1983; Solymosy és Kiss, 1985) hozzájárulhatnak a viroidok patogenicitásának molekuláris szintű értelmezéséhez (Jakab és mtsai, 1986).

5.2. Lokalizáció

Általában a növényi U-snrRNA-k nukleáris, és specifikusan a növényi U3 nukleoláris lokalizációja egyértelmű (Kiss és mtsai, 1985). Saját adata-

inkon (Kiss és mtsai, 1986) kívül (lásd 2.2.4.) növényi U-snRNP-kről a mai napig nincs adat.

5.3. Bioszintézis és transzkripció

Növényi U-snRNA-k prekursorairól, vagy az ezek transzkripciójáért felelős enzimekről nincs adat. Legújabban van Santen és mtsai (1986) babból izoláltak U1 gént. Előzetes közlésük szerint a bab csak 1-2 U1 génkópiát tartalmaz haploid genomként. Saját laboratóriumunkban beindultak a kísérletek növényi U-snRNA gének és pszeudogének izolálására és karakterizálására (Kiss és Solymosy, 1987).

5.4. Funkció

Növényi U-snRNP-k részvételére pre-mRNS vágásában növényi rendszerekben nincs adat. Az ok, azon kívül, hogy egyáltalán a növényi U-snRNP-k szerkezete nem ismert, az, hogy növényekből működőképes nukleáris in vitro (ki)vágási rendszert tudomásunk szerint mindezideig nem sikerült produkálni. Egyetlen modellről van tudomásunk (Jakab és mtsai, 1986), amely szerint növényi U3 és növényi ITS2 adott szakaszai között elméletileg elképzelhető bázispárosodás alapján a Bachellerie-modell (lásd 6. ábra és 4.2.) növényi rendszerre is adaptálható. Van Santen és Spritz (1986) szerint a phaseolin (bab raktározó fehérje) gén olyan transzkriptuma, amely az első intront és az azt határoló első és második exont tartalmazta, HeLa nukleáris in vitro vágási rendszerben nem vágódott, de Cos (majom) sejtekben in vivo igen. Ezzel szemben a növényi ribulóz 1,5-biszfoszfát karboxiláz gén megfelelően konstruált transzkriptuma Hartmuth és Barta (1986) szerint HeLa nukleáris kivonatban in vitro szabályos vágáson ment át. Ezzel teljesen egybehangzó eredményre jutottak gyakorlatilag azonos módszerek alkalmazásával Brown és mtsai (1986) a búza egy amiláz és a borsó legumin pre-mRNS-einek vágását illetően. Külön értéke ez utóbbi dolgozatnak 168 növényi intron komputeres analíziséből adódó konszenzus szekvenciák közlése. Eszerint az 5' vágási hely növényi konszenzus szekvenciája $^A CAGGUAAGU$ (cf. a 7.C ábrán közölt $^A AGGU^A AGU$ szekvencia) a 3' vágási helyé pedig $UUU^U UU^U UUUUUU GCAGG$ (cf. a 7.C ábrán közölt $^U N^C AGG$ szekvencia). Míg tehát az 5' vágási hely növényi konszenzus szekvenciája gyakorlatilag teljesen megegyezik az általános eukarióta konszenzus szekvenciával, a 3' vágási hely esetében növényeknél egy viszonylagos purin gazdagság figyelhető meg. Talán ez az oka annak, hogy egyes esetekben (pl. Van Santen és Spritz, 1986) növényi pre-mRNS-ek HeLa rendszerben nem vágódnak szabályszerűen. Az intronhurok képződésében szerepet játszó elágazási pontot határoló (cf. 7.C ábra) növényi konszenzus szekvencia megállapítására jelenleg, az adatok kis száma miatt, még nincs mód. Annyi azonban már látszik, hogy az elágazási pontot itt is egy, a 3' vágási helytől mintegy 30 nukleotid távolságra levő adenilát alkotja.

Várható, hogy elsősorban növényi in vitro vágási rendszerek kidolgozása után a növényi U-snRNA-k és U-snRNP-k vizsgálata ugrásszerűen fel fog lendülni. Nem tűnik irreálisnak az az elképzelés, hogy az eukarióta pre-mRNS éréseinek van (néhány) olyan jellemzője, amelyre éppen növényi rendszerek vizsgálata révén derülhet csak fény.

SOLYMOSY FERENC

és

KISS TAMÁS (3.3. fejezet)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS. Köszönetet mondunk HEGYI HEDVIG tud.smtársnak a lelkiismeretes szövegszerkesztésért, DOKTOR MÁRIA titkárnőnek a gondos, fáradságot nem ismerő gépelésért, DUSHA BÉLA fotolaborvezetőnek a színvonalas fotolaboratóriumi munkáért, valamint KÓSZÓ TIBOR-nak a precíz, szép rajzokért. Saját munkacsoportunk ehelyütt ismertetett eredményeihez az alábbi pályázatok elnyeréséből eredő anyagi támogatás segített hozzá: KKA 363/1.6./82, KKA 8/1/400/2/85/1/118, AKA 209/86, OTKA 564/86 és OKKFT(Tt)/86.

IRODALOM[§]

- Adams, D.S., Herrera, R.J., Lührmann, R., Lizardi, P.M. (1985): *Biochemistry*, 24: 117-125.
- Adams, R.L.P., Burdon, R.H., Campbell, A.M., Leader, D.P., Smellie, R.M.S. (1981): *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. 9th Edition. Chapman and Hall, London-New York, pp. XIV+517.
- Ares, M., Jr. (1986): *Cell*, 47: 49-59.
- Ares, M., Jr., Mangin, M., Weiner, A.M. (1985): *Mol.Cell.Biol.*, 5: 1560-1570.
- Bachellerie, J.-P., Michot, B., Raynal, F. (1983): *Mol.Biol.Rep.*, 9: 79-86.
- Berget, S.M. (1984): *Nature*, 309: 179-182.
- Bernstein, L.B., Mount, S.M., Weiner, A.M. (1983): *Cell*, 32: 461-472.
- Bernstein, L.B., Manser, T., Weiner, A.M. (1985): *Mol.Cell.Biol.*, 5: 2159-2171.
- Billings, P.B., Hoch, S.O. (1984): *JBC*, 259: 12850-12856.
- Black, D.L., Steitz, J.A. (1986): *Cell*, 46: 697-704.
- Black, D.L., Chabot, B., Steitz, J.A. (1985): *Cell*, 42: 737-750.
- Bozzoni, I., Annesi, F., Beccari, E., Fracapane, P., Pierandrei-Amaldi, P., Amaldi, F. (1984): *JMB*, 180: 1173-1178.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Gallinaro, H., Jacob, M., Sri-Widada, J., Jeanteur, P. (1980): *NAR*, 8: 4143-4154.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B., Jacob, M. (1982): *EMBO J.*, 1: 1259-1265.
- Branlant, C., Krol, A., Lazar, E., Haendler, B., Jacob, M., Galego-Dias, L Ponsada, C. (1983): *NAR*, 11: 8359-8367.
- Bringmann, P., Rinke, J., Appel, B., Reuter, R., Lührmann, R. (1983): *EMBO J.*, 2: 1129-1135.
- Bringmann, P., Appel, B., Rinke, J., Reuter, R., Theissen, H., Lührmann, R. (1984): *EMBO J.*, 3: 1357-1363.
- Bringmann, P., Reuter, R., Winkelmann, G., Bochnig, P., Lührmann, R. (1986): *CSHL*, p.33.
- Brown, A., Marzluff, W. (1978): *BBA*, 521, 662-676

§ A nemzetközileg elfogadottaktól eltérő folyóiratrövidítések az alábbiak:

BBA, *Biochim.Biophys.Acta*; BBRC, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; EJB, *Eur.J.Biochem.*; JBC, *J.Biol.Chem.*; JMB, *J.Mol.Biol.*; NAR, *Nucleic Acids Res.*; PNAS, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*.

Az irodalomjegyzékben a CSHL rövidítés az alábbi kiadványra utal: Abstracts of papers presented at the 1986 meeting on RNA Processing, May 14-May 18, 1986. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Brown, J.W.S., Feix, G., Friendewey, D. (1986): *EMBO J.*, 5: 2749-2758.
- Brunel, C., Sri-Widada, J., Lelay, M.N., Jeanteur, P., Liautard, J.P. (1981): *NAR*, 9: 815-830.
- Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L., Choi, Y.E. (1982): *Ann.Rev.Biochem.*, 51: 617-654.
- Calvet, J.P., Pederson, T. (1981): *Cell*, 26: 363-370.
- Calvet, J.P., Meyer, L.M., Pederson, T. (1982): *Science*, 217: 456-458.
- Cech, T.R., Bass, B.L. (1986): *Ann.Rev.Biochem.*, 55: 599-629.
- Chabot, B., Black, D.L., Le Master, D.M., Steitz, J.A. (1985): *Science*, 230: 1344-1349.
- Chandrasekharappa, S.C., Smith, J.H., Eliceiri, G.L. (1983): *J.Cell.Physiol.*, 117: 169-174.
- Choi, Y.D., Grabowski, P.J., Sharp, P.A., Dreyfuss, G. (1986): *Science*, 231: 1534-1539.
- Ciliberto, G., Buckland, R., Cortese, R., Philipson, L. (1985): *EMBO J.*, 4: 1537-1543.
- Crick, F. (1979): *Science*, 204: 264-271.
- Crouch, R.J., Kanaya, S., Earl, P.L. (1983): *Mol.Biol.Rep.*, 9: 75-78.
- Deimel, B., Louis, Ch., Sekeris, C.E. (1977): *FEBS Lett.*, 73: 80-84.
- Denison, R.A., Weiner, A.M. (1982): *Mol.Cell.Biol.*, 2: 815-828.
- Denison, R.A., Van Arsdell, S.W., Bernstein, L.B., Weiner, A.M. (1981): *PNAS*, 78: 810-814.
- De Robertis, E.M., Lienhard, S., Parisot, R.F. (1982): *Nature*, 295: 572-577.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983): *NAR*, 11: 1475-1489.
- Dingman, C.W., Peacock, A.C. (1968): *Biochemistry*, 7: 659-668.
- Earley, J.M., III, Roebuck, K.A., Stumph, W.E. (1984): *NAR*, 12: 7411-7421.
- Eliceiri, G.L. (1974): *Cell*, 3: 11-14.
- Eliceiri, G.L. (1980): *J.Cell.Physiol.*, 102: 199-207.
- Eliceiri, G.L., Sayavedra, M.S. (1976): *BBRC*, 72: 507-512.
- Enger, M.D., Walters, R.A. (1970): *Biochemistry*, 9: 3551-3562.
- Epstein, P., Reddy, R., Henning, D., Busch, H. (1980): *JBC*, 255: 8901-8906.
- Epstein, P., Reddy, R., Busch, H. (1984): *Biochemistry*, 23: 5421-5425.
- Flytzanis, C., Alonso, A., Louis, Ch., Krieg, L., Sekeris, C.E. (1978): *FEBS Lett.*, 96: 201-206.
- Forbes, D.J., Kirschner, M.W., Caput, D., Dahlberg, J.E., Lund, E. (1984): *Cell*, 38: 681-689.
- Francoeur, A.M., Gritzmacher, C.A., Peebles, C.L., Reese, R.T., Tan, E.M. (1985): *PNAS*, 82: 3635-3639.
- Frederiksen, S., Hellung-Larsen, P. (1975): *FEBS Lett.*, 58: 374-378.
- Frederiksen, S., Hellung-Larsen, P., Gram Jensen, E. (1978): *FEBS Lett.*, 87: 227-231.
- Friendewey, D., Keller, W. (1985): *Cell*, 42: 355-367.
- Galli, G., Hofstetter, H., Stunnenberg, H.G., Birnstiel, M.L. (1983): *Cell*, 34: 823-828.
- Gallinaro, H., Jacob, M. (1981): *BBA*, 652: 109-120.
- Gallinaro, H., Gattoni, R., Stévenin, J., Jacob, M. (1980): *BBRC*, 95: 20-26.
- Grabowski, P.J., Sharp, P.A. (1986): *Science*, 233: 1294-1299.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R., Sharp, P.A. (1985): *Cell*, 42: 345-353.
- Gram Jensen, E., Hellung-Larsen, P., Frederiksen, S. (1979): *NAR*, 6: 321-330.
- Guialis, A., Arvanitopoulou, A., Patrino-Georgoula, M., Sekeris, C.E. (1983): *FEBS Lett.*, 151: 127-133.

- Guimont-Ducamp, Ch., Sri-Widada, J., Jeanteur, Ph. (1977): *Biochimie*, 59: 755-758.
- Gurney, T., Jr., Eliceiri, G.L. (1980): *J.Cell.Biol.*, 87: 398-403.
- Guthrie, C. (1986): *Trends Biochem. Sci.*, 11: 430-434.
- Habets, W., Hoet, M., Bringmann, P., Lührmann, R., Van Venrooij, W. (1985): *EMBO J.*, 4: 1545-1550.
- Hadjiolov, A.A. (1985): *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. Cell Biology Monographs*, Springer Verlag, New York, 12: XI+268.
- Harada, F., Kato, N., Nishimura, S. (1980): *BBRC*, 95: 1332-1340.
- Hardin, J.A., Rahn, D.R., Shen, C., Lerner, M.R., Wolin, S.L., Rosa, M.D., Steitz, J.A. (1982): *J.Clin.Invest.*, 70: 141-147.
- Hartmuth, K., Barta, A. (1986): *NAR*, 14: 7513-7528.
- Hashimoto, C., Steitz, J.A. (1984): *NAR*, 12: 3283-3293.
- Hashimoto, C., Steitz, J.A. (1986): *Cell*, 45: 581-591.
- Hayashi, K. (1981): *NAR*, 9: 3379-3388.
- Hellung-Larsen, P., Tyrsted, G., Engberg, J., Frederiksen, S. (1974): *Exp.Cell Res.*, 85: 1-7.
- Hellung-Larsen, P., Kulamowicz, I., Frederiksen, S. (1980): *BBA*, 609: 201-204.
- Hellung-Larsen, P., Gram Jensen, E., Frederiksen, S. (1981): *BBRC*, 99: 1303-1310.
- Hentschel, C., Probst, E., Birnstiel, M.L. (1980): *Nature*, 288: 100-102.
- Hernandez, N. (1985): *EMBO J.*, 4: 1827-1837.
- Hinterberger, M., Pettersson, I., Steitz, J.A. (1983): *JBC*, 258: 2604-2613.
- Hodnett, J.L., Busch, H. (1968): *JBC*, 243: 6334-6342.
- Howard, E.F. (1978): *Biochemistry*, 17: 3228-3236.
- Huang, P.C. (1986): In: *DNA Systematics, Vol.I: Evolution* (Dutta S.K. ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 190-221.
- Hwang, I. (1986): *Fed.Proc.*, 45: 1704.
- Jacob, M., Lazar, E., Haendler, B., Gallinaro, H., Krol, A., Branlant, C. (1984): *Biol.Cell*, 51: 1-10.
- Jakab, G., Kiss, T., Solymosy, F. (1986): *BBA*, 868: 190-197.
- Kaltwasser, G., Spitzer, S.G., Goldenberg, C.J. (1986): *NAR*, 14: 3687-3701.
- Kato, N., Harada, F. (1984): *BBA*, 782: 127-131.
- Keller, E.B., Noon, W.A. (1984): *PNAS*, 81: 7417-7420.
- Keller, E.B., Noon, W.A. (1985): *NAR*, 13: 4971-4981.
- Kinlaw, C.S., Dusing-Swartz, S.K., Berget, S.M. (1982): *Mol.Cell.Biol.*, 2: 1159-1166.
- Kinlaw, C.S., Robberson, B.L., Berget, S.M. (1983): *JBC*, 258: 7181-7189.
- Kiss, T., Solymosy, F. (1982): *FEBS Lett.*, 144: 318-320.
- Kiss, T., Solymosy, F. (1987): *Acta Biochim.Biophys.Hung.*, in press.
- Kiss, T., Pósfai, J., Solymosy, F. (1983): *FEBS Lett.*, 163: 217-220.
- Kiss, T., Tóth, M., Solymosy, F. (1985): *EJB*, 152: 259-266.
- Kiss, T., Jakab, G., Antal, M., Hadlaczký, G., Solymosy, F. (1986): *CSHL*, p.100.
- Kiss, T., Antal, M., Solymosy, F. (1987a): *NAR*, 15(2): in press.
- Kiss, T., Antal, M., Solymosy, F. (1987b): *NAR*, 15(3): in press.
- Knight, E., Jr., Darnell, J.E. (1967): *JMB*, 28: 491-502.
- Knowler, J.T., Wilks, A.F. (1980): *Trends Biochem.Sci.*, 5: 268-271.
- Korf, G.M., Stumph, W.E. (1986): *Biochemistry*, 25: 2041-2047.
- Krainer, A.R., Maniatis, T. (1985): *Cell*, 42: 725-736.
- Kramer, A., Keller, W., Appel, B., Lührmann, R. (1984): *Cell*, 38: 299-307.
- Krol, A., Ebel, J.P., Rinke, J., Lührmann, R. (1983): *NAR*, 11: 8583-8595.
- Krol, A., Lund, E., Dahlberg, J.E. (1985): *EMBO J.*, 4: 1529-1535.
- Künkel, G.R., Pederson, T. (1985): *Mol.Cell.Biol.*, 5: 2332-2340.

- Kunkel, G.R., Maser, R.L., Calvet, J.P., Pederson, T. (1986): PNAS, 83: 8575-8579.
- Larsen, C.-J., Galibert, F., Lelong, J.-C., Boiron, M. (1967): C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 264: 1523-1526.
- Lenk, R.P., Maizel, J.V., Jr., Cronch, R.J. (1982): EJB, 121: 475-482.
- Lerner, M.R., Steitz, J.A. (1979): PNAS, 76: 5495-5499.
- Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L., Steitz, J.A. (1980): Nature, 283: 220-224.
- Lerner, E.A., Lerner, M.R., Janeway, C.A., Steitz, J.A. (1981): PNAS, 78: 2737-2741.
- Liautard, J.-P., Sri-Widada, J., Brunel, C., Jeanteur, P. (1982): JMB, 162: 623-643.
- Lindgren, V., Ares, M., Jr., Weiner, A.M., Francke, V. (1985): Nature, 314: 115-116.
- Lischwe, M.A., Ochs, R.L., Reddy, R., Cook, R.G., Yeoman, L.C., Tan, E.M., Reichlin, M., Busch, H. (1985): JBC, 260: 14304-14310.
- Liu, M.-H., Reddy, R., Henning, D., Spector, D., Busch, H. (1984): NAR, 12: 1529-1542.
- Lund, E., Dahlberg, J.E. (1984): JBC, 259: 2013-2021.
- Lund, E., Bostock, C., Robertson, M., Christie, S., Mitchen, J.L., Dahlberg, J.E. (1983): Mol.Cell.Biol., 3: 2211-2220.
- Lührmann, R., Appel, B., Bringmann, P., Rinke, J., Reuter, R., Rothe, S., Bald, R., (1982): NAR, 10: 7103-7113.
- Madore, S.J., Wieben, E.D., Pederson, T. (1984a): J.Cell Biol., 98: 188-192.
- Madore, S.J., Wieben, E.D., Kunkel, G.R., Pederson, T. (1984b): J.Cell Biol., 99: 1140-1144.
- Manser, T., Gesteland, R.F. (1982): Cell, 29: 257-264.
- Marzluff, W.F., White, E.L., Benjamin, R., Huang, R.C.C. (1975): Biochemistry, 14: 3715-3724.
- Marzluff, W.F., Brown, D.T., Lobo, S., Wang, S.-S. (1983): NAR, 11: 6255-6270.
- Maser, R.L., Calvet, J.P. (1986): CSHL, p. 114.
- Mattaj, I.W., Zeller, R. (1983): EMBO J., 2: 1883-1891.
- Mattaj, I.W., Habets, W.J., Van Venrooij, W.J. (1986): EMBO J., 5: 997-1002.
- Matter, L., Schopfer, K., Wilhelm, J.A., Nyffenegger, T., Parisot, R.F., De Robertis, E.M. (1982): Arth.Rheum., 25: 1278-1283.
- Mayrand, S.H., Pedersen, N., Pederson, T. (1986): PNAS, 83: 3718-3722.
- Mimori, T., Hinterberger, M., Pettersson, I., Steitz, J.A. (1984): JBC, 259: 560-565.
- Monstein, H.-J., Hammarström, K., Westin, G., Zabielski, J., Philipson, L., Pettersson, U. (1983): J.Mol.Biol., 167: 245-257.
- Mount, S.M., Steitz, J.A. (1981): NAR, 9: 6351-6368.
- Mount, S.M., Pettersson, I., Hinterberger, M., Karmas, A., Steitz, J.A. (1983): Cell, 33: 509-518.
- Muramatsu, M., Busch, H. (1964): Cancer Res., 24: 1028-1034.
- Muramatsu, M., Smetana, K., Busch, H. (1963): Cancer Res., 23: 510-518.
- Muramatsu, M., Hodnett, J.L., Busch, H. (1966): JBC, 241: 1544-1550.
- Murray, V., Holliday, R. (1979): FEBS Lett., 106: 5-7.
- Myslinski, E., Branlant, C., Wieben, E.D., Pederson, T. (1984): JMB, 180: 927-945.
- Nakamura, T., Prestayko, A.W., Busch, H. (1968): JBC, 243: 1368-1375.
- Naylor, S.L., Zabel, B.U., Manser, T., Gesteland, R., Sakaguchi, A.Y. (1984): Som.Cell.Mol.Gen., 10: 307-313.

- Northway, J.D., Tan, E.M. (1972): *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 1: 140-154.
- Ohshima, Y., Okada, N., Tani, T., Itoh, Y., Itoh, M. (1981a): *NAR*, 9: 5145-5158.
- Ohshima, Y., Itoh, M., Okada, N., Miyata, T. (1981b): *PNAS*, 78: 4471-4474.
- Padgett, R.A., Mount, S.M., Steitz, J.A., Sharp, P.A. (1983): *Cell*, 35: 101-107.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S., Sharp, P.A. (1986): *Ann.Rev.Biochem.*, 55: 1119-1150.
- Penman, S. (1966): *JMB*, 17: 117-130.
- Perkins, K.K., Furneaux, H.M., Hurwitz, J. (1986): *PNAS*, 83: 887-891.
- Perry, R.P., Bard, E., Hames, B.D., Kelley, D.E., Schibler, V. (1976): *Prog.Nucl.Acid Res.Mol.Biol.*, 19: 275-292.
- Pettersson, I., Hinterberger, M., Mimori, T., Gottlieb, E., Steitz, J.A. (1984): *JBC*, 259: 5907-5914.
- Prestayko, A.W., Busch, H. (1968): *BBA*, 169: 327-337.
- Prestayko, A.W., Tonato, M., Busch, H. (1970): *JMB*, 47: 505-515.
- Prüsse, A., Louis, Ch., Alonso, A., Sekeris, C.E. (1982): *EJB*, 128: 169-178.
- Raj, N.B.K., Ro-Choi, T.S., Busch, H. (1975): *Biochemistry*, 14: 4380-4385.
- Reddy, R. (1986): *NAR*, 14: r61-r72.
- Reddy, R., Busch, H. (1981): *The Cell Nucleus*, Ed. H. Busch, Academic Press, New York, 8: 261-306.
- Reddy, R., Henning, D., Busch, H. (1985a): *JBC*, 260: 10930-10935.
- Reddy, R., Henning, D., Chirala, S., Rothblum, L., Wright, D., Busch, H. (1985b): *JBC*, 260: 5715-5719.
- Reddy, R., Henning, D., Das, G. (1986): *JBC*, in press.
- Rein, A. (1971): *BBA*, 232: 306-313.
- Rein, A., Penman, S. (1969): *BBA*, 190: 1-9.
- Reuter, R., Lehner, C.F., Nigg, E.A., Lührmann, R. (1986): *FEBS Lett.*, 201: 25-30.
- Reveillaud, I., Lelay-Taha, M.-N., Sri-Widada, J., Brunel, C., Jeanteur, Ph. (1984): *Mol.Cell.Biol.*, 4: 1890-1899.
- Riedel, N., Wise, J.A., Swerdlow, H., Mak, A., Guthrie, C. (1986): *PNAS*, 83: 8097-8101.
- Rinke, J., Appel, B., Blöcker, H., Frank, R., Lührmann, R. (1984): *NAR*, 12: 4111-4126.
- Rinke, J., Appel, B., Digweed, M., Lührmann, R. (1985): *JMB*, 185: 721-731.
- Ro-Choi, T.S., Busch, H. (1974): *The Cell Nucleus*, Ed. H. Busch, Academic Press, New York 3: 151-208.
- Ro-Choi, T.S., Raj, N.B.K., Pike, L.M., Busch, H. (1976): *Biochemistry*, 15: 3823-3828.
- Rogers, J., Wall, R. (1980): *PNAS*, 77: 1877-1879.
- Roop, D.R., Kristo, P., Stumph, W.E., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1981): *Cell*, 23: 671-680.
- Saba, J.A., Busch, H., Wright, D., Reddy, R. (1986): *JBC*, 261: 8750-8753.
- Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Molnár, J., Georgiev, G.P. (1968): *JMB*, 33: 251-263.
- Seifert, H., Scheurlen, M., Northemann, W., Heinrich, P.C. (1979): *BBA*, 564: 55-66.
- Sekeris, C.E., Niessing, J. (1975): *BBRC*, 62: 642-650.
- Sekeris, C.E., Prüsse, A., Alonso, A., Louis, C. (1980): *Periodicum Biologorum*, 82: 309-317.
- Setyono, B., Pederson, T. (1984): *JMB*, 174: 285-295.
- Sierakowska, H., Szer, W., Furdon, P.J., Kole, R. (1986): *NAR*, 14: 5241-5254.

- Sklar, V.E., Roeder, R.G. (1977): *Cell*, 10: 405-414.
- Skoglund, U., Andersson, K., Strandberg, B., Daneholt, B. (1986): *Nature*, 319: 560-564.
- Skuzeski, J.M., Jendrisak, J.J. (1985): *Plant Mol.Biol.*, 4: 181-193.
- Skuzeski, J.M., Lund, E., Murphy, J.T., Steinberg, T.H., Burgess, R.R., Dahlberg, J.E. (1984): *JBC*, 259: 8345-8352.
- Solymosy, F. (1983): *Biokémia*, 7: 7-20.
- Solymosy, F., Kiss, T. (1985): In: *Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions* (K. Maramorosch, J.J. McKelvey eds) Academic Press, New York, pp. 183-199.
- Sperling, R., Spann, P., Offen, D., Sperling, J. (1986): *PNAS*, 83: 6721-6725.
- Sri-Widada, J., Liautard, J.-P., Assens, C., Brunel, C. (1981): *Mol.Biol.Rep.*, 8: 29-36.
- Sri-Widada, J., Assens, C., Liautard, J.P., Jeanteur, P., Brunel, C. (1982): *BBRC*, 104: 457-462.
- Sri-Widada, J., Liautard, J.-P., Brunel, C., Jeanteur, P. (1983): *NAR*, 11: 6631-6646.
- Steitz, J.A., Wolin, S.L., Rinke, J., Pettersson, I., Mount, S.M., Lerner, E.A., Hinterberger, M., Gottlieb, E. (1983): *CSH Symposia Quant.Biol.*, 47: 893-900.
- Stroke, I.L., Weiner, A.M. (1985): *JMB*, 184: 183-193.
- Strub, K., Galli, G., Busslinger, M., Birnstiel, M.L. (1984): *EMBO J.*, 3: 2801-2807.
- Stunnenberg, H.G., Birnstiel, M.L. (1982): *PNAS*, 79: 6201-6204.
- Tague, B.W., Gerbi, S.A. (1984): *J.Mol.Evol.*, 20: 362-367.
- Tamm, I., Kikuchi, T., (1979): *PNAS*, 76: 5750-5754.
- Tan, E.M., Kunkel, H.G. (1966): *J.Immunol.*, 96: 464-471.
- Tani, T., Watanabe-Nagasu, N., Okada, N., Ohshima, Y. (1983): *JMB*, 168: 579-594.
- Tatei, K., Takemura, K., Mayeda, A., Fujiwara, Y., Tanakak, H., Ishihama, A., Ohshima, Y. (1984): *PNAS*, 81: 6281-6285.
- Theissen, H., Rinke, J., Traver, C.N., Lührmann, R., Appel, B. (1985): *Gene*, 36: 195-199.
- Tollervey, D., Wise, J.A., Guthrie, C. (1983): *Cell*, 35: 753-762.
- Tschudi, C., Richards, F.F., Ullu, E. (1986): *NAR*, 14: 8893-8903.
- Udvardy, A., Seifart, K.N. (1976): *EJB*, 62: 353-363.
- Van Arsdell, S.W., Weiner, A.M. (1984a): *Mol.Cell.Biol.*, 4: 492-499.
- Van Arsdell, S.W., Weiner, A.M. (1984b): *NAR*, 12: 1463-1471.
- Van Arsdell, S.W., Denison, R.A., Bernstein, L.B., Weiner, A.M., Manser, T., Gesteland, R.F. (1981): *Cell*, 26: 11-17.
- Van Kan, P., Filipowicz, W. (1986): personal communication.
- Van Santen, V., Spritz, R.A. (1986): *CSHL*, Poster Session 3.
- Van Santen, V., Pasko, D., Spritz, R. (1986): *CSHL*, Poster Session 3.
- Watanabe-Nagasu, N., Itoh, Y., Tani, T., Okano, K., Koga, N., Okada, N., Ohshima, Y. (1983): *NAR*, 11: 1791-1801.
- Weinberg, R.A., Penman, S. (1968): *JMB*, 38: 289-304.
- Weinberg, R., Penman, S. (1969): *BBA*, 190: 10-29.
- Westin, G., Monstein, H.-J., Zabielski, J., Philipson, L., Pettersson, U. (1981): *NAR*, 9: 6323-6338.
- Westin, G., Lund, E., Murphy, J.T., Pettersson, U., Dahlberg, J.E. (1984a): *EMBO J.*, 3: 3295-3301.
- Westin, G., Zabielski, J., Hammarström, K., Monstein, H.-J., Bark, C., Pettersson, U. (1984b): *PNAS*, 81: 3811-3815.
- Wieben, E.D., Nenninger, J.M., Pederson, T. (1985): *JMB*, 183: 69-78.
- Wise, J.A., Weiner, A.M. (1980): *Cell*, 22: 109-118.

- Wooley, J.C., Cone, R.D., Tartof, D., Chung, S.Y. (1982): PNAS, 79: 6762-6766.
- Yang, V.W., Lerner, M.R., Steitz, J.A., Flint, S.J. (1981): PNAS, 78: 1371-1375.
- Yuo, C.-Y., Ares, M., Jr., Weiner, A.M. (1985): Cell, 42: 193-202.
- Zeller, R., Nyffenegger, T., De Robertis, E.M. (1983): Cell, 32: 425-434.
- Zeller, R., Carri, M.-T., Mattaj, I.W., De Robertis, E.M. (1984): EMBO J., 3: 1075-1081.
- Zieve, G., Benecke, B.J., Penman, S. (1977): Biochemistry, 16: 4520-4525.



FEBS Advanced Course on IMMUNOLOGICAL METHODS AND APPLICATIONS

GÖD 1986.IX.9-26

Második alkalommal rendezett FEBS-kurzust GERGELY János professzor gödi intézete (az elsőre 1981-ben került sor). Időközben az immunológia tudománya meglepően nagy fejlődésen ment keresztül, elsősorban a monoklonális ellenanyagok előállítása és alkalmazásaik tekintetében, de az emlősök immunrendszerében szerepet játszó sejtféleségek jellemzése, differenciálódásuk megismerése terén is. Az immunológiai laboratóriumokban rutinszerűen alkalmazott klasszikus technikák (pl. agglutinációs tesztek, immundiffúzió, limfocita szeparálás vérből, stb.) ismertetése mellett a tanfolyam anyagába a legfrissebb, legdivatosabb módszerek is beépültek, pl. az ELISA technika, az immunblotting, stb.)

És természetesen - a hallgatóság is vadonatúj volt. A résztvevők, főként fiatal kutatók, 16 európai országból verbuválódtak össze és sokféle szakterületről: gyári fejlesztő mérnök és kezdő immunológus egyaránt volt közöttük. Ez egyébként jól tükrözi az immunológiai módszerek egyre szélesebb körű elterjedését és fontosságát. A rendezők - korábbi jó tapasztalataik alapján - a gyakorlati tanfolyam előtt az immunológia alapkérdéseit ismerető előadássorozatot is szerveztek. Válogatott előadáscímek: Structure and function of the immune system (F. Melchers, Svájc); Structure and function of antibodies (R. Jefferis, Anglia). Monoclonal antibodies: strategy and techniques (Z. Eshnar, Izrael); Human B cell development, human macrophage development (G. Jánossy, Anglia). Az előadók egyike-másika hatalmas munkát vállalt magára: Dr. F. Melchers például csaknem 5 órányi előadást tartott - magával ragadó stílusban (több részletben, persze).

A gyakorlatokat a gödi stáb tagjai vezették. Ezek nyolcas hallgatói csoportokban folytak és - hála a jó előkészítésnek - rendre sikerültek. Ezt a tényt az tudja igazán értékelni, aki maga is vezetett már egyetemi laboratóriumi gyakorlatokat.

Sajnálatos viszont, hogy a bejelentett kiállítók nem képviselték magukat megfelelően, sőt volt, aki meg sem jelent. A sűrű program azonban mindenkit kárpótolhatott ezekért. A jól sikerült tanfolyam befejeztével csak az a tény hagyhatott némi keserű szájízt - legalábbis a hazai résztvevőkben, hogy a megtanult, nagy teljesítőképességű módszerek alkalmazása, ha különleges műszerezettséget általában nem is igényel, ám csak valutáért beszerezhető vegyszereket, mikrotiter edényeket, monoklonális ellenanyagokat annál inkább ...

Egy résztvevő:

ARÁNYI PÉTER

Géntechnológiai eredmények az ipari mikrobiológiában

The Laws of Applied Microbiology

The microorganism is always right.
 The microorganism is your friend.
 The microorganism is a sensitive partner.
 There are no stupid microorganism.
 Microorganisms can do anything.
 Microorganisms are smarter, wiser and
 more energetic than chemists,
 engineers and biologists.
 If you take care of your microbial friends,
 they will take care of your future.

David Perlman

A magyar nyelvben a technológia szó használata olyan elterjedt, mint a telefoné vagy a rádióé. Ezért helyesebbnek tűnik, ha „genetic engineering” (génmérnöki tudomány) helyett a géntechnológia összetett szót használjuk.

A géntechnológia a legmodernebb elméleti ismeretek és gyakorlati tapasztalatok alapján kimunkált módszerek alkalmazása, az egy-egy élő szervezet fenotípusát meghatározó idiotípus (genotípus) kialakítására. Az idiotípus (genotípus) a kromoszómában, a mitokondriumban, plasztiszokban és plazmidokban található DNS-ben kódolt öröklődő tulajdonságok összesége. A fenotípus viszont az idiotípus és a környezet kölcsönhatásának eredményeként megjelenő morfológiai és élettani (biokémiai) jellegek összessége. A címben szereplő ipari mikrobiológia végeredményben - a ma divatos biotechnológia fogalmkörét képviselve - teljes mértékben megfelel az EFB és a IUPAC-féle meghatározásnak, különösen akkor, ha azzal egészítjük ki a fogalom jellemzését, amelyet mindenki - kimondatlanul is beleért : a biotechnológia a mikrobiológiai, genetikai, biokémiai, vegyipari és műszaki tudományok eredményeinek és módszereinek összehangolt ipari alkalmazása élő sejtet vagy enzimet használó eljárásban - piacképes termék előállítására.

Az ipari mikrobiológusok ezt a meghatározást könnyen magukévá tehetik, mivel egyrészt a tématerülettel foglalkozó folyóiratok fedőlapján több mint huszonöt éve ez szerepel címként, másrészt pedig senki előtt nem kétséges, hogy az ipari fermentációs eljárások a múltban is hasznot hoztak és a jövőben is azzal kecsegtetnek, ha a természeti törvények nyújtotta lehetőségeket teljes mértékben kihasználjuk.

Az ipari fermentációs eljárások kimunkálásakor kezdettől fogva fontos szerepet kapott a gyakorlati genetikai munka - az általános mikrobiológiai tevékenységbe épülve, anélkül, hogy a gén kémiai szerkezete ismert lett volna. Ismert tényként fogadták el a mikroba ipari alkalmazhatóságát meghatározó tulajdonságok gazdasági jelentőségét és e tulajdonságok megőrzésének, más esetben

pedig megváltoztatásának szükségszerűségét. A megfelelő oltóanyag kiválasztásában azonban korábban csak a szelekcióra építhettek, bár a tulajdonságok módosítása, a génátvitel lehetősége az ipari mikrobiológus számára mindig elérendő cél, kimunkálandó technológia tárgya volt. Nem csoda, hogy az alap kutatásban elért eredmények, új felismerések és módszerek késedelem nélkül jelentek meg a technológia-fejlesztő és törzsnemesítő laboratóriumokban. Meglehetősen hosszú időn át a megfelelő szelekciós módszerrel párosított spontán és indukált mutáció jelentette a fejlesztés és a törzsnemesítés egyetlen technológiáját.

A transzdukció, az öröklődő tulajdonságok bakteriofágokkal való átvitelének lehetősége; a transzformáció, a genotípus örökletes megváltoztatása DNS átvitel útján; a vegetatív hibridizáció, később a protoplasztfúzió gyakorlati megvalósítása; az antibiotikum-rezisztenciát okozó enzimgéneket hordozó plazmidok (R-faktor) felfedezése és ezeknek a felismeréseknek ipari gyakorlatba vétele mind fokozta a törzsnemesítő laboratóriumok munkájának az eredményességét. A molekulárbiológiai ismeretek bővülése egyre tudatosabbá tette a kezdetben sok esetben csak empirikus alapon használt módszerek alkalmazását. A hetvenes években már széles körűvé vált az alap kutatási eredmények gyakorlati hasznosítása. Ez a folyamat a DNS kettős spirál szerkezetének felismerésével indult (1953), ezt követte a DNS-polimeráz (1958), az RNS-polimeráz és a mRNS felfedezése (1960), majd a genetikai kód felismerése. (1961-1966). Végül a DNS-ligáz izolálása (1967), majd az első restrikciós enzim felfedezése (1970) vezetett el az első rekombináns DNS-molekula előállításához (1972). E területen COHEN és BOYER munkája kiemelkedő jelentőségű (1973); a hibrid plazmidok előállítása. Ezek az eredmények egyrészt a természetes eredetű, más egyedből származó DNS darabok által meghatározott információk kifejeződését tették lehetővé, másrészt mesterséges gének felhasználásával olyan új vegyületek előállítására nyílt lehetőség, amelyeket azelőtt mikroba még nem termelt. Ma már kétségtelen az, hogy a hibrid plazmid megalkotása a fehérjeszintézis molekulárbiológiai megismerése céljából végzett alap kutatás eredménye. A működésre képes hibrid plazmid megalkotásának következménye pedig a géntechnológiai módszerek gyors fejlesztése lett. Ez már az alkalmazott kutatásokat támogató ipar gazdasági érdeke volt: gazdasági szükségszerűség, a piacon maradás feltétele. E módszerek gyors fejlődése ma bármilyen, természetes aminosavakból felépíthető peptid előállítására lehetőséget ad, ami az előállítási lehetőségek ismeretében forradalmi jelentőségűnek tekinthető.

A peptid-hormonok kémiai szintézise laboratóriumi körülmények között régóta megoldott feladat. Ez a módszer azonban az ipari gyakorlatban gazdaságosan csak értékes rövid peptidek szintézisére alkalmazható. Ezen a helyzeten a szilárd fázison végigvitt, automatizálható MERRIFIELD-szintézis gyakorlatba vétele sem sokat változtatott, jóllehet a módszer alkalmazói a 124 aminosavat tartalmazó, működőképes ribonukleázt is előállították ezen az úton. A közelmúltban az interleukin-3 több analóggját is előállították ezzel a módszerrel. Az automatizált kémiai szintézisnek a nem természetes aminosavakat tartalmazó, biológiailag aktív peptidek, hormon-analógok előállítása szempontjából van nagy jelentősége, hiszen ezek szintézise biológiailag nem oldható meg.

Szorgalmas biokémikusok természetes forrásból származó és bioreaktorba (enzimreaktorba) rögzített tiotempláton állítottak elő peptid antibiotikumokat aminosavakból. Ez a módszer azonban - a kiindulási anyagok magas ára miatt - a jó kihozatali eredmények ellenére nem kerülhetett ipari alkalmazásra. Mai ismereteink szerint viszont a természetes aminosavakat tartalmazó peptidek gazdaságos előállítására sikerrel alkalmazhatók a géntechnológiai módszerekkel előállított mikróbák. A géntechnológia nélkülözhetetlen, de önmagában nem elegendő eleme a sokak által csúcstechnológiának tekintett biotechnológiának. A gazdaságos termelés csak a meghatározásban felsorolt tudományágak magas színvonalú összehangolt alkalmazásától várható.

Peptidek mikrobiális (riboszomális) előállításának főbb lépései

1. Hibrid plazmid előállítása természetes vagy mesterséges gén felhasználásával úgy, hogy a belőle származó fúziós fehérje könnyen kiemelhető formában tartalmazza a kívánt peptidet, prohormont.
2. Plazmid hordozására alkalmas olyan gazdaszervezet kiválasztása és felhasználása, olyan fermentációs technológia kialakítása, amely nagy mennyiségű fúziós fehérjét tartalmazó sejttömeg előállítására alkalmas.
3. A fúziós fehérje kinyerése tiszta formában. (A fúziós fehérje pl. metionin közvetítésével béta-galaktozidáz fragmensbe ékelve tartalmazhatja a prohormont).
4. A gén által kódolt fehérje kihasítása a fúziós fehérjéből.
5. A célvegyület-pl. aktív peptid-hormon - előállítása a fúziós fehérjéből - a piac által igényelt minőségben.

Aligha lehet kétséges, hogy a biotechnológiai infrastruktúra hiánya akár a laboratóriumok felszereltségében, akár a fejekben vagy a kezekben, bármelyik lépés nem megfelelő színvonalon való művelése - eredménytelenségre vezet.

A közelmúltban csaknem minden géntechnológiával foglalkozó országban jelentek meg tudományos közlések és szabadalmi leírások az inzulin mikrobiális előállítására vonatkozó kutatómunkáról. Miért éppen az inzulint választották kísérleti objektumként? Mert az inzulin jól definiált, tiszta formában előállítható, 51 aminosavat tartalmazó vegyület (a); mert előállítása esetén viszonylag könnyebbnek látszott a forgalombahozatalt engedélyező eljárás keresztülvitele (b); mert a gyógyszerpiacon felhasznált mennyisége indokolta nagyipari eljárás megvalósítását - 40-50 t értéke több mint 1 milliárd \$ (c); a cukorbetegség számának növekedése nyomán évről-évre nő a világ inzulin szükséglete (d); mert életfontosságú termékről lévén szó a társadalom könnyebben viseli az anyagi áldozatokat és kevésbé kéri számon a befektetett tőke gyors megtérülését (e); mert ebben a programban mind a kémiai szintetizált DNS-t, mind pedig az emberi sejtekből előállított proinzulin gént ki lehet próbálni. Az eljárás kidolgozásakor a biotechnológiai eljárásba integrált szakágazatok tu-

dományos-technológiai színvonalának teljesítő képessége egyértelműen lemérhető és értékelhető. A laboratoriumi eredmények és módszerek méretnövelése a fejlesztő munka irányítóinak figyelmét a gazdaságos termelés szempontjából még fejlesztendő szakmai területre irányítja.

Köztudott, hogy a világ inzulin szükségletének piaci értéke meghaladja az antibiotikum-termelés piaci értékét, mégis a jelenleg elért technológiai színvonal miatt az eljárás kidolgozói nem sietik el a biotechnológiai módszerre való átállást. A gazdaságos termelés céljából még sok részfeladat vár megoldásra. Így növelni szükséges a mikrobában felhalmozódó fúziós fehérje mennyiségét és növelni szükséges az egységnyi fermentációs térfogatban előállítható mikrobatömeget is. A legújabb grádiens adagolási technológia alkalmazásával literenként már 80-100 g száraz *E. coli* sejttömeg is előállítható. *Pichia pastoris* tenyésztése 125 g száraz sejtet tartalmaz literenként - megfelelő technológiai fogások alkalmazásakor. - A piaci helyzetből következik, hogy az inzulin előállítás területén elért eredmények ellenére a kutatómunka változatlan lendülettel folyik tovább. Jelenleg ugyanis a sertés és marha hasnyálmirígyből kivont inzulin előállítási árával kell versenyeznie az eljárásnak. Az elmúlt évtizedekben a piacon maradt néhány nagy vállalat - NOVO, ELI LILLY, HOECHST - olyan jelentősen javította az eljárás hagyományos technológiáját, hogy az árak csökkenése és a minőség javulása miatt a gyengébbek kiszorultak a versenyből. Nem véletlen, hogy a géntechnológiai fejlesztésen alapuló útpari gyakorlatba vételében a világ két legnagyobb inzulint termelő vállalata jár az élen. Az ELI LILLY a bakteriális szintézist valósította meg ipari méretben. 70 millió dollár beruházásával évi 3-400 kg emberi inzulin (humulin) termelésével az amerikai belső piac igényeinek 15 %-át képes kielégíteni. A NOVO élesztősejttel kívánja megoldani a human inzulingyártást. Dániában az idén kezd termelni az első üzem. A NOVO néhány évvel ezelőtt már állított elő human inzulint (sertésinzulinból - egyetlen láncvégi aminosav sikeres cseréjével) s ezt a sertés inzulin árának kétszereséért hozta forgalomba, amivel versenytársai és a maga számára egyaránt megszabta a biotechnológiai úton előállítható inzulin árát.

A két nagy rivális vállalat termelési adatait titkosan kezelik, így a két eltérő technológia gazdaságosságáról nem lehet véleményt alkotni. Kétségtelen azonban az, hogy mindkét eljárás még jelentős továbbfejlesztést igényel, ha a jelenlegi inzulinárakat meg akarják közelíteni.

Egyes gazdasági elemzők (FROST et SULLIVAN) szerint a peptid-piac termelési értéke az évtized végére meghaladja az egy-milliárd \$-t; ezen belül a gamma-globulin termelés 50 millióról 80 millióra, a monoklonális ellenanyag termelése 5-ről 225 millióra, a limfokinek termelése 5-ről 200 millió \$-ra növekedhet.

Jelentős előrelépés tapasztalható a vakcina-termelés és a sejttal antigént tartalmazó készítmények területén. A MERCK - SHARP et DOHME hepatitis-B vakcinát készített élesztőbe ültetett felületi antigén géndarabjának felhasználásával. A fermentáció termékét kémiai kezeléssel aktiválják. Ez utóbbi lépés különbözteti meg a SMITH KLINE et FRENCH által forgalmazott hasonló ké-

szítménytől (Manufacturing Chemist, 1986 február). A HOFFMAN LA ROCHE cég malária elleni vakcinát állított elő, ennek forgalomba hozatala azonban csak több éves kipróbálás után várható (Nature 319, 1986). A géntechnológiai úton előállított kolera- vakcina kipróbálása az idén kezdődött meg (New Scientist 1986 március 20). A SCHERING Corp., amely 170 millió dollárt fordított gyártó kapacitásának kifejlesztésére, néhány hónapja engedélyt kapott az interferon-alfa 2b forgalmazására Intron-A néven. A HOFFMANN LA ROCHE cég interferon-alfa 2a terméke Roferon néven már korábban piacra került. A CETUS-TRITON együttműködésben elkészült béta-interferon kipróbálása is elkezdődött. Piacra kerül a hústermelésben hasznosítható csirke, sertés és szarvasmarha növekedési hormon. Megjelent a gyógyszerpiacon a géntechnológiai módszerekkel nyert emberi növekedési hormon, a gamma-interferon, az interleukin-1 és az interleukin-2, kipróbálás alatt van a tumor nekrozis faktor. Ezeknek a valódi gazdasági jelentőségét gyakorlati alkalmazhatóságuk fogja meghatározni.

A géntechnológiai tevékenység a hagyományos fermentációs eljárásokban, így az antibiotikumok előállításában is egyre nagyobb jelentőséget nyerhet. Nem véletlen, hogy az inzulin-gyártásban élenjáró ELI LILLY ezen a területen is vezető szerepet visz. Sikerrel klónozták az eritromicin szintézisét végző, 27 fehérjéből álló, 35 kilobázis méretű teljes enzimmolekulát. A bioszintézis teljes génkészletét pKC462 bifunkcionális kozmidba építve Streptomyces lividans-ba vitték és ez a törzs, amely eddig nem termelt makrolid típusú antibiotikumot, a kozmid hatására eritromicint kezdett termelni. Más kísérletekben az eritromicint termelő génkészletet tilozint termelő Streptomyces fradiae-ba vitték, aminek hatására új típusú antibiotikum képződött. Ugyanez a munkacsoport izolálta a penicillin és a kefalosporin szintézis közös intermediert előállító izopenicillin-N szintetáz génjét, amely E. coli-ban kifejeződött. Vizsgálataik szerint a Penicillium és az Acremonium fajokból izolált enzimek között nagyfokú homológia észlelhető.

Jelentős szerep vár a géntechnológiai módszerekre az enzimek előállítás területén is, hiszen világszerte nő az enzimek felhasználása. 1985-ben pl. az Egyesült Államokban a 185 millió \$ értékű enzimmolekulák 58 %-a került élelmiszeripari felhasználásra, 15 %-a pedig mosószerekbe; a többit a bőripar, a papíripar, a textilipar és a gyógyszeripar használta fel. Az analitikai és diagnosztikai célra alkalmazott enzimek mennyisége csupán néhány százalékot tett ki. Az évtized végére az USA-ban várhatóan 260 millió \$-ra nő az éves enzimmolekulák felhasználása. Európa nem önellátó: jelenleg 124 millió EUC értékű enzimet importál. A két legnagyobb európai cég, a NOVO és a GIST-BROCADES az évtized végére sem tudja kielégíteni az igényeket, így az import jelentős növekedése várható.

A cukor árának csökkenése nem kis mértékben az egyre nagyobb mennyiségben felhasználásra kerülő fruktózból dúsított glükózszörp (izomeróz) térhódításának a következménye. Az utóbbi öt évben csak az USA-ban az évi 4.4 millió tonna évi izomeróz termelés 10 millió tonnára emelkedett (2.4 milliárd \$ piaci érték).

AMINOSAVAK ELŐÁLLÍTÁSA BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOKKAL

Géntechnológiai módszerrel

Enzimhiányos mutánsokkal

Vállalat	Gazda szerkezet	vektor	g/l	aminosav	termelő törzs	g/l	előállító
Ajinomoto	Bacillus subtilis	pUT32	8.8	HIS	Serratia marcescens	13	Kisumi 1977
	Brevibacterium lactofermentans	pAI43	18	PRO	Corynebacterium glutamicum	31	Araki 1975
	Brevibacterium lactofermentans	pAI43	17.5	THR	Serratia marcescens	14	Komatsubura 1979
Kyowa Hakko	Corynebacterium glutamicum	PCG11	15.3	HIS			
	Corynebacterium glutamicum	PCG11	21	THR			
Tanabe Seiyacu	Serratia marcescens	pKP1155	75	PRO			
Mitsubishi Petrochemical	Escherichia coli K-12	pML31	15	TRY	Arthrobacter glutamicum	12	Nakamura 1976
				LYS	Brevibacterium flavum	75	Tanaka 1971
				GIU		98	Tanaka 1971
				PHE	Bac. subtilis	6	Shiio 1973

Az enzimtermelő gének klónozása és az enzimtermelésre kismelt törzsbe építése napjainkban már nem jelent különösebb problémát. Az E.coli penicillin-aciláz aktivitását ezen az úton több mint egy nagyságrenddel sikerült növelni (MAYER H., COLLINS J., WAGNER F. Enzyme Eng. 5, 61, 1980). A borjú renin génjét élesztőbe építve megindult a renin termelés (Chem. Eng. News 1985. ápr. 22). Élesztőbe ültetett human lizozim génnel az enzim extracelluláris megjelenését tudták biztosítani. Megoldották az urokináz előállítását. Az ALLELIX Inc. (Toronto) Aspergillusban működő olyan expresszálo szekréción vektort állított elő, amellyel különféle enzimek extracelluláris felhalmozódását sikerült elérni. A GENENTECH kutatóinak sikerült egyetlen mikróbába telepíteni a C-vitamin szintézis utolsó intermedierejének, a 2-keto-glukonsavnak az előállításához szükséges enzimek génjeit, ami azt jelenti, hogy egy fermentációs és egyetlen kémiai lépésre csökkent a C-vitamin gyártásának glukózból kiinduló reakciósora. Az enzimek stabilitását és specifikus aktivitását az enzimet kódoló génen végrehajtott manipulációval kedvező irányban lehet befolyásolni. A tirozil-tRNS szintetáz aktivitását több mint egy nagyságrenddel növelte egyetlen aminosav, a Thr51 kicserélése Pro-ra az aktiv centrumban (Chem. and Ind. 14, 454, 1985).

Szabadalmi leírások alapján megállapítható, hogy az aminosavak fermentációs úton való előállításának fejlesztésében japán vállalatok széles körben alkalmaznak géntechnológiai műveleteket (lásd a táblázatot).

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a már klasszikusnak tekintett mutagén kezelésekkel összekötött szelekcióval kinyert enzimhiányos vagy enzimműködésben gátolt törzsekkel elért kiváló eredményeket a géntechnológia sem képes minden esetben egyedül tovább javítani. Egy-egy metabolit túltermelésének élettani következményeivel is számolni kell. Nem elegendő a szintézisben közvetlenül részt vevő enzimek mennyiségének a növelése, hanem biztosítani kell a kofaktor regenerálást és az esetleges építőelemek megfelelő mennyiségben való képződését is.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a fermentációs ipar minden területén jelentkeznek a géntechnológia eredményei. Az információ áradatból nem könnyű kiválasztani a valós értékeket. Ez az ipar feladata. Úgy tűnik azonban, ha a realitások talaján állva használjuk ki a géntechnológia lehetőségeit és szem előtt tartjuk az alkalmazott mikrobiológia David Perlman által megfogalmazott törvényeit - azaz a mikróbat is élni, méghozzá jól élni hagyjuk - akkor bizvást számíthatunk biotechnológiai eljárásaink gazdasági hasznára. (+)

(+) A Magyar Mikrobiológiai Társaság nagygyűlésén elhangzott plenáris előadás alapján (1986. szept. 2).

SENTIRMAI ATTILA

GUIDELINES FOR ONE YEAR FEBS FELLOWSHIPS

1. These Fellowships are intended to support one year stays of members of FEBS constituent Societies in a laboratory of another country within the FEBS area. The amount of money allocated per Fellowship will be up to 30 000 DM based on the cost of living in the receiving country plus travel expenses to and from the receiving laboratory and town of origin. A familiar help up to 3000 DM may be provided.
2. Applications to work in a laboratory in the same country in which the applicant is working or normally works are not considered.
3. Eligible candidates shall be members of a FEBS constituent Society for at least one year before the application is submitted. They shall be normally less than 35 years old at the time of application.
4. FEBS Fellowship may not be used to complement other type of support for the same visit.
5. FEBS Fellowships are not renewable.
6. A statement should be made by the applicant if another Fellowship or other type of help for the same project has been applied for.
7. Fellows are not insured by FEBS against medical expenses for themselves or their dependents; neither are they insured against accidents during their travel or stay. FEBS does not recognize recipients of its Fellowship as agents or employees of FEBS and accepts no liability with respect of any of their actions or activities or in respect of the health and safety of their persons. In their own interest recipients of the Fellowships are therefore urged to make sure that they and their families and the institutions that receive them are fully covered by the necessary insurance.
FEBS is a non-governmental organization whose awards are not automatically endowed with tax privileges. It is entire responsibility of the recipient of the award to pay any tax which may be levied upon by the corresponding authorities.
8. Applications should be written in English and shall include the following documents (original and five copies in this order):
 - A. Curriculum vitae of the applicant with a list of publications (Do not include abstracts).
 - B. Extended research plan (no more than five page) **with** TITLE, nature of the project, methodology, goals and justification as to why the particular laboratory has been chosen. A detailed summary of the project of one page shall be included.
 - C. A letter of acceptance from the legal head of the receiving Institute and signed also by the leader of the group in which the applicant will work indicating the agreement with the proposed subject of research.
 - D. A letter supporting the application from an experienced scientist who knows the work of the applicant.
 - E. A letter from the corresponding FEBS constituent Society stating that the applicant is a member of it and date of admission in the Society,
9. Fellowships will be awarded during the annual FEBS Meeting. Applications shall be received by the Chairman of the Fellowship Committee at least three months before the starting date of the Meeting (this year not later than mid April).
10. The Fellowship should start within six months of the award. A longer delay would need the permission of the Chairman of the Fellowship Committee.
11. The applicant must send to the Chairman of the Fellowship

Committee a report about the work performed within three months of the end of the Fellowship. Every publication of work executed during the time of the fellowship must acknowledge the help of FEBS and two reprints shall be sent to the chairman of the Fellowship Committee.

12. No grant for research or bench fee will be given to the Institutes accepting to take a FEBS Fellow.

13. Applications should be sent to the Chairman of the Fellowship Committee : Dr.C.Gancedo - Instituto de Enzimologia CSIC, Facultad de Medicina UAM, Arzobispo Mrcillo, 4.- 28029 MADRID - SPAIN.



4th European Congress on Biotechnology 1987

Amsterdam, June 14-19, 1987



Organized by the
Netherlands Biotechnological Society
on behalf of the
European Federation of Biotechnology

NEWS ABOUT THE CONGRESS AND THE EXHIBITION

- Over 850 Poster Abstracts were received
- A new Workshop on Microbiological Physiology has been added.
- AMSTERDAM BIOTECHNOLOGY 1987 exhibition registered over 60 exhibitors
- The Panel for the forum discussion on "The Biotechnology Race" has been extended by one biotechnologist from Japan and one from the USA
- The first guests and hosts for the DUTCH WEEKEND are listed.



FEBS Advanced Courses 1987

The Chairman of the Advanced Courses Committee is: Professor Giorgio Bernardi, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut Jacques-Monod, Université de Paris VII, Tour 43, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France

Biochemistry and genetics of yeasts: Jerez de la Frontera, Spain, 7-20 September 1987

Info: C. Gancedo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain

Targets for the design of antiviral agents: Les Arcs, France, dates not communicated

Info: R. T. Walker, Department of Chemistry, University of Birmingham, P.O. Box 363, Birmingham, England B15 2TT

Dynamics of membrane proteins and cellular energetics: Grenoble, France: 13-26 September 1987

Info: P. V. Vignais, Laboratoire de Biochimie, Département de Recherche Fondamentale du CEN-G, Boîte postale 85X, F-38041 Grenoble Cedex, France

Organelles of eucaryotic cells: molecular structure and interactions: Bari, Italy: 8-20 June 1987

Info: S. Papa, Istituto di Biochimica Medica e Chimica, Università degli Studi di Bari, Policlinico, Piazza G. Cesare, I-70124, Bari, Italy

Practical and theoretical aspects of modern analytical methods for identifying modified nucleosides:

Umeå, Sweden: 9-12 July 1987

Info: G. R. Björk, Mikrobiologiska Institutionen, Umeå Universitet, S-901 87 Umeå, Sweden

Crystal growth of biological macromolecules: Obernai, France: 19-25 July 1987

Info: R. Giegé, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 Rue René-Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France

Cell proliferation: Sesimbra, Portugal: 31 May-11 June 1987

Info: J. E. Celis, Kemisk Institut, Århus Universitet, Langelandsgade 140, DK-8000 Århus C, Denmark

Illegitimate recombinations: Port-Cros, France: 1-4 May 1987

Info: S. D. Ehrlich, Institut Jacques-Monod, Université de Paris VII, Tour 43, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France

The Youth Travel Fund of the Federation may help you attend the FEBS Advanced Courses. Please apply to the local organizers.

B(é)kadémiái Szemle

A BIOKÉMIA szatirikus melléklete

Írta : SARKADI BALÁZS

Mottó : Tudósok nélkül a nemzet
féleszű óriás
(Kossuth és Mezei A. után szabadon)

Hírek, tudósítások

Zseniális újítások a tudományos minősítés terén

(Tudósítónk jelentése)

A tudományos minősítési eljárásoknál bevezették, hogy az értekezések nyilvános vitáját követően a bizottság titkos szavazásán a hivatalos bírálók (opponensek) nem szavaznak. Az a két - vagy három ember tehát, aki az értekezés egyedüli alapos olvasója, kimarad a munka titkos szavazású értékeléséből. Szavazhatnak viszont a bizottsági tagok, akik az értekezést gyakran még látásból sem ismerik (a TMB körpostája alig-alig funkcionál), esetleg akiket éppen akkor rángattak elő a mit sem sejtő közönség soraiból. A jelszó : „szerelem vagy gyűlölet az első látásra”.

Minisztériumi közlemény

Az Ember- és Állatügyi Minisztérium bejelenti, hogy a jövőben valutakerete terhére önköltséges tudományos célú utazásokat nem tud támogatni. Lehetőséget biztosít azonban az elindulásnál szükséges menettérti villamosjegy kedvezményes megváltására. Az ilyen irányú kérelmeket a tárgyévvel megelőző év július 1.-ig kell benyújtani, kitöltve a 1126/383.sz. négyrészes űrlapot, mellékelve 6 pld. önéletrajzot, 6 pld. tudományos közlemények jegyzékét, erkölcsi bizonyítványt, újraoltási lapot, meghívólevelet hivatalos magyar fordítással, a valutaszámláról hozott igazolást és a munkahely támogató nyilatkozatát. A kérelmeket a MITESZ, ill. a MÉRTESZ illetékes bizottságai rangsorolják, majd a Minisztérium a kérelmezőt a döntésről legkésőbb az utazás előtti félóránban értesíti.

PÁLYÁZATI FELHÍVÁS

A B(é)KADÉMIA pályázatot hirdet kutatási támogatás elnyerésére (Országos Központi Kutatási Laboratoriumi Támogatás - OKKULT). Vezetőségünk felhívása alapján mecénásaink belátták, hogy gazdasági fejlődésünk alapvető záloga a tudományos kutatás támogatása. Ezért - a gazdasági nehézségek ellenére, sőt éppen azok miatt - a következő öt évben 160 milliárd dollárnyi összeget kívánnak az arra érdemesnek bizonyuló kutatás támogatására költeni.

Az OKKULT pályázaton részt vehetnek bármely hazai kutató, oktató vagy ellátó intézmény dolgozói. A támogatás elnyerésének alapfeltétele a mellékelt AB/1638428.sz. űrlap 240 oldalának pontos kitöltése, továbbá az elkövetkező négyszer öt évre a kutatási és gazdasági terv kidolgozása.

- Megjegyzés : külön betét oldalakon kérjük mellékelni az elvégzendő kutatási munka pontos leírását, lebontva az elvégzendő feladatokat és megadva azok időbeosztását (pl.1990 november 5-én d.u.2 órakor centrifugálás 2000 rpm-el /850xg/, majd 20 perc múlva homogenizálás teflon-üveg eszközzel, stb.stb...) A gazda-

sági tervben a 27/1868.sz.melléklet pontos kitöltésével kérjük a költségek szakszerű lebontását és göngyölését. A közvetett-közvetlen és a közvetlen-közvetett költségráták valutahányadának megadása, a rotációpragmatikus eszközjáruléki levonások táblázása az 1983/4562/b rendeleti függelék alapján végzendő. Munkabér tervezése esetén a kiválasztott személyek önéletrajzát, személyi adatait, oltási bizonyítványát, katonakönyvét és házassági anyakönyvi kivonatát is kérjük mellékelni.

A felelősségteljes szakmai elbírálás és a nagyösszegű pályadíjak odaítélésének alapfeltétele a jól kidolgozott pályázat !

B(é)kadémia, 1989. január 1.

2.sz.k ö r l e v é l az OKKULT pályázatról.

Értesítjük az OKKULT pályázaton résztvevő kedves kollégákat, hogy a beérkezett pályamunkák nagy száma miatt az értékelés még folyamatban van. A végső eredmény 1992.második negyedévére várható, akkor azonban visszamenőleg is biztosítani fogjuk a megfelelőnek ítélt pályázatok támogatását. Előre nem látható gazdasági nehézségek miatt a pályázaton kiosztható összeg némileg csökkent, kb, 168 millió dollárra, amelynek 13.8 %-a forintban fizethető ki. A komputeres kiértékelés és a nagyszámú szakmai bíráló tiszteletdíja kissé ugyancsak mérsékelni fogja a kiosztható összeget.

B(é)kadémia, 1991. január 1.

3.sz.k ö r l e v é l az OKKULT pályázatról.

Drága Barátaink, Kedves Kollégák !

Nagy boldogság számunkra, hogy érthesíthetjük Önöket : az OKKULT pályázati díjak elosztása végső fázisához érkezett. Némi gondot okozott, hogy sem a komputeres, sem a szakmai értékelés nem volt megfelelően figyelembe vehető, mert ezek rendkívül kedvezőtlenül hatottak volna tudománypolitikai elveink megvalósulására. Ezért végül is a súlyozottan randomizált variációs elosztás elvét alkalmaztuk és az összegeket nem az eredeti hibás szemlélet szerint - a pályázó személyeknek, hanem a kutató intézményeknek ítéltük oda. Kedvezőtlen hír, hogy a támogatás összege időközben kissé csökkent és a kiosztható mintegy 160 forintnak is csak 13.8 %-a fordítható dollárigényű, 150 000 Ft fölötti beruházási beszerzésre. Munkabér fedezésére az összeg 1.86 %-a fordítható.

Felhívjuk a támogatásban részesülő intézményeket, hogy az első két évről szóló részletes jelentés éppen két hét múlva esedékes. A kutatási szerződések megkötése után az első támogatási részletek is hamarosan kifizetésre kerülnek.

Baráti üdvözlettel : a B(é)kadémia, 1992.november 20.

Hirdetés

MAGÁNRENDELŐMET MEGNYITOTTAM.

KÉMBIOMAGNET ÉS ILLUMFÉNY TERÁPIA ACUTA
MAGNA - kedvezményes áron.

Talán még van esélye, ha orvosáról már lemondott.

HÍVJON ! J Ö V Ö K ! (TEL: 426-303)

SZERKESZTŐSÉGI KÖZLEMÉNY

Megrökönyödéssel észleltük, hogy az ACTA BIOCHIM. BIOPHYS. ACADEMIAE SCI. HUNG. megváltozott címmel, formával és szerkesztőségi politikával kíván működni a jövőben.

Nagy vesztesége ez a magyar kutatásnak, hiszen eddig az Acta-ban való közlés felülmulhatatlan előnyökkel járt: az 1984-ben közlésre benyújtott cikkek esetleg még az 1982-83-as évfolyam számaiban is helyet kaphattak. Mivel pedig a folyóirat csak 1985-ben vagy éppen 1986-ban jelent meg, a prioritás biztosításán túl az eredmények ellophatatlanságát is garantálták!

Fájó szívvel búcsúzunk tőled, hagyományos Actánk!

Párhuzamos híradások

1. A magyar kutatók régi álma teljesülhet, ha sikerül majd feloldani azt a szisztémát (?), hogy kutatóintézetben vegyszert, izotópot vagy műszer-alkatrészt évente csak egyszer, összesítve lehet megrendelni, majd az igényelt anyag megérkezése egy-másfél évig is eltart. Törvény, rendelet vagy szabályzat nem írja elő ezt a „rendszer” s azt is mindenki jól tudja, hogy a későn megérkező anyagok gyakran már feleslegesek, elavultak, elévültek a kutató számára. A rettenetes pazarlást, késedelmet okozó beszerzési-megrendelési rendszer okai ismeretlenek a kutatók számára. A reményük azonban még él, hogy egyszer ez is megváltozik majd.

2. A világ számos más országában is erősen tartja magát a hivatali bürokrácia. Egy meg nem nevezett ország X városának egyetemén a beszerzési hivatalban táblát akasztottak ki s ezen közölték, hogy minden nap legkésőbb tíz óráig kerik leadni a még aznap továbbítandó megrendeléseket. Nem csoda, hogy több kutató hivatalosan is tiltakozott az új rendszer ellen: „Könnyen belátható, hogy d.e. 10 óráig nem tudhatjuk, mire lesz szükségünk másnap, hiszen a kísérleti eredmények többnyire csak délután értékelhetők. Ha szállító cég másnapi szállításra többnyire még délután is elfogad megrendelést, akkor ezt a bürokráciát nem akadályozhatják meg.” (A vita eredményéről lapzártáig nem kaptunk értesítést.)

THE AMATEUR SCIENTIST (Amatőr kutatók rovata)

TRIS bázis átkristályosítása.

Egy hosszabb külföldi tanulmányútról hazaérkezett kollégánk heveny memóriazavarában egy originál csomagolású, a.l.t. (analitikailag legtisztább) felíratú hazai gyártmányú TRIS-ből készített puffer oldatot biokémiai munkájához. A sárga színű, enyhén opálos és a várhatónál tízszer magasabb optikai elnyelést mutató oldat - nagy meglepetésére - a vizsgált enzimreakció tökéletes gátlószerének bizonyult. Alkoholban történt átkristályosítása után azonban a TRIS már csak közönséges pufferként viselkedett. Kollégánk jelenleg a kiválóan hatékony szennyezés elemzésével foglalkozik. Mivel ez -sajnálatosan- sarzsonként változó, kéri amatőr kutatótársait, akik szintén hazai gyártmányú TRIS-t használnak, gondosan őrizzék meg számára a speciális készítményeket.

HIREK ÉS ESEMÉNYEK

3rd INTERNATIONAL WORKSHOP ON GLUTEN PROTEINS _ Budapest, 1987.V.6-9.

A munkaértekezletet a Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszéke szervezi. Védnökei : a Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület, a Magyar Biokémiai Egyesület, a MTA Élelmiszerfehérje Munkabizottsága és a Gabona Tröszt. A tudományos program fő témái :

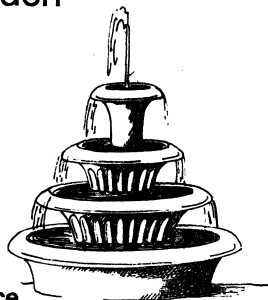
- Sikérfehérjék molekuláris biológiája.
- Búza tartalékfehérjék mint genetikai markerek.
- A fehérjeszerkezet és a funkcionális sajátosságok közötti összefüggések.
- Nem-fehérje komponensek jelenléte és funkciója a siker-
struktúrában.

A munkaértekezleten előadások tartására és poszterek bemutatására van lehetőség. - Részvételi díj : 2000 Ft. Érdeklődni és jelentkezni a következő címen lehet : dr. Békés Ferenc egy.docens BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék Budapest XI. Műegyetem rkp.3 II.em.11 Telefon : 664-011/1419 má.

2nd International Symposium on Preparative and Up Scale Liquid Chromatography

Febr. 1-3, 1988
Baden-Baden

(Fed. Rep. of
Germany)



Correspondence

concerning scientific programme

Prof. Dr. K. Unger, Universität Mainz,
Joachim-Becher-Weg 24
D-6500 Mainz, Phone: 0 61 31 / 39 57 45

concerning organization, exhibition etc.

Gesellschaft Deutscher Chemiker
Abt. Tagungen
Postfach 90 04 40
D-6000 Frankfurt/Main 90 (FRG)
Phone: (0 69) 79 17 - 360/366

17th International Symposium on Chromatography

September 18-23, 1988
Wien
(Austria)



Correspondence

Concerning scientific programme:

Priv.-Doz. Dr. Gerhard Schomburg
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Postfach 10 13 53
D-4330 Mülheim/Ruhr (FRG)
Phone: (02 08) 30 64 30

Concerning organization, exhibition etc.:

Gesellschaft Deutscher Chemiker
Abt. Tagungen
Postfach 90 04 40
D-6000 Frankfurt/Main 90 (FRG)
Phone: (0 69) 79 17 - 360/366

THIRD INTERNATIONAL SUMMER SCHOOL ON BIOPHYSICS SUPRAMOLECULAR STRUCTURE AND FUNCTION

Correspondence

All correspondence should be addressed to:
Dr. Greta Pifat, Ruđer Bošković Institute
41001 Zagreb, Yugoslavia