

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület
tájékoztatója

Quarterly Review of the
Hungarian Biochemical Society

Szerkesztő bizottság : Alkonyi István, Bagdy Dániel, Bánfalvi
Gáspár, Elődi Pál, Falus András, Fésüs
László, Gergely Pál, Huszti Zsuzsa,
Nyeste László és Sarkadi Balázs

Felelős szerkesztő : Bagdy Dániel
Technikai szerkesztő : Bölöni Erzsébet

A tartalomból : Bioinformatika, a molekuláris biológia adatbázisai
Protein-tirozin foszfatázok
Complement research : biosynthesis, genetics,
immunoregulatory role and clinical studies
A HIV proteínázok specifitása
Tudósportré - Oroszlán István
Beszámoló budapesti nemzetközi konferenciáról
In memoriam dr.Székessy Vilmosné, dr.Hermann Vilma
FEBS - hírek és FEBS - mozaik, Dublin '92

Contents

Bioinformatics : Data Bases of Molecular Biology
Protein-tyrosine phosphatases
Complement research (8th Int.Congr.of Immunology,Budapest)
Specificity of HIV proteinases
Portrait of a scientist
Prediction and recognition of antigen determinants
A Satellite Meeting of the 8th Int.Congr.of Immunology,Budapest
Obituary
FEBS news, Report on Dublin-Meeting '92

E számunk szerzői :

Dombrádi Viktor Debreceni Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytani Intézete
Erdei Anna Eötvös Lóránd Tudományegyetem Immunológiai Intézete
Falus András ORFI Molekuláris Biológiai Osztálya
Fésüs László Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézete
Friedrich Péter MTA Enzimológiai Intézete
Füst György OHVI Immunpatológiai osztálya
Hudecz Ferenc Eötvös Lóránd Tudományegyetem - MTA Peptidkémiai Kut.Csop.
Katona György Semmelweis OTE II.Kémiai-Biokémiai Intézet
Oroszlán István NCI-Frederick Research and Development Center, USA
Pongor Sándor MBK Biokémiai és Fehérjekutató Intézet,Gödöllő
Tózsér József Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézete
Tyihák Ernő MTA Növényvédelmi Kutatóintézet

Bioinformatika: A molekuláris biológia adatbázisai

Pongor Sándor

MBK Biokémiai és Fehérjekutató Intézet, 2100 Gödöllő pf 170 és ICGEB, 34012 Trieste, Italy

Bevezetés

A molekuláris biológia talán az első az élettani tudományok közül, amely nem is tudna létezni számítógép nélkül. A makromolekulák ugyanis már egyenként is akkora adattömeget képviselnek, hogy szerkezetük ábrázolása papíron-ceruzával már nem oldható meg. Különösen azóta vált égetővé ez a probléma, hogy megkezdődtek a teljes genomok szekvenálását célzó prozsektek, melyek - ígéreteik szerint - 4-5 év alatt mintegy 10-szeresére fogják felduzzasztani a már jelenleg is nehezen fenntartható adatbankokat. Újszerű feladatot jelent a fehérjék szerkezetének számítógépes tervezése is, különösen a ligand-fehérje illetve a fehérje-fehérje kölcsönhatások modellezése, melyet ma már minden hatóanyag tervezésénél igénybevesznek. Mindezekhez nagy mennyiségű és nagyon sokféle információ egyidejű mozgatására van szükség, s ezeket legegyszerűbben a százegynéhány számítógépes adatbázis valamelyikéből szerezhetjük meg.

1. ábra

Számítógépes adatbázisok¹

	db	Cég	Millió rekord
1975	301		52
1979	528	316	148
1989	5578	1950	2700
1990	6750	2240	3600
1991	7637		

¹ On-line ill. más hordozókon hozzáférhető, nemcsak molekuláris biológiai adatbázisok.

Ez a látványos fejlődés a számítástechnika elterjedésének köszönhető. Elsősorban annak, hogy a 80-as évek második felére már általánossá váltak az olcsó személyi számítógépeknek, másodsorban pedig a számítógépes hálózatoknak (1), amelyek ma már a világ legtöbb országában elérhetők, közvetlen kapcsolatot létesítve felhasználók és adatbankok között. Egy korszerű kutatói munkahely személyi számítógépei lokális

hálózaton kapcsolódnak az intézmény központi egységéhez, amely egyúttal be van kötve a nemzetközi hálózatokba, és így közvetlen kapcsolat lehetséges pl. tengerentúli adatbankokkal is. A rendszer - optimális esetben - teljesen "transzparens", azaz a felhasználónak nem kell törődni a kommunikációs problémákkal: elvben ugyanúgy tudja kezelni a távoli számítógépeket, mintha saját intézményének központi egységén

2. ábra

Az on-line adatbázisok forgalma

	Bevétel (millió USD)	Keresések (millió db)
1978	40	2,7
1988	475	29,3
1989	571	31,3

dolgozna. Az egyik legegyszerűbb szolgáltatás az elektronikus posta, mellyel (néhány perces vagy óras átfutással) üzenetet válthatunk a hálózat bármely felhasználójával. Felfejlődtek a nyilvánosan lekérdezhető adatbankok is, ezek előállításával már több ezer cég foglalkozik (1. ábra). Az adatbankok vagy közvetlenül (on-line) férhetők hozzá, vagy pedig CD lemezen (régebben mágnesszalagon) rendelhetők meg. Az on-line adatbázisok forgalma és volumene igen gyorsan nő (2. ábra); ezek többsége irodalmi, ipari vagy közgazdasági adatokat tartalmaz, a kísérleti adatokat tároló tudományos adatbázisok, viszonylag kisebb hányadot képviselnek. (2).

Az első mai értelemben vett biológiai adatbázist Margaret Dayhoff és munkatársai hozták létre az irodalomból gyűjtött fehérjeszekvenciák rendszerezésével (3). A példaértékű vállalkozás azonban hamar kinőtte a nyomtatás lehetőségeit, át kellett térni a számítógépes tárolásra. Egyidejűleg megjelentek a DNS-szekvenálás technikai, és a DNS-szekvenciák gyűjtésénél nemcsak hogy gyorsabban növekedett, mint a Dayhoff féle, hanem egyúttal több fehérje-szekvenciát is adott

mint az addig egyeduralgoló Edman-féle fehérje-szekvenálás. Mára a molekuláris biológus több mint száz igen eltérő méretű adatbázisban válogathat, melyek teljes listáját egy külön adatbázis, a LiMB (4) foglalja össze.

A molekuláris biológia adatbankjainak fejlesztésével, fenntartásával és analizálásával új altudomány, a *bioinformatika* foglalkozik, melynek ma már nemzetközi folyóiratai és kongresszusai vannak (5) évente több monográfiája jelenik meg, sőt önálló kutatóintézetek is létesültek (6). Walter Gilbert szavaival élve a biológia egészében lépésváltást jelent az adatok sokszorozódása, olyannyira, hogy a főhangsúly mára az adat meghatározásáról az interpretálásra tevődött át (7).

Az adatbázisok tartalma

A molekuláris biológia legfontosabb adatbázisainak listáját a Függelékben soroltuk fel. Osztályozásukat talán úgy a legegyszerűbb elkezdeni, hogy eldöntjük, nyers, ellenőrzött, avagy egyúttal interpretált adatokról van-e szó. Ugyancsak szempont lehet, hogy eredeti adatokról van-e szó (melyet a készítőik vittek gépre) avagy származtatott adatokról, melyet az eredetiekből állítanak elő. A biológiai okoskodás szerint viszont a DNS-szekvencia az "eredeti" adat, ebből származtatjuk az RNS-t és a fehérjéket. Persze minden elméleti osztályozást felborít, ha elkezdjük számításba venni a kisebb járulékos adatbázisokat is.

Tekintsük át a legnagyobb adattömeget képviselő csoportot, a szekvencia-adatbázisokat. A szekvenciák primér csoportját a DNS-szekvenciák alkotják. Ezek gyűjtése már ma is csak nemzetközi kooperációban lehetséges. A három legnagyobb adatközpontot az Egyesült Államok (GenBank, NIH National Center for Biotechnology Information), az EMBO (EMBL Data Library) és Japán (DDBJ) tartja fent. Ezeket naponta egészítik ki új szekvenciákkal (daily updates), és a három központ naponta ki is cseréli az új adatokat. A DNS adatbázis egy egyszerű rekordja - egy szekvencia - minimális információként tartalmaz egy név-azonosítót (*Locus name*), egy rekordszámot (*Accession number*), a bevitel dátumát, a szekvencia nevét, a gazdaszervezet rendszertani nevét és filogenetikai helyét, az irodalmi hivatkozást, és végül magát a szekvenciát. Fontos információ az ún. *Feature-table*, amely a szekvencia egyes szakaszait sorolja fel tételesen, megnevezve azok szerepét (pl. kódoló régió, promóter, exon, intron stb.). Végül említjük a *keresztreferenciákat*, melyek megadják, hogy az illető szekvencia más DNS- és fehérje-adatbankokban milyen szám alatt található. Ez máris sejtet néhány problémát. Például ugyanazt a szekvenciát több darabban és több szerző is leközlheti. Vagy: egy DNS szekvencia, pl. a Herpes Simplex genom több mint ötven

fehérjekódoló régiót tartalmaz, ezek némelyike átfedő stb. A keresztreferenciák tehát bonyolult viszonyokat is tükrözhetnek.

3. ábra

A Swiss-Prot adatbázis egy rekordja

```

ID BX4_BOMMO STANDARD; PRT; 48 AA.
AC P21808;
DT 01-MAY-1991 (REL. 18, CREATED)
DT 01-AUG-1991 (REL. 19, SEQ. UPDATE)
DT 01-AUG-1992 (REL. 23, ANNOT. UPDATE)
DE BOMBYXIN IV (4K-PROTHORACICOTROPIC
HORMONE) (4K-PTTH-IV).
OS BOMBYX MORI (SILK MOTH).
OC EUKARYOTA; METAZOA; ARTHROPODA;
INSECTA; LEPIDOPTERA.
RN [1]
RP SEQUENCE.
RA MARUYAMA K., HIETTER H., NAGASAWA H.,
ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A.,
RA ISHIZAKI H.;
RL AGRIC. BIOL. CHEM. 52:3035 (1988).
CC !- FUNCTION: PTH IS A BRAIN PEPTIDE
RESPONSIBLE FOR ACTIVATION OF
CC PROTHORACIC GLANDS TO PRODUCE
ECDYSONE IN INSECTS.
CC !- SILK WORM HAS TWO KINDS OF PTH:
4K-PTTH AND 22K-PTTH; THERE ARE
CC FOUR FORMS OF 4K-PTTH.
CC !- SUBUNIT: DIMER OF A BETA AND AN
ALPHA CHAINS LINKED BY DISULFIDE
CC BONDS.
CC !- SIMILARITY: TO BOMBYXIN-II (62%),
AND TO INSULIN AND RELAXIN.
DR PIR; JT0410; JT0410.
DR PIR; JT0412; JT0412.
DR PROSITE; PS00262; INSULIN.
KW HORMONE; INSULIN FAMILY.
FT MOD_RES 1 1 PYR. CARB.
FT CHAIN 1 28 B CHAIN.
FT NON_CONS 28 29
FT CHAIN 29 48 A CHAIN.
SQ SEQUENCE 48 AA; 5282 MW; 12079 CN;
zeanvahhyc grhlantlad lcwdsvegv ...stb.

```

A második lépés a fehérje-adatbázis előállítás. A "klasszikus" módszer az irodalmi adatok gépbe-másolása, így azonban már csak alig tudnánk lépést tartani az új adatokkal. (igy készül a japán SEQDB és - részben - az amerikai PIR). Más lehetőség az automatikus fordítás, melynek során a DNS adatbázisból egyszerű szabályok alapján fehérje-adatbázist generálunk (ilyen pl. EMBOPRO vagy a német MIPS). A "gépi" gyűjteményekben viszont óriási a redundancia, mivel pl. a párhuzamosan készült DNS részletek is önálló fehérjeként fordítódnak le. Sok hipotetikus fehérjét is tartalmaznak, melyek jórésze valószínű

leg nem is létezik. A legbiztosabbnak a "hibrid megközelítés" látszik, mikor a klasszikus adatbankot az automatikus fordítás "kiszemezgetésével" próbálják kiegészíteni (Swiss-Prot). A legelfogadottabb fehérjeszekvencia adatbank a PIR, mely nemzetközi összefogás eredménye (USA-Japán-Németország). A legrendszeresebb adatbank viszont kétségtelenül az EMBL-által is támogatott Swiss-Prot. Ebben a legkönnyebb a visszakeresés, mivel a fehérjék, domének neve és a kulcsszavak szigorúan egységesítve vannak. A fehérje-adatbázisok rekord-szerkezete nagyon hasonló DNS adatbázisokéhoz, azzal a természetstrú különbséggel, hogy itt a Feature-table-t a fehérje doménjei, funkcionális helyei, a posztranszlációs módosítások helyei stb. alkotják (3. ábra).

Érdekes megállnunk egy látszatra triviális problémánál, nevezetesen annál, hogy végül is minek a szekvenciája kerüljön az adatbankba. Például a humán hemoglobin valószínűleg több mint száz cikkben szerepel, nagyrészt azonos szekvenciával. Ha ezeket egyetlen rekordba próbáljuk összeszerkeszteni, el kell döntenünk, hogy a különbségek valós genetikai mutációkat vagy csak szekvenálási hibát takarnak-e. Ettől függően pl. a *VARIANT* vagy a *CONFLICT* címszó alatt jegyezhetjük a változást. A rekord keresztreferenciáinak ilyenkor tartalmaznia kell az összes variánst, amelyet más adatbázisok tartalmaznak. A kóros hemoglobin-variánsokat az OMIM adatbázis (az egyik keresztreferencia) például jól taglalja, és - szerencsére - egyetlen címszó alatt. A fehérje-rekord szekvencia-részébe így végül a legáltalánosabb hemoglobin variáns szekvenciája kerülhet, míg a többire csak az annotációs részben van utalás. Azért érdemes ezt megjegyeznünk, mert szekvencia-összehasonlításnál csakis ezt az egyetlen szekvenciát vizsgálják majd a programok. A fenti példa világosan mutatja, hogy a rekord-szerkesztés nemcsak emberi intelligenciát, hanem a szakterület alapos ismeretét is igényli. Teljes gépesítése tehát nem-igen várható.

A primér szekvencia adatbankok mellett egyre növekszik a származtatott adtbankok száma. A legegyszerűbb csoport a gazdaszervezet szerinti csoport-képzés, amely egy-egy szakterület művelői számára külön listázza egy-egy faj génjeit vagy fehérjéit. A legtipikusabb az HIV adatbázis, amely az igen gyorsan szaporodó AIDS- és rokon-vírus szekvenciákat gyűjti, fehérje és DNS-szinten elkülönítve (8). Sokan használják Elvin Kabatnak az immunrendszer fehérjeszekvenciáit részletező adatbázisa is (9), mely sokkal több variánst tárol, mint a "nagy" adatbázisok. Ráadásul itt az egyes variánsok külön-külön szerepelnek, ami a lokális homológiák keresésnél nagy előnyt jelent.

A származtatott adatbázisok másik csoportja un. *konszenzus-szerkezeteket*, szerkezeti motívumokat tárol. Ezek a szekvencia-mintázatok

(patterns, signatures) egy-egy nagyobb homológia csoport jellemzői, és segítségükkel sok esetben egyszerűen eldönthető egy-egy szekvencia hovatarozása. A legismertebb a PROSITE katalógus, mely mintegy 800 statisztikailag is letesztelt fehérje-motívumot tartalmaz (4. ábra), lényegretörő irodalmi összefoglalóval együtt (10). Egyetlen hátránya, hogy a motívumok leírására egyszerű formát, un. *reguláris kiejezéseket* használ, a fehérje-domének nagy része viszont nem írható le ilyen egyszerűen. A bonyolultabb típusú domének vizsgálatát segíti az SBASE doménkönyvtár, melyet a trieszti ICGEB és a gödöllői MBK közösen tart fent, és amely több mint 27,000 ismert funkciójú ill. szerkezetű szekvenciariészletet tartalmaz (5. ábra). Ez a gyűjtemény (amely szabadon hozzáférhető, és hagyományos homológiakereső programokkal kezelhető) kifejezetten a távoli homológiák vizsgálatát hivatott elősegíteni (11), és a legtöbb domén-típusból sokkal több példányt tartalmaz, mint ahányat PROSITE-tal azonosítani lehet (5. ábra).

4. ábra

A PROSITE katalógus motívum-csoportjai

1. Posztranszl. módosítások
2. Domének
3. DNS és RNS-kötő fehérjék
4. Enzimek
 - 4.1 Oxidoreduktázok
 - 4.2 Transferázok
 - 4.3 Hidrolázok
 - 4.4 Liázok
 - 4.5 Izomerázok
 - 4.6 Ligázok
 - 4.7 Egyéb enzimek
5. Elektron transzport feh.
6. Egyéb transzport fehérjék
7. Szerkezeti fehérjék
8. Receptorok
9. Cytokininek
10. Hormonok és peptidek
11. Toxinok
12. Inhibitorok
13. Egyéb homológia-csoportok

Adatbázisok fenntartása

Az adatok egy részét ma is a szerkesztők viszik kézzel számító gépre, nagyobb részüket (főleg a DNS-szekvenciákat) azonban már eleve floppy-lemezen, vagy közvetlen elektronikus posta útján nyújtják be. Ezt azáltal lehetett elérni, hogy a "nagy" adatbankok közös adatszabványt alkalmaznak, és hogy a benyújtásra egy programot, az AUTHORIN-t fogadták el. Persze arra is

szükség volt, hogy a "jobb" folyóiratok csak az adatbanki benyújtást igazoló referenciaszám

5. ábra

Az SBASE doménkönyvtár néhány jellemző doméntípusa (11)

<u>Struktúrális domének</u>	db	PROSITE
		-ban
EGF-típusú	224	138
Ig-típusú	315	7
Fibronectin III	162	ns
Glicin-gazdag	91	ns
Proline-gazdag	84	ns
Egyéb "repeat"-ek	3602	nd
<u>Homológia-domének</u>	2039	nd
<u>Ligand-kötő domének</u>	3274	1169
DNA-kötő	1764	1127
Zn-finger	1113	859
Kalcium-kötő	642	85
Lektin-típusú	24	7
RNA-kötő	104	69
<u>Topológia-domének</u>		
Szignál peptidok	3441	ns
Tranzit-peptidok	445	ns
Nukleáris lokalizáció	66	ns
Extracelluláris	1458	ns
Transzmembrán	5197	ns
Cytoplazmikus	1293	ns
<u>Összesen</u>	<u>27211</u>	<u>nd</u>

ns = nem szerepel a PROSITE-ban
nd = nincs adat

megadása esetén fogadnak el szekvenciát közlésre. nagy előrelépést jelent az is, hogy a nagyobb szekvenálási prodszektekben (ld. genom-szekvenálások) már rutinszerűen alkalmazzák az automatikus szekvenátorokat, amelyek a szekvenciárészleteket mikroszámítógépes egyszerű programokkal állítják össze nagyobb szekvenciákká, melyek már benyújtásra készek. Az adatbázisfenntartók ilyenkor az adatok koherenciáját ellenőrzik csak (mind gyakrabban egyszerű szabályokra épülő mesterséges intelligencia programokat használnak) és ezzel el is készült a "nyers" szekvencia-rekord, amelyben a szekvencia, a gén- és organizmus-név valamint az irodalmi hivatkozásokon kívül gyakran nincs is más adat. A következő lépés a szöveges rész, a annotációk kiegészítése a gén funkciójával, a feature-táblázat kitöltése stb. Ezek közül pl. a

keresztreferenciák meghatározása automatizálható, a többi lépés - hasonlóan a fenti hemoglobin-példánál leírtakhoz - viszont már gyakran bonyolult tudományos döntéseket igényel. Az adatbázisok annotált része ezért gyakran le van maradva a "nyers" adatok mögött.

A "nagy" adatbázisokat évente 4-6 alkalommal bocsátják ki (ezek a számmal ellátott "release"-ek). Az időközben elkészített szekvenciákat a nap végeztével leteszik a központi számítógépbe, ahol "hozzácsapják" egy kumulatív kiegészítő file-hoz. Mindezek az adatok ASCII (sík-file) formában vannak, hasonlóan az 3. ábrán bemutatottakhoz. Ezek másolhatók, szétküldhetők, de analízisre még nem alkalmasak. A közvetlen felhasználás (analízis) előtt az adatokat átfomatálják, melynek célja az, hogy a későbbi beolvasást megkönnyítsék. Az ilyen "kerestethető" adatbázis-formák előállítására kész programok vannak. A teljesség kedvéért megemlítjük, hogy egy egyedi szekvencia kinyomtatásánál ismét adott formátumokat használunk (PI PC-Gene, IG, GCG, stb.), tehát ugyanazon adatnak legalább három formátuma van. Az eredeti ASCII formátum a

6. ábra

Az "EMBL File Server"

Databases¹:

ALU (Alu sequence dbase)
HAEMB (Haemophilia B dbase)
3D_ALI (3D alignments)
CPGISLE (CpG islands dbase)

Software:

DOS_SOFTWARE
MAC_SOFTWARE
UNIX_SOFTWARE
VAX_SOFTWARE
MISC_SOFTWARE

Miscellaneous:

Technical documents DOC
Mult. DNA alignments ALIGN
Codon Usage CODONUSAGE

¹ A függelékben "1" jelzi az EMBL-en megtalálható többi adatbázist. Mindezek az adatbázisok szabadon másolhatók, de nem lehet on line keresni bennük.

forrást jelentő központi gépen van meg, a felhasználók pl. az adatbank GCG formátumát használják (12, ill. ld alább), míg az egyedi szekvenciák mikroszámítógépes manipulációjához

pl. a PC-Gene formátumot használják. E formák egymásba alakítására flexibilis kész programok állnak rendelkezésre.

7. ábra

ICGEBnet system overview

1. Quick System Overview/
2. General Services/
3. Sequence Analysis Tools/
4. Databanks/
5. Free PC Softwares /
6. ICGEBnet User Manual/
7. ICGEB General Info/
8. System Additions/
9. World-wide Info-servers/
10. Phone Books/
11. About this Info-server.

Hogyan jutunk hozzá az adatokhoz

A legtipikusabb esetben a felhasználó egy újonnan meghatározott szekvenciáról szeretné eldönteni, hogy van-e hozzá hasonló az adatbázisban. A másik - egyszerűbb - feladat, ha az adatbázisból néhány szekvenciát kívánunk előkeresni kulcsszavak, mondjuk a szerző neve alapján. Mindkét feladathoz célprogramokra és az adatbankok "keresthető" formátumára van szükség. A legelterjedtebb programcsomagot a *Wisconsin Genetics Computer Group* forgalmazza (12), és ez tartalmazza mind a formattáláshoz, mind a kereséshöz szükséges eszközöket. Az előfizető a programokkal együtt megrendelheti a

8. ábra

ICGEBnet General Services

1. File Transfer/
2. Electronic Mail/
3. Bulletin Board/
4. Text Processing/
5. Misc. Utilities/
6. Programming Tools/
7. UNIX Commands.
8. Other Facilities/

ffőbb szekvencia-adatbázisok rendszeres "release"-jeit, így mintegy évi 6000 USD áron fenntartható egy intézeti vagy tanszéki szoftver-rendszer. Az Egyesült Államok egyetemének többségén van ilyen biológiai számítógép, amely általában az egyetemi hálózatra kötött személyi számítógépeken keresztül férhető hozzá. Az egyetemi, intézeti adatállományok azonban többnyire nem naprakészek, tehát a munka egy bizonyos fázisában a felhasználó okvetlenül a naprakész

adatbázisokhoz fordul. Erre két út adódik, mindkettőhöz a nemzetközi számítógépes hálózatok szükségesek, mint pl. az X.25 (Magyarországban az IIF) ill. az INTERNET.

Az első lehetőség az elsődleges adatbázisok (EMBL, GenBank) közvetlen lekérdezése. Erre fejlesztették ki a molekuláris biológiai SERVER-eket, amelyeket elektronikus postán keresztül lehet használni (Az *on-line* használatnál járó megterhelést az elsődleges adatbázisok nem szokták megengedni). A felhasználó postán feladja a szekvenciát és az utasításokat (szigorúan adott formátumban) és "posta fordultával" megkapja a kért eredményt. Európában az EMBL server a legismertebb, ennek szolgáltatásait a 6. ábra sorolja fel. Az elektronikus postán történő keresésnek hátránya, hogy az eredményre sokszor több napot kell várni, és a paraméterek "bejátszására" így sokszor nem jut idő. A közvetlen analízis az un. *másodlagos adatközpontokon* keresztül lehetséges. Ezeket Európában az EMBNET hálózat fogja össze, országonként egy-egy és néhány nemzetközi hozzáférésű csomóponttal. Az EMBNET tagjai olyan számítógépek, melyeken megvannak az adatbázisok, az analízis programjai (pl. GCG) és amelyek többnyire egy ország kutatói szolgálják ki, *on-line* is. A rendszer specifikuma a naprakész adatok fenntartása, amelyeket automatikus programok hoznak el a primér adatközpontokból (EMBL, GenBank) a nemzetközi hálózaton keresztül. A gyakorlatban ez naponta - kétnaponta egyszer történik, ilyenkor egy program megvizsgálja, hogy van-e új adat, ha van, akkor áthozza a hálózaton keresztül, és formattálja a helyi szükségleteknek megfelelően. A másodlagos adatközpontok fenntartása nemcsak költséges, de technikailag igen bonyolult feladat is. A programok, eljárások egy részét házon belül kell kifejleszteni, és a fenntartás is legalább két főállású szakembert igényel. Járulékos szolgáltatásokról is gondoskodni kell, mint az elektronikus posta illetve a *bulletin board* (vitafórum). A másodlagos adatközpontok tipikus példájának tekinthető az UNIDO trieszti ICGEBnet rendszere (17), mely magyar kutatók részére is térítésmentesen hozzáférhető (18). Az ICGEBnet az általános szolgáltatások (elektronikus posta, bulletin board, szövegszerkesztés) mellett a szekvencia-analízis szoftverek teljes körét tartalmazza, és keresthető formában szolgáltat 24 kisebb-nagyobb adatbázist (7-10. ábra). A biológiai adatközpontok között az ICGEBnet volt Európában az első, amely az un. *"wide area information server"* rendszerekhez csatlakozott (13). Ez a rendszer - amely az EMBNET hálózaton hamarosan általános lesz - lehetővé teszi, hogy a felhasználó (több száz) távoli adatbázisban kereshessen, még hozzá külön user-account nélkül, és anélkül, hogy bármit is a saját gépén kellene tárolnia. Technikai szempontból mindez un. *kliens-szerver* kapcsolatban álló szoftverekkel valósul meg. A *kliens* egy felhasználói *interface*, a *szerverek* pedig

egy-egy helyi számítógép adatbankjait "szolgáltatják". Ez az architektúra egyébként a jövőben teljesen átalakíthatja a biológiai adatbankrendszerét. Lehetséges lesz ugyanis az adatbankokat csak néhány nagyobb teljesítményű számítógépen tárolni, melyek - mint szerverek - távolból is lekérdezhetőek lesznek. Így maga keresés néhány központi gépen fog futni, és a mai adatközpontok "specializálódhatnak" egy-egy újabb részterületre. Az ICGEbnet például a távoli fehérje-homológiák keresésének szoftvereit és adatbázisait gyűjti, mint "speciális" gyűjteményt.

9. ábra

ICGEbnet: Sequence Analysis Tools

1. BLAST/
2. BLAZE.
3. CLUSTAL/
4. FASTA/
5. GM/
6. IG Suite/
7. PHYLIP/
8. PLSEARCH/
9. PROSEARCH/
10. READSEQ/
11. SIGNAL SCAN/

A fejlődési irányai

Számítástechnikai szempontból a biológiai adatbankok tulajdonképpen nem szélsőségesen bonyolultnak. A magfizikusok és a csillagászok például sokkal nagyobb adattömeggel dolgoznak, a bankok vagy a repülőjegyfoglalás adatbázisait pedig egyidejűleg akár több tízezer operátor is kezelheti. A biológiai adatbankok specifikuma elsősorban a felhasználás módjában van. Speciális módszer például a "hasonlóság-keresés", amelynek leghatékonyabb algoritmusait (pl. Needleman-Wunsch, Smith-Waterman, Pearson-Lipman algoritmusok, ld. 19) éppen a biológiai szekvenciákra dolgozták ki. A legpregnásabb probléma azonban abból adódik, hogy egy-egy biológiai kérdés eldöntéséhez egyszerre nemcsak egyetlen, de néha igen sok, különbözően strukturált adatbázis egyidejű mozgatására lenne szükség. Például, ha a fehérjék alfa-héliceit kódoló DNS-szakaszokra vagyunk kíváncsiak, akkor a Brookhaven adatbázist, a fehérje- és DNS-szekvenciák bankjait kell egyidejűleg mozgatnunk. A probléma gyökere az, hogy a biológus felhasználó számára teljesen világos összefüggések a számítógépben bonyolult keresztreferenciák formájában vannak ábrázolva. Tehát az információ - jó esetben - fellelhető, az összefüggéseket viszont csak hosszú aprómunka vagy egyedi programozás árán tudjuk csak megtalálni. A egyik megoldást

10. ábra

ICGEbnet: Databanks

1. Biocomp. Bibliography/
2. Brookhaven 3D Databank
3. EMBL Rel.31;/
4. EMBL-Daily: update/
5. EMBL-New Rel.9; /
6. GenBank Rel.72;/
7. GenBank-Daily: updates/
8. GenBank-New Rel.9;/
9. Human Retrovirus & AIDS/
10. INTERLAB Cell Lines/
11. KeyTool Rel.10.0;/
12. LIMB/
13. NASITE Rel.4.0;/
14. OMIM; Dec. 1991/
15. PBASE/
16. PIR Rel. 33;/
17. PROSITE Rel.9.0; /
18. Restriction Enzymes/
19. SBASE Rel. 1.0;/
20. SEQDB Rel. 91.9/
21. SWISS-PROT Rel.23;/
22. Transcription Factors/
23. UEMBL Rel.31_72;/
24. UGenBank Rel. 72_31;

az jelentheti, ha az összes adatbázist egy közös és általános adatstruktúrába rendezzük. A kémiai szerkezetek, szekvenciák, sőt a rájuk vonatkozó megállapítások is lényegében kifejezhetőek egy "entity-relationship" modellhez hasonló közös terminológiával (14). Így az egyidejű kezelés mellett a programok számára hozzáférhetővé válhat majd az annotációkban tárolt biológiai információ is, s ez által sok olyan probléma is automatikusan megközelíthető lesz, amely eddig emberi intuíciót igényelt (15). Például a biológiailag "érdekes" szekvencia motívum, mint fogalom, definiálható együtt előforduló szekvencia- és annotáció motívumokként, amelyek így automatikusan kerestethetőek. Mindehhez azonban lényegesen javulni kell az adatbázisok annotációs részének - ennek hiányában a felhasználónak továbbra is meg kell elégednie az intuitív "manufaktúrális" megoldásokkal. Ezek megkönnyítésére azonban már megjelentek azok a szoftverek, melyek szimultán kezelnek több adatbázist, ilyen pl. az NCBI "Entrez" szoftvere (16).

Köszönetnyilvánítás Az MBK számítógép-rendszerét a Földművelésügyi Minisztérium és az OMFB Mecénatúra pályázata, az ICGEbnet rendszert az UNIDO támogatja. A szerző köszönetet mond Dr. Arturo Falaschinak, az ICGEb, és Dr. Balázs Ervinnek, az MBK, főigazgatójának, valamint munkatársainak, Simon Györgynek, aki az megtervezte és üzembehelyezte

MBK és az ICGEB számítógépes rendszerét és Reményi Józsefnek, az MBK systems managernek.

Hivatkozások

- 1) Quarterman, J.S (1990): "The Matrix: computer Networks and Conferencing Systems Worldwide" Digital Press, Maynard, MA
- 2) Dialog Information Services, P.O. Box 188, Oxford, OX1 5AX, UK, Tel.: 00-4-8653226
- 3) Dayhoff, M.O.: Atlas of Protein Sequence and Structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1972-1978
- 4) Burks, C. és mts.-ai (1988): "The Limb Database", Science, 241, 888
- 5) Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), Bulletin of Mathematical Biology, Biological Cybernetics, Protein Sequence Data and Analysis, Nucleic Acids Research (Database supplement), Bioinformatics,
- 6) National Center for Biotechnology Information, National Biomedical Research Foundation, EMBL Data Library, Gilbert, W. (1991): "Towards a paradigm shift in biology", Nature, 349, 99
- 8) Myers, F. (1990) Human retrovirus and AidsDatabase, Los Alamos National Laboratory, USA.
- 9) Kabat, E.L." (1992)" Amino Acid and Nucleotide Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH, Bethesda, M.D.
- 10) Bairoch, A. (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20 suppl, 2013-2018.
- 11) Simon, Gy., Paladini, R., Tisminetzky, S. Cserző, SM, Hátsági Z. Tossi, A. és Pongor S.: "Improved detection of homology in distantly related proteins" Similarity of adducin with actin-binding proteins" Protein Sequences and Analysis Data, in press; Pongor, S., Skerl, V., Cserző, M. and Hátsági, Z., Simon, Gy és Bevilacqua, V.: "The SBASE domain library" A collection of annotated protein sequence segments" (közlés alatt)
- 12) Devereux, J., Haeblerli, P. and Smithies, O. (1984) : "A Comprehensive set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395. (Ma máá UNIX verzióis léteznek.)
- 13) Alberti, R., Ankersaria, F., Lindner, P., McCahill, M. and Torrey, D. : "The Internet Gopher protocol: a distributed document search and retrieval protocol", University of Minnesota Microcomputer and Workstation Networks Center, 1991-1992.
- 14) Pongor, S. (1988): "Novel databases for Molecular Biology", *Nature*, 323, 24
- 15) Hegyi, H. and Pongor, S. (1992): "Predicting potential domain-homologies from FASTA search results" CABIOS, in press.
- 16) Entrez (1992): *NCBI News*, 1, (2), 2
- 17) Simon, G. and Pongor, S. (1992) "ICGEBnet: The UNIDO computer resource for molecular biology" *Bioinformatics*, 1, 12; Pongor, S., Simon, G. and Falaschi, A. (1992): "The UNIDO computer resource for molecular biology", *The Internet Society News* (2, 27-28)
- 18) Postacím: Simon György, ICGEB, Padriciano 99, Trieste 340123 Italy, elektronikus posta: simon@icgeb.trieste.it

Függelék

A főbb molekuláris biológiai adatbázisok a LIMB (4) listája alapján¹

AANSPII	Amino Acid and Nucl. Seqn. of Proteins of Immunological Interest
AGRICOLA	Agric. bibliography
AIMB	Researchers in Artificial Intelligence and Mol. Biology
AMINODB ¹	List of physical pro-perties of amino acids
APIRS	Aquatic Plant Information Retrieval System
BCAD	BioCommerce Abstracts and Directory
BIOSISCONN	List of researchers and professional services.
BIOSISP	Computer version of citations from Biological Abstracts
BKS	Biotech. conferences publications, courses.
BMCD	Biological Macromol. Crystallization Data
BMR	NMR data on proteins
BRD	Berlin RNA Data Bank
CARBBANK	Complex Carbohydrate Structural Database
CAS ONLINE	Chemical abstracts
CAS Registry	Chemical structure and dictionary of more than 10 million unique substance records
CATGENE	Domestic Cat Gene Frequencies: catalogue and bibliography
CCD	Cambridge 3D Structure Database (small organic molecules)

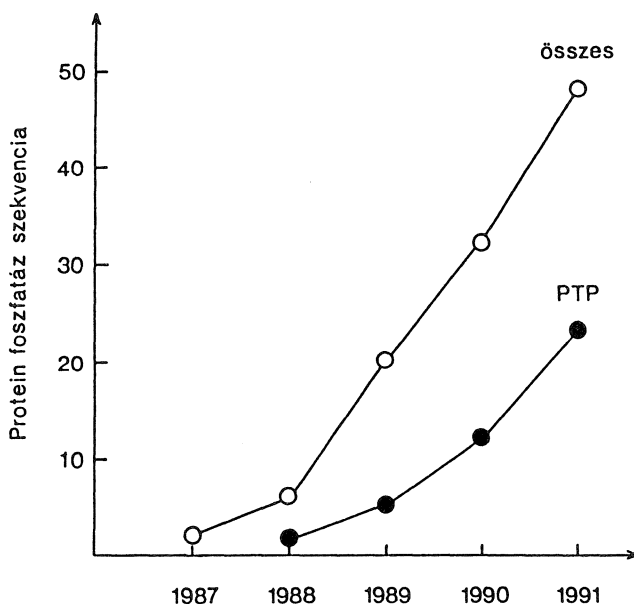
¹ Az EMB-szerveren hozzáférhető (másolható) adatbázisokat "1" jelzi.

CCRIS	Chemical Carcinogenesis Research Information System	FNA	The Flora of North America (north of Mexico).
CGC	C. Elegans strains with genetic map data and bibliography	GBSOFT	The GenBank Software Clearinghouse
CSRS ¹	Compilation of Small RNA Sequences	GC	Gene Communications: a guide to human genome clones
CURRCONTS	Current Contents	GDB	Genome Data Base: mapping and sequencing of the human genome.
CUTG ¹	Codon Usage Tabulation from GENBANK	GDN	Gene Diagnosis Newsletter: Human inherited disease diagnosis using rec. DNA methods.
DBIR	Directory of Biotech Information Resources	GENBANK	U.S. database of all reported nucleotide sequences
DCT	Drosophila Codon Usage Tables	GRIN	Plant Germplasm Information Network
DDBJ	DNA Data Bank of Japan	HDB	Hybridoma Data Bank: A Data Bank on Immuno-clones
DIALOGMC	Dialog Medical Connection: a literature citations 4 major libraries.	HGMCR	NIGMS Human Genetic Mutant Cell Lines and DNA Samples
DRHPL	Database for the Repository of Human and Mouse Probes and Libraries	HIVSSA	HIV Sequence & Sequence Analysis Database
DROSO	Genetic Variations of D. melanogaster	HSDB	Hazardous Substances Data Bank
DTBASE	Univ. of Swansea Allozyme Frequency Database	ILDIS	International Legume Database and Information Service
ECOLI ¹	E.Coli K12 Genome and Protein Database	IRIS	Integrated Risk Information System
EMBL ¹	The EMBL Nucleotide Sequence Database	IUDSC	Indiana University Drosophila Stock Center Stock List
EMBOPRO ¹	A protein sequence database, automatically generated from EMBL	JIPIDB	Japanese databases: -B:protein sequences -N:nucl. sequences -P:protein thermal data; -S:specific sequence groups, nucl. and proteins -V Artificial nucl. and proteins
EMICBACK	Environmental Mutagenesis Information Center Backfile	LIMB	List of molecular biology databases
ENZYME ¹	Enzyme data (EC number, names, catalytic activity, cofactors and cross-references to SWISS-PROT.	LIPIDPHASE	Lipid phase behavior
EPD ¹	Eukaryotic Promoter Database	LYSIS	Endopeptidase cleavage sites in known protein sequences
ETICBACK	Environmental Technology Information Center Backfile		
FLYBASE ¹	Drosophila sequences		

MBCRR	Protein Family Diagnostic Pattern Database and Search Tool	PRCTR	Plasmid Reference Center Transposon Registry
MEDLINE	The world's biomedical literature	PRFLITDB	Osaka protein literature database
MICIS	Microbial Culture Information Service	PRFSEQDB	Osaka protein sequence database
MICROGERM	Microbial Germplasm Database and Network	PROSITE ¹	Biologically significant protein sequence patterns
MINE	Microbial Information Network Europe	PSEQIP	Non-redundant protein sequence data from other databases.
MOUSE	List of Mouse DNA Clones and Probes	PSS	Protein Secondary Structure Database
MOUSEMAN	Linkage and synteny homologies between mouse and man	QTDGPD	Quest 2D Gel Protein Database
MSDN	A commercial network of several microbial databases	RED ¹	Restriction Enzymes
NAPRALERT	References to the isolation of compounds from living matter	RFLPD	CEPH Public Database of RFLP markers
OLIGONUC	Chemically Synthesized Oligonucleotide Database	RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
OMIM	Victor Mckusick's data-base of human inherited diseases	SBASE	Library of protein functional domains and annotated protein sequence segments (ICGEB/ABC-Gödöllö)
PDB	Brookhaven Data Bank of 3D structures for biological macromolecules (X-ray, NMR, models).	SEQANALREF ¹	Sequence Analysis Lit. References
PGDIC	Plant Genome Data and Information Center	SIGPEP	Signal peptide sequences
PIR	Protein sequences: National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource and Protein Sequence Database	SIGSCAN	Eukaryotic transcription factor elements, and other DNA signals
PKCDD	Classification and alignment of protein kinase catalytic domains	SRRSD	16S Ribosomal RNA Sequence Database
PMD	Protein Mutant Dbase Natural and artificial mutants.	SRSRSC	Small Ribosomal Subunit RNA Sequences
PPR	Plasmid Prefix Registry (existing plasmid names)	SVFORTYMUT	SV40 Large T Antigen Mutant Database
		SWISSPROT ¹	Protein Sequence Data Bank of EMBL
		TFD ¹	Transcription Factor Database
		TOXNET	Toxicology Data Network
		TRF	The Taxonomic Reference File at BIOSIS
		TRI	Toxic Chemical Release Inventory
		TRNAC ¹	tRNA Compilation
		TROPICOS	Scientific names of tropical plants

PROTEIN-TIROZIN FOSZFATÁZOK

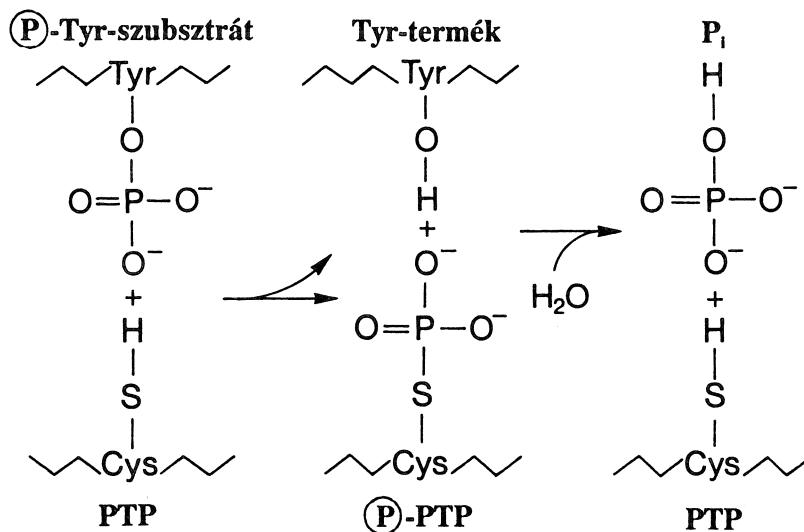
Bár a foszfofehérjék kevesebb mint 1%-a tartalmazza a foszfátcsoportot tirozin oldallánchoz kötve, ezen fehérjék foszforiláltságának mértéke szabja meg, hogy a sejt mikor végzi differenciált funkcióját, és mikor választja a növekedés és osztódás programját. A foszforilációt katalizáló protein-tirozin kinázok (PTK) növekedési faktor-receptorok, virális eredetű onkogének, illetve ezek celluláris homológjai lehetnek (1). A PTK típusait viszonylag jól ismerjük, egyik fontos csoportjukról a közelmúltban jelent meg ismertetés a Biokémiában (2). Ehhez képest elmaradt a defoszforilációt katalizáló protein-tirozin foszfatázok (PTP) biokémiai és molekuláris biológiai jellemzése. Az enzimes család első képviselőinek aminosav sorrendjét csak 1988-ban írták le. Ezután robbanásszerűen növekedett a megismert PTP szekvenciák száma (1. ábra). 1991. decemberéig 23 PTP teljes elsődleges szerkezetét közölték, ami megközelíti az összes ismert protein foszfatáz szekvencia felét.



1. ábra. A protein foszfatázok elsődleges szerkezetének közlési üteme

Az ugrásszerű fejlődés a PTP jelentősége mellett azzal magyarázható, hogy az első szekvenciák meghatározása után lehetőség nyílt hasonló DNS szekvenciával rendelkező klónok kiválasztására cDNS és génkönyvtárakból. A homológián alapuló megközelítés ellenére a PTP család szerteágazó, vannak olyan távoli "rokonok", melyekben a hasonlóság csak kis szekvencia részletekre korlátozódik.

Az eddig megismert PTP fehérjékben előfordul a His-Cys-X-Ala-Gly-X-X-Arg peptidszakasz, és ezen belül a Cys jelenléte az aktivitás előfeltétele. Guan és Dixon (3) bebizonyította, hogy az esszenciális Cys SH-csoportja közvetlenül részt vesz a katalitikus reakcióban (2. ábra).



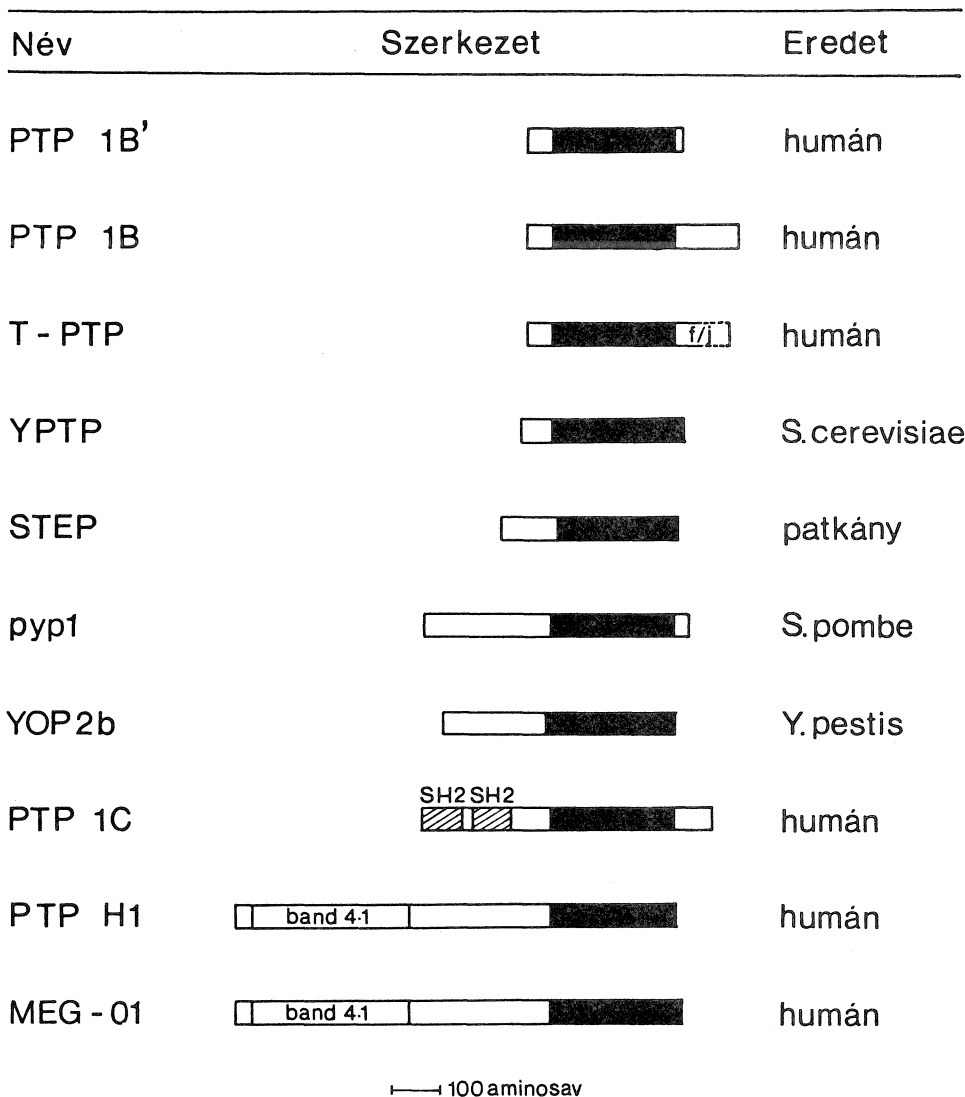
2. ábra. A protein-tirozin foszfatázok reakciómechanizmusa

A PTP-kutatás molekuláris biológiai megközelítéséből adódik, hogy először a cDNS ill. gén DNS szekvenciáját határozzák meg, és ebből következtetnek a fehérje aminosav sorrendjére. Az, hogy a kódolt fehérje valóban PTP aktivitással rendelkezik a DNS-ből mesterségesen termeltetett fehérje enzimológiai vizsgálatával igazolható. A PTP aktivitás döntő bizonyítékának azt tekintik, ha a termelt enzim katalizálja Tyr oldalláncon foszforilált fehérje-, vagy peptidszubsztrát defoszforilációját, és a Cys helyén mutációt tartalmazó módosított enzim inaktív.

A korábbi jellemzés (4) folytatásaként az alábbiakban ismertetem a PTP enzimsalád legfontosabb képviselőinek szerkezetét és megismert funkcióit. Az összeállításhoz az eredeti munkák mellett összefoglaló cikkeket (5-8) is felhasználtam.

Intracelluláris protein-tirozin foszfatázok

A sejten belül található PTP csoport tagjainak jellemzője egy kb. 230 aminosavból álló centrális foszfatáz domén, amihez különböző N- és C-terminális peptidszakaszok kapcsolódnak (3. ábra).



3. ábra. Az intracelluáris protein-tirozin foszfatázok

Az ábra méretarányos, a skála 100 aminosavnak felel meg. A fekete oszlop a PTP katalitikus doménjét, a fehér oszlopok a nemkatalitikus régiókat jelzik. A szaggatott vonalak az izoenzim eltérő peptidszakaszait mutatják.

Az első homogén PTP-t emberi méhlepény citoszoljából izolálták Tonks és mtsai (9). Kimutatták, hogy a 37 kDa molekulatömegű PTP1B' a tisztítás során proteolízissel keletkezik a 50 kDa molekulatömegű PTP1B-ből (10). A natív fehérje C-terminális végén lévő 35 aminosav biztosítja az enzim kötődését az endoplazmás retikulum (ER) intracelluláris oldalához (11). A PTP1B lokalizációja alapján feltételezhető, hogy szerepet játszik az ER funkciók szabályozásában. Azt, hogy a PTP1B képes ellensúlyozni PTK-ok hatását két kísérletsorozat is bizonyítja. *Xenopus* béka petesejtjébe injektált PTP1B késleltette az inzulin hatására bekövetkező érési folyamatot (12), és a PTP1B expressziója

elnyomta a *neu* onkogén által okozott transzformációt NIH3T3 sejtekben (10).

A **PTP1B**-hez hasonló a **T**-sejtekből izolált, de számos szövetben előforduló **T-PTP** (13). A fehérje C-terminális vége gátolja a foszfatáz aktivitását és az utolsó 98 aminosav szükséges - egy részletesen nem jellemzett - partikuláris frakcióhoz való kötődéshez (14). A C-terminális közelében található a *fos/jun* transzkripció faktorokkal homológ peptidszakasz (15). Az enzim 4 módosulatát mutatták ki, amelyek két gén különbözőképpen szerkesztett termékei (15,16). Az izoenzimek közt a legjelentősebb különbség a C-terminális régióban található, ami alapján feltehető, hogy az izoformák regulációja és/vagy lokalizációja eltérő. A **T-PTP** fehérje túltermelése csökkentette a trombocitából izolált növekedési faktor hatására bekövetkező fehérje foszforilációt (14), tehát a **T-PTP** is ellensúlyozza a **PTK** hatását.

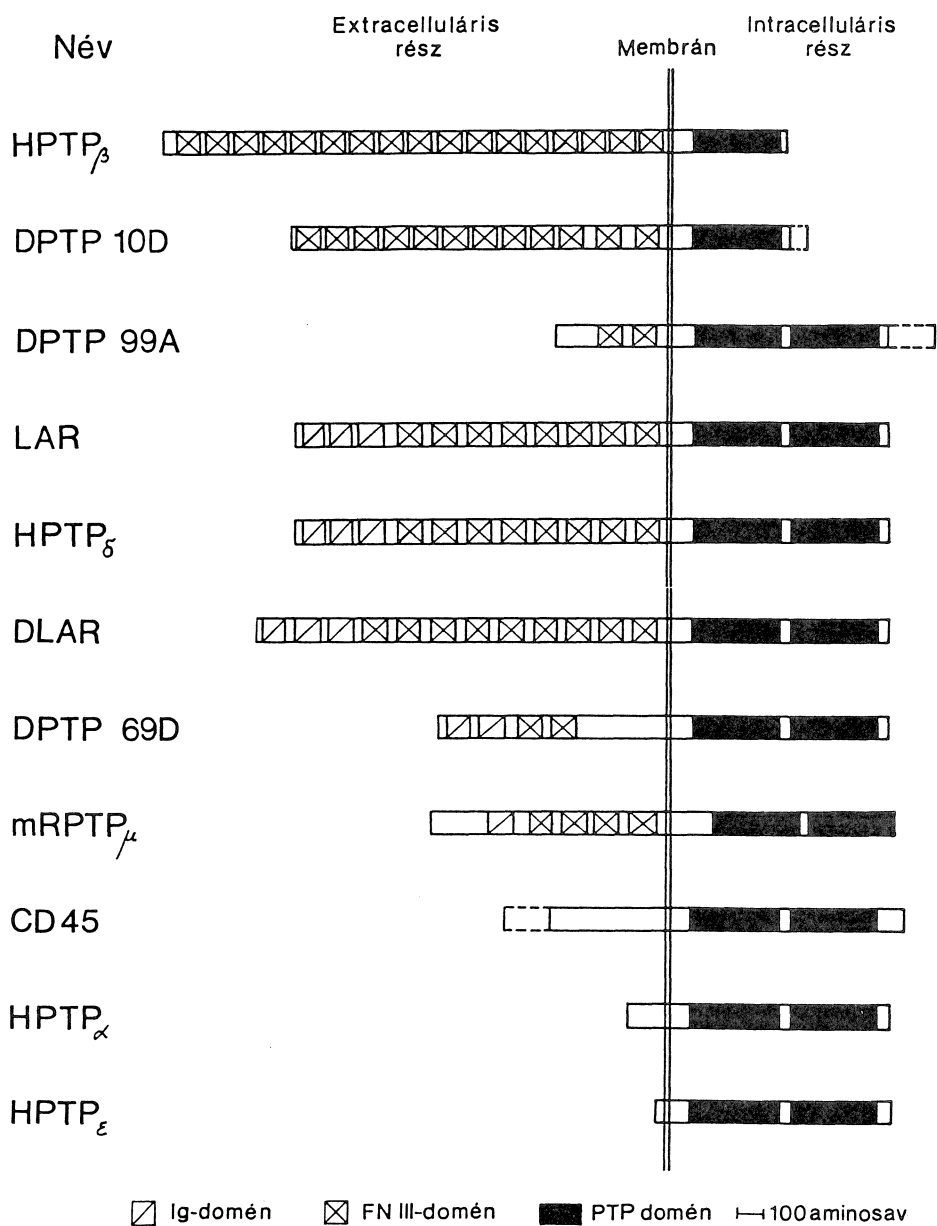
Intracelluláris **PTP** az élesztőkben is megtalálható (17,18). A sarjadzó élesztő **YPTP** katalitikus doménjét nem követi C-terminális domén, így szerkezete a **PTP1B'**-höz hasonló (17). Ugyanilyen felépítést mutat az ideg specifikus (**S**Triatum **E**nriched **P**TP) **STEP** is (19). A **STEP** potenciális mirisztilációs helyet tartalmaz, így feltehetően membránhoz kötődik. Az **YPTP** vagy **pyp1** gének megszakítása az élesztőkben nem okozott feltűnő fenotípus változást. Ez azt jelenti, hogy a **YPTP** és **pyp1** funkciója nem alapvető, vagy az élesztőkben több **PTP** gén is található, és az egyik elvesztését a többi gén terméke kompenzálja.

A pestis kórokozója a *Yersinia pestis* baktérium plazmidja által hordozott (**Y**ersinia **Q**uter-membrane **P**rotein) **YOP2b** gén terméke is **PTP**, amelynek aktivitása a fertőzőképesség szükséges előfeltétele (20). Ezzel homológ a *Yersinia pseudotuberculosis* **YOPH** és a *Yersinia enterocolitica* **YOP51** gén terméke. Hatásukat úgy fejtik ki, hogy a fertőzött sejt néhány fehérjének defoszforilációjával megbénítják annak védekező mechanizmusát (21).

Az intracelluláris **PTP** csoport újabban felismert tagjainak N-terminális része speciális kötőhelyet tartalmaz. A **PTP1C**-ben két (**S**rc **H**omológ) **SH2** domén található, ami a foszfortirozint tartalmazó szubsztráthoz horgonyozza a foszfatázt (22). A **HeLa** sejt **PTPH1** (23) és a **MEG**akarioblaszt **MEG-1** (24) **PTP** enzimei hasonlóak, N-terminális doménjük homológ a band 4.1 fehérje, valamint az ezrin és talin elsődleges szerkezetével. Feltételezhetően az adhéziós plakkhoz kötődnek, ahol az *src* kináz hatását ellensúlyozzák.

Transzmembrán protein-tirozin foszfatázok

Az intracelluláris **PTP** katalitikus doménje és a plazmamembrán külső részén elhelyezkedő extracelluláris polipeptid génjének fúziója révén jöttek létre a transzmembrán **PTP**-ok. Néhány esetben a katalitikus domén tandem duplikációja is lejátszódott (4. ábra).



4. ábra. A transzmembrán protein-tirozin foszfatázok
 A jelölések megfelelnek a 3. ábra szövegében leírtaknak.

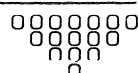
Az extracelluláris rész gyakran több (2-17) FibroNektin III (FNIII) típusú domén ismétlődésével alakult ki, amihez még néhány (1-3) Immunoglobulin (Ig) szerű domén is kapcsolódhat. A **CD45** extracelluláris doménje egyedi, a **HPTP_α** és **HPTP_ε** extracelluláris része pedig olyan kicsi, hogy csak a **PTP** membránban való rögzítését tudja biztosítani.

Először a fehérvérsejtek felszíni markereként megismert **CD45** (más elnevezései: **Leukocyte Common Antigen LCA, T200, B220**) glikoprotein intracelluláris doménjeinek szekvenciája alapján gondoltak arra, hogy az transzmembrán PTP-ként működhet. A hipotézis a PTP aktivitás kimutatásával nyert bizonyítást (25). A **CD45** foszfatáz alapvető szerepet játszik mind a T-sejtek (5,26), mind a B-sejtek (27) aktiválásában. Az extracelluláris domén N-terminális vége az mRNS szabásától függően különböző lehet; a PTP aktivitásért az intracelluláris domén a felelős. Bár a konzervált Cys csak a membránhoz közelebbi PTP doménben van, mindkét PTP domén szükséges a teljes enzim-aktivitáshoz (28).

A **CD45** citoszolikus részéhez való hasonlóság alapján klónozták a (**Leukocyte common Antigen Related**) **LAR** transzmembrán foszfatázt és *Drosophila* homológjait a **DLAR**-t és **DPTP 69D**-t (29). Az utóbbiak a szintén *Drosophilából* klónozott **DPTP 10D** és **DPTP 99A** enzimekkel együtt elsősorban a központi idegrendszerben találhatók (30). A *Drosophila* embrió idegrendszerén belül a **DPTP 10D** és **DPTP 99A** az ún. pionír neuronok végén lokalizálható (31), ezért feltételezik, hogy ez a két foszfatáz az idegrendszer fejlődésében játszik fontos szerepet. A *Drosophila* géntérkép 10D (X kromoszóma) és 99A (3. kromoszóma jobb karja) régiójában lévő gének fehérjetermékei az mRNS átszerkesztése miatt különböző C-terminális szekvenciákkal rendelkeznek, így a **PTP 10D**-nek 2, a **PTP 99A**-nak pedig 3 izoformája létezik (30-32).

A receptor-szerű PTP-ok egész sorát klónozták **Humán** cDNS könyvtárakból és **HPTP α , β , γ , δ , ϵ és ζ** jelekkel látták el őket (33). Ezek közül a **HPTP δ , γ és ζ** teljes szekvenciája még nem ismert (33), azonban a **HPTP γ** gén 3p21 lokalizációja alapján már most feltételezhető, hogy terméke tumorszuppresszor hatással rendelkezik (34). Hasonló jelentőségű lehet az **mRPTP μ** , amit eredetileg egérből klónoztak (**mouse Receptor like PTP**) (35).

A transzmembrán PTP csoport szerkezete arra utal, hogy a transzmembrán PTK-okhoz hasonlóan a membránon keresztüli jelátvitelben játszanak szerepet. Bár a fiziológiásan jelentős ligandot még egy esetben sem sikerült azonosítani, nagyon valószínű, hogy a ligand kötődése a PTP asszociációs állapotát megváltoztatva befolyásolja a membrán belső oldalán a foszfatáz domén(ek) aktivitását. Ligandként elsősorban egy szomszédos sejt felszíni markere jöhet számításba. Ily módon a PTP aktív szerepet játszhat a sejtek jelátalakító mechanizmusában.



A tudomány által átalakított világot csak az a szellem irányíthatja, amely a tudományt létrehozta : az igazságkeresés, a tények hideg fővel, félelemtől, kapzsiságtól és hatalomvágytól mentes számbavétele.

Protein-tirozin/szerin/treonin foszfatázok

Már régóta ismert volt, hogy a *S. pombe* **cdc25** és homológjai a **MIH1**, **stg** és **CDC25** (1. táblázat) aktiválják a *cdc2* protein kinázt, amely a mitózis beindításáért felelős. Az aktiválás mechanizmusa sokáig vitatott volt (ld. 41) annak ellenére, hogy a megfelelő fehérje szekvenciákat ismerték.

1. táblázat. Protein-tirozin/szerin/treonin foszfatázok

Név	Eredet	Aminosav	Hivatkozás
VH1	<i>Vaccinia</i> vírus	171	36
cdc25	<i>S. pombe</i>	580	37
MIH1	<i>S. cerevisiae</i>	474	38
stg	<i>Drosophila</i>	479	39
CDC25	Humán	473	40

A probléma megoldását elősegítette, hogy felismerték a *Vaccinia* vírus **H1** gén terméke és a PTP szekvenciák közötti kisfokú hasonlóságot (36). A **VH1** a vírusfertőzéshez nem szükséges, azonban feltehetően szerepet játszik a vírus replikációjában. Bár a **VH1** a szokásos PTP doménnek csak egy részét tartalmazza, megtalálható benne az esszenciális Cys és a környezetét alkotó konzervált aminosavak. A baktériumban termeltetett **VH1** enzim mind tirozinon, mind szerinen foszforilált fehérjék defoszforilációját katalizálta, és a Cys mutációja mindkét típusú defoszforilációt megszüntette (36). Mivel a **VH1** a 2. ábrán bemutatott mechanizmus szerint működik, a PTP család különleges, szélesebb szubsztrát-specifititású képviselőjének tekinthető.

A **cdc25** és homológjai, valamint a **VH1** közötti szekvencia hasonlóság és az esszenciális Cys kimutatása alapozta meg azt a nézetet, hogy a **cdc25** is a PTP család tagja (41). A **cdc25** különlegesen specifikus enzim, csak a *cdc2* defoszforilációját katalizálja, viszont a *cdc2* gátlását okozó protein Tyr- és Thr-foszfatokat is defoszforilálja. Az esszenciális Cys mutációja mindkét reakciót gátolja, igazolva, hogy a mitózis indukciójáért egy speciális PTP felelős.

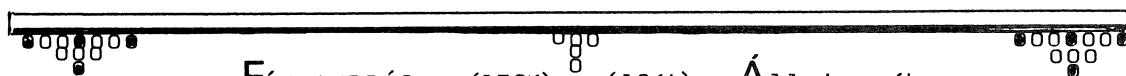
Dombrádi Viktor

DOTÉ Orvosi Vegytani Intézet

Irodalom

1. Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988) *Science* 241 42-52
2. Horváth, A. (1992) *Biokémia* 16 51-58
3. Guan, K., Dixon, J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 17026-17030
4. Dombrádi, V. (1990) *Biokémia* 14 1-9
5. Alexander, D.R. (1990) *The New Biologist* 2 1049-1062
6. Fischer, E.H., Charbonneau, H., Tonks, N.K. (1991) *Science* 253 401-406
7. Saito, H., Streuli, M. (1991) *Cell Growth and Differentiation* 2 59-65
8. Goldstein, B.J. (1992) *J. Cell. Biochem.* 48 33-42
9. Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 6722-6730
10. Brown-Shimer, S., Johnson, K.A., Hill, D.E., Bruskin, A.M. (1992) *Cancer Res.* 52 478-482
11. Frangioni, J.V., Beahm, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A., Neel, B.G. (1992) *Cell* 68 545-560
12. Cicirelli, M.F., Tonks, N.K., Diltz, C.D., Weiel, J.E., Fischer, E.H., Krebs, E.G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 5514-5518
13. Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H., Krebs, E.G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 5257-5261
14. Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Fischer, E.H., Krebs, E.G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 7280-7284
15. Swarup, G., Kamatkar, S., Radha, V., Rema, V. (1991) *FEBS Lett.* 280 65-69
16. Mosinger, B., Jr., Tillmann, U., Westphal, H., Tremblay, M.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 499-503
17. Guan, K., Deschenes, R.J., Qiu, H., Dixon, J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 12964-12970
18. Otilie, S., Chernoff, J., Hannig, G., Hoffman, C.S., Erikson, R.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 3455-3459
19. Lombroso, P.J., Murdoch, G., Lerner, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 7242-7246
20. Guan, K., Dixon, J.E. (1990) *Science* 249 553-556
21. Bliska, J.B., Guan, K., Dixon, J.E., Falkow, S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 1187-1191
22. Shen, S.H., Bastien, L., Posner, B.I., Chrétien, P. (1991) *Nature* 352 736-739
23. Yang, Q., Tonks, N.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 5949-5953
24. Gu, M., York, J.P., Warshawsky, I., Majerus, P.W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 5867-5871

25. Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H., Walsh, K.A. (1988) *Biochem.* 27 8695-8701
26. Peyron, J.F., Verma, S., de Waal Malefyt, R., Sancho, J., Terhorst, C., Spits, H. (1991) *Int. Immunol.* 3 1357-1366
27. Justement, L.B., Campbell, K.S., Chien, N.C., Combier, J.C. (1991) *Science* 252 1839-1842
28. Johnson, P., Ostergaard, H.L., Wasden, C., Trowbridge, I.S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 8035-8041
29. Streuli, M., Krueger, N.X., Tsai, A.Y.M., Saito, H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 8698-8702
30. Tian, S.S., Tsoulfas, P., Zinn, K. (1991) *Cell* 67 675-685
31. Yang, X., Seow, K.T., Bahri, S.M., Oon, S.H., Chia, W. (1991) *Cell* 67 661-673
32. Hariharan, I.K., Chuang, P.T., Rubin, G.M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 11266-11270
33. Krueger, N.X., Streuli, M., Saito, H. (1990) *EMBO J.* 9 3241-3252
34. LaForgia, S., Morse, B., Lery, J., Barnea, G., Cannizaro, L.A., Li, F., Nowell, P.C., Borghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A., Harris, C.C., Drabkin, H., Patterson, D., Croce, C.M., Schlessinger, J., Huebner, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 5036-5040
35. Gebbink, M.F.B.G., van Etten, I., Hateboer, G., Suijkebuijk, R., Beijersbergen, R.L., van Kessel, A.G., Moolenaar, W.H. (1991) *FEBS Lett.* 290 123-130
36. Guan, K., Boyles, S.S., Dixon, J.E. (1991) *Nature* 350 359-362
37. Russell, P., Nurse, P. (1986) *Cell* 45 145-153
38. Russell, P., Moreno, S., Reed, S.I. (1989) *Cell* 57 295-303
39. Edgar, B.A., O'Farrell, P.H. (1989) *Cell* 57 177-187
40. Sadhu, K., Reed, S.I., Richardson, H., Russell, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 5139-5143
41. Millar, J.B.A., Russell, P. (1992) *Cell* 68 407-410



FÁY ANDRÁS (1786) - (1864) Állatmesék

A majom

A kvalifikált szarka

A majom hosszas fogságából elillant. Az atyafi majomsereg örvendezve vette őt körül, de mint elbámula mindegyik, amint a megérkező idegen makogás mellett emberi eltanult mozdulatokat kezdte ejtetni, s felei közé sehogy sem szokhata, sem vegyülhete. „Gyáva - szóla szánakozva az anya -, te majomnak már nem érsz semmit, embernek pedig ostoba vagy,”

Magyarom ! Elvész az eredeti karakter a sok követésben.

A szarka, fogságában emberi szókat ejteni tanult. Kiszabadulván, erőlködék hibásan ejteni a szarka-csergést. „Be nagy kvalifikáció kellett arra, hogy az anyai hangokat szádból kiüsse!” - így bámulá egy verébcsoport a mímemlőt, De a holló mosolyogva kiáltá :

„Gyáva felejtő ! még gyávább csodálók !”

COMPLEMENT RESEARCH; BIOSYNTHESIS, GENETICS, IMMUNOREGULATORY ROLE AND CLINICAL STUDIES

András Falus, George Füst and Anna Erdei

Complement research has been a rapidly developing topic of Hungarian immunology. Joseph von Fodor was one of the discoverers of the complement system at the end of the last century. The first method for titrating complement components, the so-called R-reagent procedure has also been introduced by Hungarian researchers, Andras Hegedus and Edith Greiner.

Genetics and biosynthesis of complement components

Cytokines, antibodies (via Fc receptors) and histamine are among the factors that regulate the biosynthesis of complement proteins. Ujhelyi et al.¹ demonstrated the effectiveness of alpha-interferon (IFN-alpha) in inducing C2 secretion by human monocytes. The selective enhancement of C3 gene expression and secretion via a certain isotype-specific Fc receptors (IgG2a and IgG2b) in peritoneal murine macrophages and in the established macrophage-like cell line, P388D1 was described by Bajtay et al.². Other IgG isotypes binding to different Fc receptors were less active.

Evidence for the involvement of histamine H1 and H2 receptors in the regulation of complement production by macrophages, hepatocytes and various human monocytic and hepatoma-derived cell lines has been provided by Falus and Merétey^{3, 4}. They described enhancement through H1-, and suppression via H2 receptors but the net outcome of histamine binding was also dependent on the activation level of cells particularly in cells previously treated with interleukin1 (IL-1), IL-6 or gamma interferon (IFN-gamma)^{5, 6}.

In humans, too, there is synergism of IL-1 and IL-6 in the induction of human factor B and C3, and the stimulatory effect of androgens on C1 inhibitor has been described by the same authors⁷. At the molecular level, the IL-1/IL-6 synergism is different for factor B and C3, occurring at the transcriptional and secretory level, respectively.

Falus et al.⁸ described strict genetic (that is, strain-specific) as well as tissue-specific regulation of constitutive and IL-1 induced mouse C2, factor B and C3 gene expression. These differences mapped to the H-2 complex.

Following the cloning and sequencing of mouse C2 cDNA, Falus and colleagues⁹ have been able to employ restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of murine MHC Class III genes to establish a new classification system for inbred and outbred mouse strains. More RFLP-haplotypes were found in the C4/Slp region than in that of C2/Factor B area. Using this genotyping procedure the genetic origin of some laboratory mouse strains was revealed.

Classical and molecular genetic complementology have even found an application in Hungarian anthropology. Kramer et al.¹⁰ characterized the allele distribution of MHC Class III proteins (C2, factor B, C4) and C3 in Gipsy population of Hungary. A definite difference from the Hungarian ethnics has been uncovered supporting the Indian origin of Gipsy ethnic group.

In a collaborative work with Ch.Alper (Boston), Varga et al. studied immune complex (IC) precipitation inhibition capacity in sera with different complement allotypes¹¹. A marked decrease of precipitation inhibition was found in sera with C2B allotype as compared to the C2C allotype, while no difference was found between sera of individuals with or without homozygous C4A and C4B deficiency.

Activation of C1

The role of complex formation of C1 inhibitor with C1, to avoid the autocatalytic reaction of C1, has been clarified by Schumacher and Závodszky¹², Vonderviszt et al.¹³, analysing the C1q-immune complex matrix interaction, described the necessity of segmental mobility and domain-domain interactions of complexed IgG molecules. In the baculovirus-insect expression system hemolytically active C1r has been expressed by Gál et al.¹⁴. A method to increase the amount of the recombinant C1r protein has been developed by Sárvári et al.¹⁵.

Complement-binding cell membrane structures

The role of the third component C3, in the immune response and the relevance of C3 acceptors has been studied extensively by Erdei *et al.*¹⁶.

Immobilized C3b and C3d are capable of controlling the entry of activated B cells into the S-phase^{17, 18}. C3 can also modulate T cell activation *in vitro*: both C3 and C3b, added in aggregated form to helper T (T_H) cell lines, enhance the proliferation induced by IL-2 (Ref.19). The possible molecular basis of this finding was suggested by the interaction between IL-2 and C3, resulting in the inhibition of ligand binding to CR1 (Ref.20).

C3 amplifies antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). This is due to C3 bridge formation between the C3-acceptor bearing effector cells and the $CR1^+$ target cells²¹. In these experiments, C3 was shown to be cleaved by surface-associated enzymes on the effector blast cells.

Acceptor-bound C3b is also present on MHC class II⁺ macrophages and on the human monocytic-histiocytic cell line, U937 (Ref.22). C3-fragments, covalently bound through their activated thiolester groups were found to inhibit the binding and ingestion of ICs and also the ADCC function of macrophages. Based on these experiments a functional cooperation between C3-acceptors, Fc receptors and cell surface proteases of lymphocytes and macrophages has been postulated by Gergely *et al.*²³.

Progress is also being made in the characterization of other complement receptors. The C1q receptor on mouse cells has been described by Erdei²⁴. The majority of C1q-binding cells are either B cells or macrophages. Mouse and human C1q receptors have been shown to be antigenically related counterpart and C1q-binding material released from human cells by limited proteolysis has been characterized by Erdei and Reid^{25, 26}. A receptor for factor-H on the membrane of human B-cells has been purified and characterized by Erdei and Sim²⁷. Of the

two subpopulations of factor-H, only one bind to the cells, possibly as a consequence of a difference between the molecular conformation of the two subpopulations²⁸.

Complement plays a key role in the immune complex clearance. The capacity of nascent immune complexes formed in the presence of human complement, and that of performed immune complexes reacted with complement subsequent to their formation to bind to autologous red blood cells (RBCs) was compared by Varga *et al.*²⁹ There was a loss of binding to CR1 on RBCs if the complexes were formed in the presence of complement. The failure of these nascent complexes to bind to RBC was not due to the lack of C4- or C3- binding and/or activation rather to peculiarities of structure of this type of complexes³⁰. The binding of complement-reacted, IgM containing ICs to RBS has been studied by Kávai *et al.*³¹. The inefficient binding of these immune complexes to CR1 may be due to the weak incorporation of C3-fragments into the complexes.

Complement studies in human disease

In a comparative study of the allotype frequencies of some complement among "young" (less than 45 ys old) and "old" (more than 60ys) subjects, Kramer *et al.*³² made an interesting observation. They found a marked and selective decrease of one C4B haplotype (C4B*Q0) in "old" group when compared to the "young" one. The difference was even more significant when only men were analysed. These observations suggest that the C4B*Q0 haplotype is related to a possible negative selection risk-factor for survival of middle-aged people, particularly for males.

The complement system of patients with lymphoid malignancies has been intensively studied. Impaired complement functions and immune complex solubilization was reported by Varga *et al.*³³ and Füst *et al.*³⁴ in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Their data suggest that a factor in the sera of CLL patients interferes with complement-dependent solubilization of immune complexes. Impaired bactericidal activity was found in the sera of some

CLL patients³⁵. This may be related to the findings of Hidvégi et al.³⁶ that, in CLL, the level of C1q-fibronectin and C1 inhibitor-C1r/C1s complexes is markedly elevated as compared to the healthy subjects. This indicates an increased rate of C1 activation which, in turn, may be responsible for the hypocomplementaemia observed in these patients.

C1 inhibitor synthesis by fibroblasts derived from both types of hereditary angioneurotic edema (HANE) was studied by Kramer et al.³⁷. Type I HANE cells synthesize only 20% of C1 inhibitor produced by normal cells, much less than the predicted 50% for a single normal allele. Type II HANE cells synthesize normal amount of the C1 inhibitor.

Serum levels of complement proteins and the rate of the complement activation via both pathways in HIV disease, as well as the interaction between some peptides of the HIV envelope and complement was studied by Füst et al.³⁸ focusing at the role of complement binding to HIV virions in the pathomechanism of HIV diseases.

REFERENCES

- 1 Ujhelyi,E., Onody,K., Minh,D.Q.et al. (1987) *Immunol.Lett.* 15, 41-44
- 2 Bajtay,Zs., Falus, A., Erdei,A. and Gergely,J. (1992) *Scand.J.Immunol.* 35, 195_201
- 3 Falus,A. and Merétey,K. (1987) *Immunology*, 60, 547-551
- 4 Falus,A. and Merétey,K. (1988) *Mol. Immunol.* 25, 1093-1097
- 5 Falus, A., Walcz,E., Brozik,M. et al. (1989) *Scand.J.Immunol.* 30, 241-248
- 6 Falus,A., Rokita,H., Walcz,E.M. et al. (1990) *Mol. Immunol.* 27, 197-201
- 7 Falus,A., Fehér,K.G., Walcz,E. et al. (1990) *Mol.Immunol.* 27, 191-195
- 8 Falus,A., Beuscher,H.U., Auerbach,H.S. and Colten, H.R. (1987) *J.Immunol.* 138, 856-860
- 9 Falus,A., Wakeland,E.K., Gitlin,J. et al. (1987) *Immunogenetics*, 25, 290-295
- 10 Kramer,J., Kassai,T., Tauszik T. and Füst,G. (1990) *Immunol. Lett.* 24, 11-12
- 11 Varga,L., Alper, Ch.A., Zam, Z. and Füst, G. (1991) *Clin. Immunol.Immunopathol.*, 59, 65-71
- 12 Schumaker,V.,N., Závodszky,P. and Poon,P.H. (1987) *Ann.Rev.Immunol.* 5, 21-42
- 13 Vonderviszt,F., Török,J., Lakatos,S. et al. (1987) *Biochem.J.* 243, 449-455

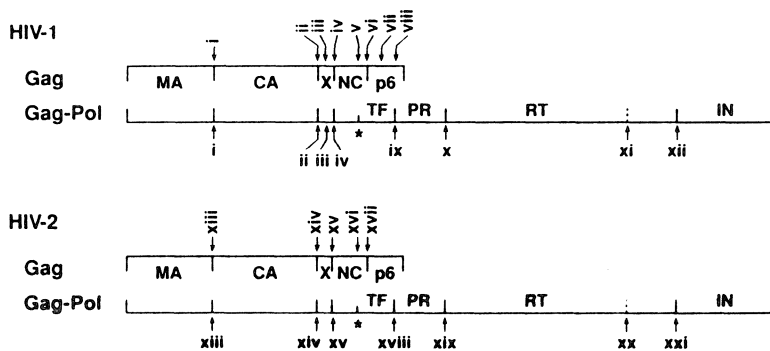
- 25 Erdei,A. and Reid,K.B.M. (1988) *Mol.Immunol.* 25, 1067- 1073
- 26 Erdei,A. and Reid,K.B.M. (1988) *Biochem.J.* 255, 493-499
- 27 Erdei,A. and Sim, R.B. (1987) *Biochem.J.* 246, 149-156
- 28 Ripoché,J., Erdei,A., Gilbert,D. et al. (1988) *Biochem.J.* 253, 475-480
- 29 Varga,L., Thiry,É. and Füst,G. (1988) *Immunology* 64, 381-184
- 30 Hidvégi,T., Varga,L., Falus,A. et al. (1991) *Complement Inflamm.* 8, 43-49
- 31 Kawai, M., Moller Rasmussen, J., Baatrup, S. et al. (1988) *Scand.J.Immunol.* 28, 123-128
- 32 Kramer,J., Fülöp,T., Rajczy, K. et al. (1991) *Hum. Genet.* 86, 595-598
- 33 Varga,L., Miszlai,Zs., Czink,E. et al. (1987) *Diagnostic and Clinical Immunology* 5, 129- 134
- 34 Füst,G., Miszlai,Zs., Czink,E. et al. (1986/1987) *Immunol.Lett.* 14, 255-259
- 35 Varga,L., Clas,F., Füst,G. et al. (1988) *Complement* 5, 40-45
- 36 Hidvégi,T., Ermolin,G.A., Efremov,E.E. et al. (1989) *Immunol.Lett.* 22, 1-6
- 37 Kramer,J., Katz,Y., Rosen,F.S. et al. (1991) *J.Clin.Invest.* 87, 1614-1620
- 38 Füst,G., Ujhelyi,E., Hidvégi,T. et al. (1991) *Immunol.Investigations* 20, 231-241
- 14 Gál,P., Sárvári,M., Szilágyi,K. et al. (1989) *Complement Inflamm.* 6, 433-441
- 15 Sárvári,M., Csikós,G., Sass,M. et al. (1990) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 167, 1154-1161
- 16 Erdei,A., Füst,G. and Gergely,J. (1991) *Immunol.Today* 12, 332-338
- 17 Erdei,A., Melchers,F., Schulz,T. and Dierich,M.P. (1985) *Eur.J.Immunol.* 15, 184-188
- 18 Melchers,F., Erdei,A., Schulz,T. and Dierich,M.P. (1985) *Nature* 317, 264-267
- 19 Erdei,A., Spaeth,E., Alsenz J. et al. (1984) *Mol.Immunol.*, 21, 1215-1221
- 20 Bartók,I., Erdei,A., Mouzaki,A. et al. (1989) *Immunol.Lett.* 21, 131-138
- 21 Erdei,A., Benczur,M., Fábry,Zs. et al. (1984) *Scand.J.Immunol.* 20, 125-131
- 22 Erdei,A., Bajtay,Zs., Fábry,Zs. et al. (1988) *Mol.Immunol.* 25, 295-303
- 23 Gergely,J., Bajtay,Zs., Erdei,A. and Fábry,Zs. (1985) *Immunol.Lett.* 11, 141-146
- 24 Erdei,A. (1990) *J.Immunol.* 145, 1754-1760

András Falus is at the Dept.of Molecular Biology, National Institute
of Rheumatology and Physiotherapy
George Füst at Dept.of Immunopathology, National Institute of Haematology and
Blood Transfusion
Anna Erdei is at Dept.of Immunology, Eötvös L.University.

A HIV PROTEINÁZOK SPECIFITÁSA

A retrovírusok burokkal rendelkező pozitív szálú diploid RNS-t tartalmazó vírusok. Retrovírus-fertőzés kimenetele sokféle lehet: betegség nélküli virémia, daganatképződés, idegrendszeri elváltozások, anémia vagy immunhiány. Az ismert humán retrovírusok, a T-sejtes leukémia vírus (HTLV) illetve az immunodeficiencia vírus (HIV, melynek két formája ismert, a HIV-1 és a HIV-2) által okozott betegségek, a felnőtt T-sejtes leukémia (ATL) és még inkább a szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) súlyos egészségügyi problémát jelentenek napjainkban (1).

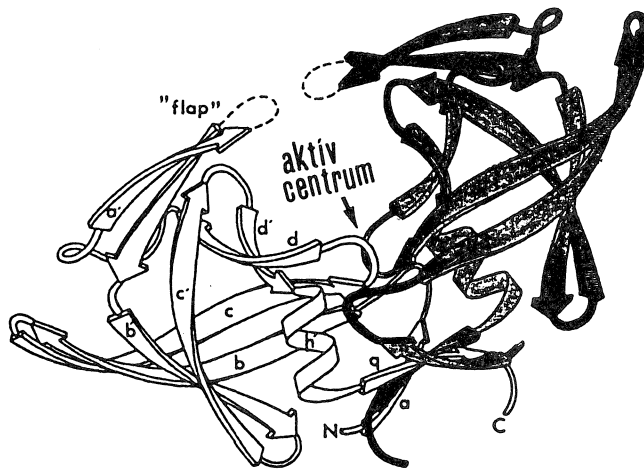
Minden replikációra képes retrovírus, így a HIV is kódol egy proteinázt (PR¹), mely része a Gag vagy Gag-Pol poliproteinnak, a vírus érése során aktiválódik, és a Gag, Gag-Pol fehérjéket funkcionális fehérje alegységekre hasítja (1. ábra). Az elmúlt években számos PR szekvenciáját meghatározták: 99-126 aminosavból állnak. A PR homológ egy, a retrotranszpozonokban kódolt szekvenciával illetve celluláris aszpartil-proteinázok szekvenciájával (2).



1. ábra: Vírusfehérjék szekvenálásával meghatározott hasítási helyek HIV Gag és Gag-Pol fehérjékben: A leolvasási keret eltolódásának helyét csillag jelöli.

¹Retrovírus fehérjék kétbetűs némenklatúrája Leis és mt. (J. Virol. 1988, 62:1808-1809) szerint. MA: mátrix proteiin, CA: kapszid protein, NC: nukleokapszid protein, TF: transframe protein, PR: proteináz, RT: reverz transzkriptáz, IN: integráz. A nem ismert funkciójú fehérjéket p betűvel, majd azt követően a fehérjék molekulatömegét jelző számmal jelölik, pl. p6 = egy 6 kD tömegű, nem ismert funkciójú fehérje.

A PR aktív formában homodimer. A PR szekvencián belül több jellegzetes régió megkülönböztethető, melyek térbeli elhelyezkedése a röntgendiffrakcióval elsőnek meghatározott Rous sarcoma virus (RSV) proteinázának (2. ábra), valamint HIV-1 és HIV-1 PR-inhibitor komplexek szerkezeteiből ismert (3-6). A konzervatív régiók közül az N-terminálishoz közel helyezkedik el az aktív centrumot kódoló katalitikus triád (-Asp-Thr/Ser-Gly-). Egy másik többé-kevésbé konzervatív régió a flexibilis "flap" régió, mely az enzim-inhibitor komplexekben rázáródik az inhibitor molekulára. Egy harmadik konzervatív régió a C-terminálishoz van közel (-Gly-Arg-Asp/Asn-), és specifikus a retrovirális proteinázokra.



2. ábra: Az RSV proteináz dimer szalagmodellje. Az egyik alegység satírozva van. Az ábra J. Richardson (7) ábrájának módosításával készült. A HIV PR szerkezete az RSV PR-hoz nagyon hasonló (5-6).

Az aktív PR által történő limitált proteolízis együtt jár az "éretlen" vírus "éretté" történő morfológiai átalakulásával, ami nélkül a retrovírusok nem fertőzőképesek, így a HIV vírus sem (8). Továbbá, újabb adatok szerint a virális proteináz szerepet játszik a vírusfertőzés korai szakaszában is, feltehetően a nukleokapszid fehérje bontásával, a reverz transzkripcióban és/vagy az integrációban (9-10). A retrovirális proteináznak a vírus életciklusában betöltött alapvető szerepei alapján felmerült annak lehetősége, hogy a HIV proteináz gátlásával gátolni lehetne a vírus szaporodását (7). Ennek következtében az elmúlt néhány évben a retrovirális proteinázokat rendkívül intenzíven vizsgálják. Ezen vizsgálatok elsősorban a PR vírus-replikációban betöltött szerepére, aktiválódásának helyére és mechanizmusára, celluláris fehérjék elhasíthatóságának lehetőségére és ennek

fiziológiás szerepére, a proteináz szabad és inhibitor-kötött formájának három dimenziós szerkezetére, az enzim működési mechanizmusára, valamint szubsztrát-specifitására koncentrálnak.

Vizsgálataink kezdetekor (1989 tavasza) még viszonylag kevés információ állt rendelkezésre a retrovirális proteinázok specifitásáról, a HIV proteináz három dimenziós szerkezete nem volt ismert, gyakorlatilag irreverzibilisnek tekinthető, aktív centrum titrálásra illetve *in vivo* gátlási kísérletekre alkalmas inhibitorok sem voltak ismertek. A természetes hasítási helyek szekvenciáját összehasonlítva várható volt, hogy a HIV proteinázok szubsztrátkötő alhelyei sokféle oldalláncot képesek befogadni, ami széles specifitású proteinázra utal (11). Ez a megfigyelés ellentmondásban van azzal, hogy az enzim csak néhány helyen hasítja a Gag és Gag-Pol poliproteineket, ami viszont nagy specifitású enzimet feltételez. Célunk volt a retrovirális proteinázok, elsősorban a HIV-1 és HIV-2 proteinázok jellemzése, azok szubsztrátspecifitásának összehasonlítása oligopeptid szubsztrátok hasítási kinetikájának vizsgálatával. Célunk volt a proteinázok szubsztrátkötő helyének kiterjedtségét vizsgálni, és meghatározni, hogy a szubsztrát hány aminosav oldalláncát képes az enzim felismerni. A proteinázok jellemzésére a továbbiakban olyan oligopeptideket használtunk, melyek ismert HIV-1 és jószolt HIV-2 Gag valamint Gag-Pol hasítási helyek szekvenciáját tartalmazták. Későbbiekben ezt a vizsgálatot kiegészítettük olyan peptidsorozatok vizsgálatával, melyben egy HIV proteináz szubsztrát szekvenciájának egy-egy aminosavját cseréltük ki, mintegy 100 újabb decapeptidet szintetizálva (úgynevezett "trial and error" módszer).

A vizsgálatokhoz *E. coli*-ban expresszált HIV-1 proteinázt használtunk, melyet többlépcsős kromatográfiával tisztítottunk. A HIV-2 proteinázt kémiai szintetizáltuk, tisztítottuk, majd aktív formába hoztuk. Oligopeptid szubsztrátokat szilárd fázisú peptid szintézissel készítettünk, reverz-fázisú HPLC-vel tisztítottuk, aminosav analízissel jellemeztük. Esetenként a peptideket szekvenáltuk illetve tömegspektrometriás analízissel meggyőződünk az oldalláncokat védő csoportok eltávolításának teljességéről. Az oligopeptidek enzimekkel történő hasításának kimutatása inkubálás után a szubsztrát és a termék csúcsok reverz fázisú HPLC-vel történő elválasztásával, a kromatográfiás csúcsok aminosav analízissel (esetenként szekvenálással) történő azonosításával, valamint mennyiségi meghatározásával történt. A kromatográfiás csúcsokat integráltuk, és az integrált értékek segítségével aktivitást számoltunk. Látszólagos kinetikai állandókat határoztunk meg, vagy a szubsztrát hasíthatóságát egy másik szubsztrát hasításának sebességéhez viszonyított relatív aktivitásként fejeztük ki. A kapott kinetikai eredményeket számítógépes modellezéssel próbáltuk értelmezni, Evans and Sutherland

PS-390 molekuláris grafikai rendszerben, FRODO program segítségével. Vizsgálatainkhoz ismert HIV-1 proteináz-inhibitor komplex kristályszerkezeteket valamint jóslott HIV-2 proteináz szerkezet (12) használtunk fel.

Egy peptidsorozat segítségével, melyben egy jó HIV proteináz szubsztrátot szisztematikusan rövidítettünk, megállapítottuk, hogy mind a HIV-1, mind a HIV-2 proteináz szubsztrátkötő helye legalább hét aminosav felismerésére képes (13). A katalitikus állandók legnagyobb csökkenését a P_4^2 illetve P_3' aminosavak eltávolításakor észleltük. A szubsztrát szükséges hossza aszimmetrikusnak adódik, több aminosav egység kell az N terminálison, mint a C terminálison. A szubsztrátkötő hely aszimmetriája a molekuláris modell alapján értelmezhető. Feltételezésünk szerint a produktív enzim-szubsztrát kölcsönhatásban a szubsztrát valamint az enzim által kialakított folytonos β -redők hidrogén-hídjai, elsősorban a "flap" régióhoz történő "kihorgonyzás" játszik fontos szerepet. Rövidebb, nem hasítható peptidek csak inproduktív kötődésre képesek (13). Mind a HIV-1 mind a HIV-2 proteináz minden olyan oligopeptidet képes volt elbontani, mely a már ismert funkcionális alegységek (pl. MA, CA, NC, PR, RT, IN, 1. ábra) közötti Gag és Gag-Pol hasítási helyek szekvenciáját tartalmazta (14). Bár a kinetikai állandók széles tartományban változtak, az esetek többségében ugyanarra a peptidre a két proteinázzal kapott kinetika hasonló volt. Ilyen peptidszekvenciákon alapuló inhibitorok mindkét enzimet hasonló mértékben képesek gátolni.

A HIV proteinázoknak még a hasítási helytől legtávolabbi, S_4 kötőhelyén lévő kölcsönhatása is jelentősen módosíthatja egy szubsztrát hasításának kinetikáját (13). Ezen az alhelyen olyan aminosav oldalláncok bekötődése eredményezett kedvező szubsztrátot, melyek előfordulása gyakori β -fordulatokban.

További vizsgálatok a HIV-1 és HIV-2 proteinázok S_3-S_3' kötőhelyével kapcsolatban újabb bizonyítékul szolgáltak ezen enzimek specifikálásának alapvető hasonlóságára (15,16). Megállapítottuk, hogy mind a hét alhelyen létrejövő enzim-szubsztrát kölcsönhatás jelentősen képes a szubsztrát hidrolízisének kinetikáját befolyásolni, azonban csak a P_2-P_2' aminosavak cseréje esetén tapasztaltunk olyan hatást, ami teljesen megakadályozta egy-egy peptid hidrolízisét. Bár a retrovirális proteináz C_2 szimmetriája alapján várható módon a megfelelő kötőhelyek (például

²A szubsztrát valamint a szubsztrátkötő alhelyek elnevezése Schechter és Berger szerint (Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967, 27:157). A szubsztrát oldalláncok a hasítási helytől az N-terminális felé haladva P_1, P_2 stb., míg a C-terminális felé haladva P_1', P_2' , stb. Az enzim megfelelő szubsztrátkötő helyeinek jelölése S-betűvel történik.

S_2 , S_2' pár) specifikitása mutat hasonlóságot, lényeges különbségeket is tapasztaltunk, ami feltehetően a szubsztrát kötődése következtében létrejövő aszimmetria következménye: bár ugyanazon oldalláncok vesznek részt a kötőhelyek felépítésében, az individuális távolságok megváltozása lényegesen módosíthatja a kölcsönhatásokat. Továbbá megállapítottuk, hogy a HIV proteinázok specifikitása nem jellemezhető úgy, mint az alhelyeken létrejövő kölcsönhatások összegeinek következménye, mivel az enzimhez kötött szubsztrát oldalláncainak intramolekuláris kölcsönhatásai jelentősen befolyásolhatják a specifikitást. Egy szubsztrát P_1' prolinjának bármilyen más aminosavra való cserélése megakadályozta a szubsztrát hidrolízisét, alátámasztva a $-Tyr(Phe)*Pro-$ hasítási helyek különlegességét: ilyen aminosavak közt celluláris enzimek nem, vagy csak kis hatékonysággal tudnak bontani.

Eredményeink alapján a HIV-1 és HIV-2 vírus proteinázainak szubsztrátspecifikitása igen hasonló, az enzim-szubsztrát kölcsönhatás alapvetően hidrofób természetű. A HIV proteinázok nagymértékű specifikitása feltehetően a kiterjedt szubsztrátzsebnek köszönhető, amihez még hozzájárul a szubsztrát oldalláncainak intramolekuláris kölcsönhatása, komplementaritása. Feltételezésünk szerint az, hogy a HIV proteinázok specifikitását egy kiterjedt szubsztrátkötő hely határozza meg, arra vezethet, hogy a retrovírusok gyors evolúciója során a viszonylag gyakran bekövetkező mutációk a szubsztrátkötő helyen nem feltétlenül változtatja meg jelentősen az enzim specifikitását, ezért a vírus szaporodása szempontjából alapvető jelentőségű fehérje hasítások bekövetkezhetnek. Ez arra enged következtetni, hogy a gyógyszerrezisztencia kifejlődésének problémája a PR-t gátló anyagok esetében kisebb lehet, mint az RT-t gátló anyagok esetén.

TÓZSÉR JÓZSEF ÉS OROSLÁN ISTVÁN

Irodalom:

1. Gallo, R.C. and Montagnier, L. (1988) AIDS in 1988. *Sci. Am.* 259: 41-48.
2. Toh, H., Ono, M., Saigo, K. and Miyata, T. (1985) Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty1. *Nature* 315: 691.
3. Navia, M.A., Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Leu, C.-T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L., Springer, J.P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337: 615-620.
4. Miller, M., Jaskólski, M., Rao, J.K.M., Leis, J. and Wlodawer, A. (1989) Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 337: 576-579.

5. Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B.K., Toth, M.V., Marshall, G.R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1989) Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* 246: 1149-1152.
6. Swain, A.L., Miller, M.M., Green, J., Rich, D.H., Schneider, J., Kent, S.B.H. and Wlodawer, A. (1990) X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate-based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8805-8809.
7. Kräusslich, H.G., Oroszlan, S. and Wimmer, E. (1989) Viral proteinases as targets for chemotherapy. *Current communication in molecular biology*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
8. Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C. Dixon, R.A., Scolnick, E.M., Sigal, I.S. (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4686-4690.
9. Roberts, M.M. and Oroszlan, S. (1989) The preparation and biochemical characterization of intact capsids of equine infectious anemia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 486-494.
10. Roberts, M.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1991) *In situ* processing of a retroviral nucleocapsid protein by the viral proteinase *Protein Eng.* 4: 695-700.
11. Oroszlan, S. and Tózsér, J. (1990). The retroviral proteinases. *Seminars Virol.* 1: 369-378.
12. Gustchina, A. and Weber, I.T. (1991) Comparative analysis of the sequences and structures of HIV-1 and HIV-2 proteases. *Proteins* 10: 325-339.
13. Tózsér, J., Gustchina, A., Weber, I.T., Bláha, I., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991). Studies on the role of the S₄ substrate binding site of HIV proteinases. *FEBS Lett.*, 279: 356-360.
14. Tózsér, J., Bláha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M. and Oroszlan, S. (1991). Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett.*, 281: 77-80.
15. Bláha, I., Nemeč, J., Tózsér, J., and Oroszlan, S. (1991). Synthesis of homologous peptides using fragment condensation: analogs of an HIV proteinase substrate. *Int. J. Pept. Protein Res.* 38: 453-458.
16. Tózsér, J., Weber, I.T., Gustchina, A., Bláha, I., Copeland, T.D., Louis, J.M. and Oroszlan, S. (1992) Kinetic and modeling studies of S₃-S₃' subsites of HIV proteinases. *Biochemistry*, 31: 4794-4800.

TUDÓSPORTRÉ

OROSZLÁN ISTVÁN

A nyolcvanas évek elején közös ismerősünk tiszteletére Washingtonban rendezett fogadáson találkoztam először Oroszlán Istvánnal. Munkacsoportjával azokban az években fedezte fel a fehérjék mirisztoilálását, ami engem roppant érdekelt. A személyes beszélgetés során legjobban két dolog ragadott meg: szokatlanul intenzív érdeklődése minden iránt ami a tudományos kutatással kapcsolatos, illetve napra kész tájékozottsága a biokémiában beleértve a hazai biokémikusok eredményeit is. A következő években az USA-ban járva hacsak tehettem meglátogattam (egyszer pl. Patthy Lacival közösen). Az információgazdag, a kutatásai háttere mögé is bepillantást engedő baráti fogadtatás Frederickben, a volt katonai kutatóbázison, a Moszkva-Washington forró drót ottani fogadóállomása mellett működő intézetben, mindig élményt jelentett számomra. Többször gondoltam rá, hogy valamilyen módon bemutassam őt a hazai biokémikus közösségnek. Elsősorban azért, mert valahogy itthon elsősorban mint virológus vált ismertté, holott valójában izzig - vérig biokémikus. Az elsők között fejlesztette ki, vezette be a fehérjeanalízis mikromódszereit és alkalmazta azokat a retrovirus biokémiában. Eredményeiket mindig követték, követik az eukarióta, emlős sejtek vizsgálatával nyert megerősítő, az övékével párhuzamot mutató biokémiai közlemények. A bemutatást az intézetünkkel kialakított kollaborációja keretében létrejött, több hosszabb beszélgetésre is alkalmat adó két hetes látogatása tette most lehetővé.

Tudományos életrajzának tömör adatai. Vegyészmérnök diploma 1950-ben Budapesten. Ezt követően négy évig az MTA tihanyi biológiai kutatóintézetében mikrobiológiával, majd két évig a soproni intézetében talajbakterológiával foglalkozik. 1956-tól dolgozik az USA-ban, ahol az USA Tudományos Akadémia, illetve az NIH ösztöndíjával szerez 1960-ban Ph.D.-t biokémiai farmakológiából a Georgetown egyetemen Washingtonban. Ezt követően Bethesdában (NIH, NCI), majd 1963-66 között Philadelphiában kezd tumorvirológiával foglalkozni, amit a George Washington Orvostudományi Egyetemen folytat 1968-ig. 1968-76 között a Flow Laboratories immunkémiai szekcióját vezeti. Az általa vezetett csoport 1976-ban kerül át az NCI biológiai karcinogenezis programjába és költözik Frederickbe, ahol a karcinogenezis program megbízott igazgatója 1982-83-ban, majd attól kezdve és jelenleg is a Molekuláris Virologia and Carcinogenesis laboratórium igazgatója. Több nagy nemzetközi konferencia szervezője (a legutóbbi: "Viral Proteases as Targets for Chemotherapy" Cold Spring Harbor, 1989), több tucat szekcióelnöki felkérést kap, meghívott előadó szerte a világban beleértve a méltán híressé vált Gordon és UCLA szimpóziumokat. Tagja az NCI AIDS Task Force-nak, az International Committee on Taxonomy of Viruses Retrovirus Study Group-nak.

Következzen itt az amerikai CV-k elengedhetetlen rovata, amit az alábbiakban közvetlenül veszek át:

"EXPERIENCE

Active research since 1962 in the retrovirus field including protein and immunochemistry, biochemistry, molecular biology as well as virus cell interactions. Purification and antigenic characterization of retroviral proteins,

epitope mapping. Developed microtechniques for protein analysis and established the most extensive library of retroviral protein sequences. Discovered myristoylation, a novel posttranslational modification of retroviral proteins as well as novel glycosylation pathways. Pioneered studies on the biosynthetic mechanism involved in the synthesis of retroviral polyproteins by translational termination suppression, inframe readthrough and frameshift. Identified the retroviral gene that encodes the viral aspartic protease and extensively studied the biochemistry of this enzyme essential for virus replication. Identified targets for therapy of virus infection. Currently studying various inhibitors of HIV replication. Experience in directing research since 1976 at the section head level and since 1968 as director of research laboratory composed of three sections and a total of 30 personnel."

Együtt lapozgatjuk a közleménylistát; 268 publikáció. A tudományos életút kockakövei. Gyors számítást kezdek megkísérelve a nálunk most oly divatos impakt faktorok összegével jellemezni az összteljesítményt - 1000-nél abbahagyom. Sokkal izgalmasabbak azok az információk, amelyek ott vannak mindegyik mögött. Némelyikük tudománytörténeti kuriózum. Hadd álljon itt néhány, ami talán a legfontosabb közleményekhez kapcsolódik.

"My involvement in retroviral research began in the early 1960s when leukemia viruses were isolated in a rapid fashion from the mouse and other mammalian species but monospecific immunological reagents were not available for identification. For developing such reagents purified virus and purified subviral components (proteins) were needed. I introduced physicochemical techniques such as density gradient centrifugation, first in sucrose then polymeric synthetic carbohydrates such as polyglucose and polysucrose (Ficoll) for separating and purifying viruses from animal plasma and/or tissue culture fluids allowing good recovery of infectivity."

Oroszlan, S., Rizvi, S., O'Connor, T.E. and P.T.Mora. (1964) Use of synthetic polyglucose for density gradient centrifugation of viruses. Nature 202; 780-781.

Oroszlan, S., L.W.Johns Jr., and M.A.Rich. (1965) Ultracentrifugation of a murine leukemia virus in polymer density reagents. Virology 26:638-645"

"For the purification of the viral structural proteins (both envelope and core proteins) I initially used isoelectric focusing. The antibodies produced against the purified virus and its protein components provided valuable reagents to be used in various immunochemical techniques. Such reagents allowed, for the first time, the differentiation of these viruses (in the electron microscope they looked alike) and established their phylogenetic relatedness. They served to detect cross-reactive and species specific viral antigens (antigenic determinants) and allowed the detection of cellular protein components distinguishing between those which were simply copurifying with the virus and those which formed an integral part of the viral envelope. I described first the phenomenon of immune virolysis and antibody synergism in the detection of cross-reactive antigens."

Oroszlan, S. and R.V.Gilden (1970) Immune virolysis: Effect of antibody and complement on C-type RNA virus. Science 168: 1468-1490.

Oroszlan, S., R.J.Huebner and R.V.Gilden (1971) Species-specific and interspecific antigenic determinants associated with the structural protein of feline C-type virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 901-904.

Oroszlan, S., D.Bova, R.Toni and R.V.Gilden (1972) Interactions of immunoglobulins G and M in the

detection of the mammalian C-type virus cross-reactive antigen. Science 176, 420-422.

"The antisera produced in my laboratory became widely used reagents in other laboratories not only in the USA but throughout the world. They served to identify new virus isolates."

Hampar, B., G.J.Kelloff, L.M.Martos, S.Oroszlan et al. (1970) Replication of murine and feline RNA-containing C-type viruses in human lymphoblastoid cells. Nature, 228, 857-858.

McAllister, R.M., M.Nicolson, M.B.Gardner, R.W.Rongey, S.Rasheed, P.S.Sarma, R.J.Huebner, M.Hatanaka, S.Oroszlan et al. (1972) Nature, New Biol. 235, 3-6.

Klement, V., M.O.Nicolson, R.V.Gilden, S.Oroszlan et al. (1972) Rat C-type virus induced in rat sarcoma cells by 5-bromodeoxyuridine. Nature, New Biol. 238, 234-237.

"The initial immunochemical studies were followed by the introduction of microanalytical techniques for protein characterization including amino acid microsequencing "

Oroszlan, S., T.Copeland, M.R.Summers and R.V.Gilden (1973) Feline leukemia and Rd-114 virus group-specific proteins: Comparison of amino terminal sequence. Science 181, 454-456.

Summers, M.R., G.W.Smythers and S.Oroszlan (1973) Thin-layer chromatography of sub-nanomole amounts of phenylthiohydantoin (PTH) amino acids on polyamide sheets. Anal. Biochem. 53, 624-628.

"The primary structure analysis of the structural proteins of retroviruses provided evidence for their definitive genetic relatedness which could not be detected by nucleic acid hybridization and immunological methods. Viruses apparently unrelated by the above criteria, were found to have statistically significant sequence homology, allowing the suggestion that these contemporary viral proteins may have originated from a common progenitor. Chemical analysis and direct sequence determination of viral genes or gene products provided the basis for quantitative estimate of relatedness and allowed comparison at the level less stringent and therefore more sensitive than that afforded by immunologic means. The protein sequence data often provided guidance for DNA sequencing."

"Up to recently it was not clear how the Gag-Pol fusion proteins of retroviruses are synthesized. Although a translational control mechanism governing the synthesis was suggested in the late 1970s, an obvious alternative was the presence of a distinct gag-pol mRNA from which the termination codon in the viral genome had been removed by splicing. Retrovirologists were divided between the above two different views, but the majority of those concerned favored splicing. A seminal observation was made in my laboratory in 1985 that clarified the situation. We reported the purification and N-terminal amino acid sequence of the protease of a murine leukemia virus."

Yoshinaka, Y., I.Katoh, T.D.Copeland and S.Oroszlan (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber terminal codon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1618-1622.

"When the protein sequence was compared with the proviral DNA sequence reported by another laboratory, we found that the first four residues represented the last four codons of the gag gene. They were followed by a glutamine residue then by the amino acids encoded at the 5' end of the pol gene. The protein sequence clearly showed that the protease (PR) as well as the reverse transcriptase (RT) and integrase (IN), are synthesized by translation of the genome-size mRNA containing the UAG termination codon present in the

genome, and not by a spliced mRNA lacking this codon, and that the amber codon is suppressed in vivo by a glutamine tRNA. This important discovery was characterized by Harold Varmus as being the one that "turned all eyes back to translation control". Our initial report was followed by a series of studies in several laboratories and it is now known that all retroviruses utilize translational suppression for the synthesis of replication enzymes RT, IN as well as PR. However, inframe readthrough takes place only in the mammalian type-C retroviruses. All others in which the *gag* and *pol* genes are out of phase, ribosomal frameshifting is required. Human immunodeficiency viruses (HIV) for example use a frameshift while mouse mammary tumor virus and human T-cell leukemia virus (in these viruses the *gag* and *pol* genes do not overlap like in HIV but are separated by an open reading frame, the protease *pro* gene) use ribosomal frameshifting twice for the synthesis of full size *Gag-Pro-Pol* polyproteins."

Hatfield, D.L., J.G.Levine, A Rein, and S.Oroszlan (1992) Translational suppression in retroviral gene expression. In: Advances in Virus Research (K. Maramorosch, F. Murphy, A. Shatkin, eds.), Vol. 41, pp. 193-239, Academic Press, Inc., Orlando, FL.

"Thus retroviruses have evolved a remarkable mechanism previously unknown in eukaryotes for the expression of the genomic sequences encoding the enzymes which are needed only in catalytic amounts. The best means of unequivocally demonstrating ribosomal frameshifting and determining accurately the frameshift site is to sequence the transframe protein (i.e. the protein that spans the overlapping reading frame) and compare to the corresponding RNA (template) sequence. Such studies were done in my laboratory first."

Hizi, A., L.E.Henderson, T.D.Copeland, R.C.Sowder, C.V.Hixson and S.Oroszlan (1987) Characterization of mouse mammary tumor virus gag-pro gene products and the ribosomal frameshift site by protein sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7041-7045.

"N-terminal myristoylation, a novel posttranslational modification of retroviral *Gag* proteins, was also discovered in my laboratory in 1982"

Henderson, L.E., H.C.Krutzsch and S.Oroszlan (1983) Myristyl amino terminal acylation of retrovirus proteins: An unusual post-translational protein modification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 339-343.

"Since then it has been extensively characterized structurally, enzymologically and functionally and turned to be functionally important in many cellular proteins including protein kinases and oncogenic transforming proteins."

Schultz, A.M., L.E.Henderson and S.Oroszlan (1988) Fatty acylation of proteins. Annu. Rev. Cell Biol. 4, 611-647.

"Our extensive protein chemical studies also led to the discovery of novel glycosylation pathways of the envelope protein of avian reticuloendotheliosis which we found to be modified by unusually large sialic acid complex-type carbohydrate moieties and that chloroquine profoundly affected glycosylation of the surface glycoprotein. On extension of these studies we have also found that chloroquine inhibits the production of infectious HIV-1 most likely by interfering with terminal glycosylation in the trans-Golgi network and thus affecting the exocytic pathways"

Tsai, W.P. and S.Oroszlan (1988) Novel glycosylation pathways of retroviral envelope proteins identified with avian reticuloendotheliosis virus. J.Virol. 62, 3167-3174.

Tsai, W.P., P.L.Nara, H.F.Kung, and S.Oroszlan (1990) Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. AIDS Res. Hum. Retroviruses 6,481-486.

"The first evidence for the existence of proteolysis in retroviral *Gag* polyprotein processing came in the mid-1970s from pulse-chase radioactive labeling studies with avian myeloblastosis virus-infected chick embryo fibroblasts. Similar immunoprecipitation studies with murine leukemia viruses showed the presence of a Pr65*gag* polyprotein precursor which was then cleaved into the *Gag* structural proteins. These early studies carried out in various laboratories suggested the involvement of a proteinase. Furthermore, we found identical N-terminal amino acid sequences in the capsid proteins of several murine viruses and that proline was the invariant N-terminus also of retroviruses derived from other mammalian species. These findings suggested that the retroviral proteinases have a high degree of specificity."

Oroszlan, S. et al. (1975) Amino acid sequence homology of mammalian type C RNA virus major internal proteins. J. Biol. Chem. 250, 6232-6239.

Oroszlan, S. et al. (1978) Amino- and carboxy-terminal amino acid sequences of proteins coded by gag gene of murine leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1404-1408.

Oroszlan et. al. (1979) Amino-terminal sequence of bovine leukemia virus major internal protein: Homology with mammalian type C virus p30 structural proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2996-3000.

"A puzzle that arose, however, was the finding that although the avian proteinase appeared to be an abundant virion protein encoded in *gag* gene, this was not the case for the murine proteinase. It was not until several years later when the proteinase was sequenced in my laboratory that this dilemma was resolved. The murine proteinase was found not to be encoded by *gag* but by the *gag-pol* and its synthesis occurred through the repression of the amber termination codon found at the end of the *gag* gene (see above). The observation that the cleavage occurred at the peptide bond at the imino function of proline also suggested a virally encoded proteinase since cellular proteinases were not known to be capable of efficiently hydrolysing such peptide bonds. Genetic studies made possible by the knowledge of the precise location of the proteinase gene in the retroviral genome and that of its primary structure proved that the proteinase is essential for the production of infectious progeny virus. This suggested that the PR is a potential target for therapy of virus infection. With the discovery of human immunodeficiency virus (HIV) as the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) studies on the proteinase have been accelerated and culminated in the determination of the three dimensional structure. This now allows rationale drug design and the development of proteinase inhibitors as potent antiviral agents useful in combatting AIDS."

Oroszlan, S. (1989) Biosynthesis and proteolytic processing of retroviral proteins: An overview. In: Current Communications in Molecular Biology: Viral Proteinases as Target for Chemotherapy. (H.G. Krausslich, S.Oroszlan and E.Wimmer, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, NY, pp.211-224

"In closing I would like to say the retroviral research is a very competitive field. Competition ensures the advancement of science. A healthy competition accompanied by collaboration and cooperation makes possible even a greater and faster progress which is required for achieving our common goal in biomedical research, that is eradication of disease."

PREDICTION AND RECOGNITION OF ANTIGENIC DETERMINANTS



*of the 8th International Congress of Immunology
Budapest, Hungary, August 29-31, 1992*

1992 augusztus 29-én reggel 26 országból 104 regisztrált résztvevő gyűlt össze Budapesten a Normafa melletti Agro Szállodában, hogy - a belvárosi kánikulához képest hűvösebb (30^o C) időben - áttekintse azokat a legújabb eredményeket, amelyek a fehérje típusú antigének szerkezetével és az immunrendszerrel való kölcsönhatásával kapcsolatosak. Ezzel a Szervező Bizottság előkészítő munkája lezárult.

Előzmények

1990 nyarán vetődött fel a gondolat, hogy egy olyan konferenciát szervezzünk, amely az Immunologus Világkongresszushoz kapcsolódva fórumot biztosít peptidkémikusok, fehérjekutató biokémikusok, biofizikusok, immunológusok - elméleti és experimentális eszközökkel dolgozó szakemberek - számára, hogy e valóban interdiszciplináris területen elért eredményeiket közzétegyék és kötetlen formában azokat megvitassák. Reméltük, hogy e sokféleség intellektuális kihívást jelent és ezáltal vonzó lesz a mind a felkért előadók, mind pedig a poszterrel bemutatkozó résztvevők számára. A Szervező Bizottság hamar összeállt, tagjai voltak: Kajtár Márton, Hollósi Miklós [ELTE Szerves Kémiai Tanszék], Löw Miklós [Richter Gedeon RT], Rajnavölgyi Éva [ELTE Immunológia Tanszék], Penke Botond, Tóth Gábor [SZOTE Orvosi Vegytani Intézet], Simon István [MTA Enzimológiai Intézet], valamint e sorok írója az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjából. Felkérésünkre Harold S. Scheraga [Cornell University, Ithaca, USA] elvállalta a Bizottság elnöki tisztjét. Társelnökünk előbb Kajtár Márton, majd Löw Miklós lett. A Nemzetközi Tanácsadó Testület tagjai - minket is meglepő módon - örömmel vállalták a tagságot és hasznos tanácsaikkal segítették munkánkat. Köztük voltak fehérje predikcióval foglalkozók : P. Argos [Heidelberg, Németország], G.D.Fasman [Waltham, USA], teoretikusok G.D.Rose [Chapel Hill, USA], A.V.Finkelstein, [Puschino, Oroszország], B- illetve T-sejt epitopokkal foglalkozó peptidkémikusok, immunológusok M.V.H. Van Regenmortel [Strasbourg, Franciaország], H.M. Geysen [Clayton, Ausztrália], J.B.Rothbard [Palo Alto, USA], J.A.Berzofsky [Bethesda, USA], valamint az antigéndetermináns kutatás eredményeit a tumordiagnosztikában és terápiában alkalmazó laboratóriumok vezetői R.W.Baldwin [Nottingham, Anglia], A.W. Burgess [Melbourne, Ausztrália].

A konferencia szervezésének gondolata támogatást kapott az MTA Peptidkémiai

Munkabizottságától, az ELTE Kémiai Tanszékcsoportjától, valamint egyike lett az Európai Peptid Társaság által hivatalosan is szponzorált konferenciáknak. Nagy segítséget jelentett, hogy a magyar gyógyszergyárak [Richter Gedeon RT, Chinoin] és külföldi cégek [Applied Biosystem, Behring] mellett az OMFB - pályázattal elnyert - anyagi hozzájárulására is számíthattunk.

A konferencia

A konferencián 5 témakörben 25 előadás hangzott el és 44 poszter került bemutatásra. Az előadókat a Szervező Bizottság hívta meg, míg poszterek benyújtására minden résztvevőnek lehetősége nyílt.

Az első ülészak a fehérjék konformációjával és térszerkezetük kialakulásával foglalkozott [**“Protein conformation - protein folding”**]. A bevezető előadásban H.A.Scheraga, majd ez követően Némethy György [Mount Sinai School of Medicine, New York, USA] áttekintést adtak arról hogy, milyen új molekula mechanikai és dinamikai metodikákat fejlesztettek ki az elmúlt években és ezek segítségével milyen új eredményeket értek el a polipeptidek és fehérjék termodinamikailag legkedvezőbb konformerjeinek elméleti számítások útján történő meghatározásában. Az előadások másik csoportja a fehérjeszerkezet kísérletes vizsgálatának hagyományos és új irányzatait képviselte. R.S. Hodges [University of Alberta, Edmonton, Kanada] bemutatta, hogyan lehet NMR és CD spektroszkópiával amfipatikus α -hélixek kölcsönhatását vizsgálni, s az eredményeket a fehérjék bizonyos másodlagos szerkezeti elemeinek tervezésére (*“de novo design”*) felhasználni. Két másik előadás azt elemezte, hogy a fenti szerkezetvizsgáló módszerek kombinált alkalmazásával (CD spektroszkópia ,FT-IR és NMR) milyen eredményességgel lehet fehérje részletek, epitóp peptidek (Hollósi Miklós, ELTE) vagy nagy affinitású IgE receptor strukturák (W.A.Gibbons, London University, London, Anglia) egyes térszerkezeti elemeit (pl. β -kanyar, β -réteg) kimutatni. Egy új, izgalmas - az előbbiektől eltérő, harmadik - irányzatot képviselt L.M.Gregoret [MIT, Cambridge, USA], aki bebizonyította, hogy a negyedleges szerkezet stabilitásának primer strukturában rejlő feltételeit, *“megengedett és tiltott”* aminosavcserék előidézésével, molekuláris biológia módszerrel (*“multiple mutation”*) tisztázni lehet.

A délutáni, második szekció a fehérje térszerkezet egyes elemeinek predikciójával foglalkozott [“**Protein structure prediction**”]. Az előadók egyik csoportja abból indult ki, hogy molekula modellezéssel, számításokkal a primer struktúra ismeretében meghatározható a lokálisan termodinamikailag legkedvezőbb szerkezeti részlet [A.V.Finkelstein, Institute of Protein Research, Puschino, Oroszország], amely azután kísérletileg is igazolható módon hozható összefüggésbe valamilyen domináns másodlagos szerkezeti elemmel [S.J.Wodak, Université Libre de Bruxelles, Belgium]. Egy másik megközelítést tükrözött Simon István [MTA Enzimológia Intézet, Budapest], valamint Pongor Sándor [ICGEB, Trieste, Italy és Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő] előadása: az ismert aminosav szekvenciájú fehérjék adatbázisának statisztikai elemzése alkalmas lehet olyan módszerek kifejlesztésére, amelyek bizonyos térszerkezettel összefüggő sajátságok (pl. domén határ, diszulfid-hid) előrejelzésére és jellegzetes, funkcionális szempontból is érdekes motívumok, mintázatok jelenlétének kimutatására használhatók. A statisztikai és a molekula dinamikai módszerek együttes alkalmazásával a predikció hatékonysága tovább javítható (J. Garnier, INRA, Jouy en Josas, Franciaország).

.A szerkezet - predikció lehetőségeinek áttekintése után, a harmadik témakör azt vizsgálta, milyen eredményeket hozott a 10 évvel ezelőtt felvetett és ma is igen népszerű kutatási terület, az antigéndetermináns funkcióval bíró fehérjeszakaszok predikciója [“**Epitope prediction**”]. A résztvevők élvezetes előadásokat hallhattak, amelyek közül kiemelkedett M.H.V.Van Regenmortel [Institut de Biologie Moléculaire, Strasbourg, Franciaország], aki kritikusan elemezte e módszerek előnyeit és hátrányait [lásd még Van Regenmortel, M.H.V. In: Structure of Antigens Vol.I. CRC Press. pp.1-27, 1992] külön hangsúlyozva a metodika-kombinációk fontosságát. Saját, 1982-ben publikált eljárásának kedvező tapasztalait osztotta meg hallgatóságával T.P. Hopp [Protein Research Laboratories, San Diego, USA]. Egy konkrét példán keresztül pedig megismerhettük tényleges milyen szerepet játszanak ezen algoritmusok egyes humán papilloma vírusfehérjék epitopszerkezetének feltárásában (J.Novak, Inst. Hematology, Prague).

A fehérjéket az első három témakör strukturális oldalról közelítette, ezzel szemben a negyedik [“**Recognition of B-cell epitopes**”] és ötödik [“**Recognition of T-cell epitopes**”] szekcióülés - önkéntelenül is alapozva az előbbiekre - a funkcionalitás aspektusából vizsgálta a protein típusu antigéneket, azok epitopjait.

Ezek az előadások jól demonstrálták, hogy az immunológia, de talán a molekuláris biológia egyik "legforróbb" kutatási területére érkeztünk.

A B-sejt epitopok gyors, hatékony azonosításáról hallhattunk beszámolókat a "tühegy" technológia (több tíz peptid egyidejű szintézise műanyag pálcikákon) felfedezőjétől [H.M.Geysen, Chiron Mimotopes, Clayton, Ausztrália] és a "peptid-könyvtár" módszer egyik kidolgozójától [R.A.Houghten, Torrey Pines Inst., San Diego, USA]. Későbbi előadások meggyőzően bizonyították, hogy e technikák mekkora segítséget jelentenek szintetikus vakcinák tervezésében [A.Tartar, Institut Pasteur, Lille, Franciaország] vagy tumordiagnosztikai szempontból is fontos mucinok epitopszerkezetének felderítésében [M.R.Price, University of Nottingham, Nottingham, Anglia]. Az ellenanyag - B-sejt epitóp kölcsönhatás termodinamikai, szerkezeti és kinetikai feltételeiről alkothattak képet a résztvevők C.H. Chothia [MRC, Cambridge, Anglia] és I.A. Wilson [The Scripps Research Institute, La Jolla, USA] - diákban is színes - előadásai után.

A viszonylag jobban ismert B-sejt epitop felismerési folyamatok mellett nagy érdeklődés előzte meg a T-sejt epitopokkal kapcsolatos előadásokat. Nem hiába hiszen J.B.Rothbard [ImmunoLogic, Palo Alto, USA], A.Sette [Cytel, San Diego, USA], J.A. Berzofsky [National Cancer Institute, Bethesda, USA] az e téren vezető és egymással is versengő amerikai kutatócsoportokat képviselték. A fehérjék T-sejt felismeréséhez szükséges feldarabolódás és az epitopfelismerés szerkezeti feltételeit részletesen tárgyaló beszámolókból kirajzolódott mit is tudunk 1992 nyarán az MHC - peptid epitop kölcsönhatásról. Egy-egy alkalmasan megválasztott modell felhasználásával bepillantást nyerhettünk az európai eredményekbe is. A.Van Pel [Ludwig Institute for Cancer Reserach, Brussels] egy tumor-rendszeren ("tumor rejection antigen"), Rajnavölgyi Éva [ELTE, Immunológiai Tanszék, Göd] pedig az influenza vírus hemagglutininen végzett kísérleteiről beszélt.

A poszterek esti diszkussziója, valamint az előadásokat követő viták légköre kezdettől fogva arra inspirálta a különböző szakterületek művelőit, meghívott előadókat és fizető résztvevőket egyaránt, hogy jelen legyenek, kérdezzenek, mondják el véleményüket még akkor is ha korábban "nem volt dolguk egymással".

A tudományos program a harmadik nap délutánján kiegészült egy - szükkörű - kerekasztal beszélgetéssel. Ennek célja az volt, hogy a témában érdekelt magyar

és amerikai kutatók kicsit részletesebben is megismerjék egymás eredményeit. Itt hangzottak el összefoglalók peptid könyvtárak előállításáról, biológiai teszteléséről [Furka Árpád, ELTE Szerves Kémia], T-sejt epitopok szintéziséről és vizsgálatáról [Tóth Gábor, SZOTE Orvosi Vegytani Intézet], oxazonon tartalmú mesterséges antigén modellvegyületek tervezéséről, konformáció analíziséről [Hudecz Ferenc, MTA Peptidkémiai Kutatócsoport], valamint peptid könyvtárak [C. Pinilla, Torrey Pines Inst., San Diego] és fág könyvtárak [J. Scott, The Scripps Research Institute, La Jolla], felhasználásáról az antigéndetermináns strukturák felderítésében. A vitában megszólaltak Löw Miklós, Hollósi Miklós, Rajnavölgyi Éva, R.A.Houghten, I.A. Wilson, J.Appel és R.S.Hodges. A peptidok immunfelismerésével foglalkozó ülés lebonyolítását az tette lehetővé, hogy a Magyar-Amerikai Közös Kutatási Alap elfogadta R.A.Houghten-nel közösen készített pályázatomat, ami fedezetet biztosított a felmerült költségekre. [Project No. 124/91 Hungarian Science and Technology Joint Fund in cooperation with U.S. Department of Health and Human Services and Hungarian Ministry of Welfare.]

Utószó

A konferencia - a jelenlevők észrevételei, utolag küldött levei és a szervezők megítélése alapján - úgy tűnik betöltötte funkcióját: valódi fórumot biztosított a tudomány különböző bugyraiban dolgozó kutatók számára. Szellemi és anyagi sikeressége köszönhető mindazoknak a kollégáknak, akik ipari, akadémiai vagy egyetemi kutatóhelyen dolgozva, fáradtságot nem kimélve igazi team-et hoztak létre e közel két év alatt, azoknak akik a szervezés során elsősorban az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában és az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén technikai segítséget nyújtottak, valamint az Intercongress fáradhatatlan munkatársának, Benyhe Ildikónak.

1992. október

Hudecz Ferenc
(Hudecz Ferenc)
a Szervező Bizottság
titkára

IN MEMORIAM

Dr. Székessy Vilmosné dr. Hermann Vilma

a Szeemmelweis Orvostudományi Egyetem nyug. tanszékvezető
egyetemi tanára

(1910-1992)

Nagy gyász érte a magyar biokémikus társadalmat dr.Székessy Vilmosné dr.Hermann Vilma. a Szeemmelweis Orvostudományi egyetem nyugalmazott tanszékvezető professzora halálával. Ő volt az, aki kialakította az orvostanhallgatók elméleti és gyakorlati biokémiai oktatását. Orvostanhallgatók százai, ezrei kerültek ki a 'keze alól', hiszen míg tanszékvezető volt, nagyrészt ő vizsgáltatta a hallgatókat. Pályafutásáról - nálam avatottabban - Somogyi János professzor, ugyancsak egykori munkatársa emlékezik meg az Orvosi hetilap hasábjain; ezért e helyen csak néhány gondolattal szeretném jellemezni személyiségét. Azokkal a gondolatokkal, amelyek akkor tolultak fel bennem, amikor ott álltunk megrendülten Professzorasszony ravatalánál, mi, volt munkatársai, tanítványai, akiket ő indított el pályánkon. Ha nem is maradtunk mindnyájan az Alma Mater tagjai, azt hiszem, egyikünknek sem jutott soha eszébe megtagadni a közös iskolát. Mert akik elmentek, azok is vittek magukkal valamit, ami Tőle származott, ami az Ő szellemiségéből, példájából eredt.

Akik csak felületesen ismerték, hajlamosak voltak tulságosan szigorúnak, túl puritánnak tartani. Mi, akik jobban ismertük, tudtuk, hogy ez a rá olyan jellemző igényesség megnyilvánulása volt. Senkit nem ismertem rajta kívül, aki ilyen mértékben élt volna az önmagával szembeni igényességgel. Igényes volt mint oktató és igényes volt mint kutató. Ezt az igényességet várta el tőlünk is, ezt igyekezett bennünk felkelteni, még akkor is, ha jellegzetes mosolyával el is nézte kisebb-nagyobb tévedésünket, hibáinkat, olyanokat, amelyeket önmagának nem nézett el. Minden munka, amelyet kiadott a kezéből, magán viselte ennek az igényességnek a nyomát és ha valamit feltétlenül meg kell őriznünk az Ő szellemi hagyatékából, akkor ez az, hogy

soha, semmilyen körülmények között nem válhatunk igénytelenné mindennapi dolgainkban, oktatói és kutatói munkánkban.

Szellemi örökségének másik jellegzetes vonása az a szemlélet, hogy a tudományban mindennek megvan az előzménye és erről az előzményről nem tudni vagy megfeledkezni róla - megengedhetetlen. A szakirodalomban való jártasság, más szóval az olvasottság egyaránt kötelessége a kutatónak és az oktatónak. Más kérdés, hogy az irodalomban való tájékozottságnak az a mértéke és az a hallatlan emlékezőképesség, amely a Professzorasszony sajátja volt, egyszerűen utánózhatatlan és mindenkor bámulatunk tárgya volt. Az idők folyamán sok mindent elfelejtettünk és elfogunk felejtetni, amit Tőle tanultunk, hiszen a tudás is megkopik, emlékezetünk romlik. Ennek a két alapvető, szemléletünket meghatározó vonásnak azonban nem szabad belőlünk eltűnnie, ezt kötelességünk megőrizni és tovább adni. Csak így mondhatjuk el, hogy Professzorasszony méltó tanítványai voltunk. Mert pályánkat Nála kezdtük, nem is fejezhetjük tehát nélküle.

Dr. Katona György

FEBS Laboratory Course **"Techniques in Cell Biology"**

June 14-22, 1993, Institute of Medical Biochemistry
and Danish Centre for Human Genome Research,
Aarhus University, Aarhus, Denmark

Applications should be sent to Prof. J.E. Celis, Institute of Medical Biochemistry and Danish Centre for Human Genome Research, Building 170, Aarhus University, DK-8000 Aarhus C, Denmark, not later than **April 1st, 1993**. Applications should contain a short curriculum vitae. There is no special application form. A total of 22 FEBS fellowships to cover travelling and living expenses will be available to scientists under the age of 31 that are members of a national biochemical society.



Immár harmadszor tudósítok a FEBS Council éves üléséről, csokorba gyűjtve azon információkat, amelyek a tagság érdeklődésére számíthatnak. Az 1992. évi tanácsülésre Dublinban, a 21. FEBS Kongresszushoz kapcsolódóan került sor. A Kongresszussal e számban külön cikk foglalkozik, e helyen csak a Szövetség egyéb dolgairól szólok. Annyit azért el kell, hogy meséljek: Dublinban sokan mondták - úgy érzem, nem pusztán udvariasságból - hogy bizony, a budapesti összejövetel sokkal különb volt! E jóleső dicséret értékét csökkenti, hogy Dublinba kevesen jöttek el és azok sem voltak elragadtatva attól, amit kaptak. A 400 éves fennállását ünneplő Trinity College-ban a FEBS Meeting szinte észrevétlenül zajlott, résztvevői ugyanis elvesztek a campust előzőnlő turisták tömegében. A gyér részvétel fő oka az ir kollégák késedelmes szervezése volt: a tagesyesületek az első és második értesítést későn, vagy egyáltalán meg se kapták. Az Ex. Comm. ülésén ezt - szokatlanul élesen - a rendezők szemére is hányták, hiszen egy ilyen kongresszuson a házigazdák mellett a FEBS presztizse is kockán forog. (Hozzáteszem: a záróülésen már mindenki sikerről beszélt. Ami részben igaz is: az irek minden tőlük telhetőt megtettek, voltak jó tudományos szekciók, lóverseny, és anyagilag is éppen megúszták.)

1. A FEBS anyagi helyzete

A tavalyinál is nagyobb örömmel jelenthetem, hogy a FEBS évi nyeresége továbbra is meredeken nő: a tiszta (elkölthető) nyereség 1990-ben 870 eDM volt, 1991-ben 152 eDM! Ennek forrása a EJB és FEBS Letters-ből származó bevétel. A kedvező anyagi helyzet az eddiginél még szélesebb ösztöndíj programot tesz lehetővé.

2. FEBS ösztöndíjak - A "FEBS Fellows Follow-up Research Fund"

Az eddigi rövid- és hosszútávú ösztöndíjakra fordítható keret 200 eDM-val való megemlése mellett, a Council jóváhagyta azt az új programot, amelyet "FEBS Fellows Follow-up Research Fund"-nak (röviden: FURF) neveztünk el. Az erre vonatkozó javaslatot 1991 decemberében tettem meg. Lényege az, hogy a FEBS-ösztöndíjasok hazatérésükkor folyamodhatnak a FEBS-hez némi anyagi támogatásért hazai munkájukhoz, az elsajátított módszerek, stb. meghonosítását elősegítendő (irányszám: 5-10 eDM/fő). E támogatást a rászoruló kutatóhelyek tagjai kapják, értelemszerűen a közép-keleteurópaiak. A részletek kidolgozása még 1992-ben megtörténik, a támogatás a jövő évtől folyósítható. Ezután tehát még érdekesebb lesz FEBS-ösztöndíjat pályázni, hiszen "hozomány" is jár vele. (Amint a részletek tisztázódnak, a tagságot tájékoztatjuk.)

3. FEBS Letters Newspaper Edition

Sokak kezébe eljuthatott a FEBS Letters ujságkiadása, amely a folyóiratban megjelenő review-kat és az összes cikk összefoglalóját hozta le. E kiadvány célja kettős volt: egyrészt üzletpolitikai, növelni a FEBS Letters "látottságát" és így az előfizetők számát, elsősorban az északamerikai kontinensen, másrészt eljuttatni az információ lényegét oda, ahol a drága folyóiratot nem tudják megfizetni. Fél éven át ingyen küldték az újságot; nálunk a biokémiai jellegű intézmények kaptak egy-egy köteget belső szétosztásra. Az 1991. szeptemberi számban kérdőív jelent meg, amely elsősorban azt firtatta, hogy az olvasó igényli-e a lapot egyáltalán, ha igen, hajlandó-e érte fizetni és mennyit? (A Kelet-Európába küldött kérdőiveken fizetségről nem esett szó.) A válasz kiábrándító volt. Az amerikaiak (1870 válaszadó) 90 %-a szívesen venné az újságot ingyen, fizetni csak 40 % volna hajlandó és nem többet, mint 30 USD-t évente. Térségünkben pedig...nos, a volt Szovjetunió, volt NDK, Lengyelország, Magyarország és Románia mintegy 4500 példányt kapott számonként (házánkra ebből 600 jutott); mindebből visszajött 19 válasz (tőlünk 5)... A felmérést végző Elsevier ezt így kommentálta: "Perhaps it is too soon to expect a high response given the relatively short period of time the East European scientists have been receiving the newspaper, coupled with logistics in these countries." Az érdektelenség láttán a FEBS e kezdeményezéssel felhagyott.

4. A SARS-akció kiterjesztése

A Peter Campbell (London) által kezdeményezett Scientific Apparatus Recycling Scheme egyre nagyobb méreteket ölt. Mint ismeretes, ennek keretében Nagy-Britanniából (s a jövőben feltehetően más nyugati országokból is) használt, de még üzemképes műszereket ajándékoznak Közép-Kelet Európának, elsősorban az egyetemi biokémiai intézeteknek. Eddig Magyarország és Lengyelország volt a kedvezményezett (1992-ben több, mint 30 műszert osztott szét Egyesületünk az igénylők között), most a kört kiterjesztik Romániára, Cseh-Szlovákiára, Litvániára és Lettországra, továbbá a küldemények könyveket (folyóiratokat) is fognak tartalmazni.

5. A FEBS tagországok száma növekszik

A Balti államok mellett, immár Szlovénia és Horvátország Biokémiai Társaságai is teljes jogú tagjai a Szövetségnek. (Jugoszlávia tagsága viszont megszűnt.) A taglétszám várhatóan tovább nő a korábbi birodalom fragmentálódása következtében. Az Orosz Biokémiai Társaság csupán megfigyelőként és közvetítőként vett részt a dublini Council ülésén; a tagságot folyamodnia kell, akárcsak az ukrán, bjelorusz, stb. társaságoknak. Az Albán Biokémiai Társaság is hirt adott magáról: megfigyelőt kívánt küldeni Dublinba és ehhez támogatást

kért. Az Ex. Comm. - kivételesen - minden költséget vállalt, ám Dr. Spartak Bozo nem tűnt fel Irországban.

6. Az IUBMB-hez való kapcsolódás kérdése

Tavaly beszámoltam már arról, hogy a Világszervezet (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) valamilyen módon magához, illetve maga alá kívánja kapcsolni a FEBS-t azzal érvelve, hogy a FEBS regionális, az IUBMB pedig globális szervezet. Bár ez földrajzilag vitathatatlan, a FEBS vezetőség makacsul azt feszegeti, hogy a csatlakozás milyen haszonnal jár a FEBS és tagegyesületei számára? Más regionális szövetségeket (Csendesóceáni-amerikai: PAABS és Ázsiai-őceániai: FAOB) ugyan támogat az IUBMB, de erre a FEBS nem szorul rá. Fordítva viszont ez nem áll. A FEBS tehát az egyre sürgetőbb megkeresésekre kitérő válaszokat ad, most is elnapolták a kérdést. Ennek során módomban van közelről élvezni a hagyományos brit diplomácia félelmetesen céltudatos mellébeszélését. Bizalmas körben ugyanis kimondják: nem az Európán kívüliekkel szembeni szűkmarkuság vezérli őket (ilyen projektekre mindig is áldoztak), továbbá szegények Európán belül is vannak. Egyszerűen nincs kedvük eltartani-támogatni az IUBMB "vizfejét". Az érdemi munka ugyanis a regionális szövetségekben folyik, nem a világszervezet globetrotter-hajlamú vezetőségében... Bár e véleménnyel aligha ért mindenki egyet, számunkra megnyugtató lehet, hogy vannak potenciális vízfejek, amelyekről védik a mi érdekeinket.

7. A FEBS vezetőség (Executive Committee) összetétele

Dublinban a FEBS elnöke (Madame Chairman!) Norma Ryan (Ir Köztársaság) lett; magam past-chairman-ként egy évig vagyok még tagja az Ex. Comm.-nak. A Council megerősítette tisztében további három évre John Mowbray-t (Nagy-Britannia, Treasurer) és Horst Feldmann-t (Németország, Advanced Courses Committee elnök). A Fellowship Committee éléről Carlos Gancedo (Spanyolország) kilenc évi, maximális időtartamú szolgálat után átadta helyét Israel Pecht-nek (Izrael). Az Ex. Comm. többi tagja változatlan (mandátumuk tart); ezek Vito Turk (Szlovénia, General-Secretary), Karl Decker (Németország, Publications Committee elnök) és Horst Kleinkauf (Németország, Meeting Counsellor).

8. Következő FEBS ill. IUBMB kongresszusok

- 22. FEBS Meeting, Stockholm, 1993. július 4-9, Reg. díj: 2000 SEK

- FEBS Special Meeting on Biological Membranes, Helsinki, 1994. június 26-július 1. Reg. díj: 1300 FM

- 17. IUBMB Kongresszus, New Delhi, 1994

- 23. FEBS Meeting, Basel, 1995. augusztus 14-19, reg. díj: 600 Sfr

- 24. FEBS Meeting, Barcelona, 1996.

- FEBS Special Meeting, helyszín nem eldöntött, Dánia (Koppenhága) esélyes.

- 18. IUBMB Kongresszus, San Francisco, 1997.
augusztus 24-29.

Szeretnék bizni abban, hogy tagjaink közül minél
többen eljuthatnak a fenti rendezvényekre.

FRIEDRICH PÉTER

FEBS mozaik '92

21st Meeting DUBLIN, augusztus 9-14.

A 400 éves Trinity College Dublin épületeiben mintegy 800 résztvevő gyűlt össze a találkozóra. Ez bizony messze elmaradt az előző FEBS-kongresszusok résztvevőinek számától. A magyar résztvevők számát mintegy 30 főre becsültük, ami viszonylagosan igazán nem kevés, jóllehet szintén lényegesen kevesebb mint a korábbi találkozókön jegyzett jelenlétünk. A szám szerinti csökkenés a mi esetünkben is elsősorban gazdasági-pénzügyi nehézségekre vezethető vissza.

Egyesületünk - az előzetes felmérés alapján - nem szervezett csoportos kiutazást. Viszont mintegy 10 tagtársunknak segítettünk a repülőjegy beszerzésében, továbbá olcsó szállás biztosításában. A szokásosan meghirdetett pályázatra kevesen jelentkeztek s közülük csak egy pályázóé tett eleget a feltételeknek

A tudományos program két plenáris előadást, 23 szimpoziium keretében 207 hagyományos (orális) előadást és 435 plakátelőadást kínált a résztvevőknek. A 6 magyar meghívott előadó produkcióját az alábbi táblázat szemlélteti.

Előadó	Előadás címe	Szimpoziium neve
Polgár L.	Mechanism of protease action	Mechanism of enzyme action
Fésüs L.	Transglutaminase-catalyzed protein cross-linking during apoptosis	Cell growth development and differentiation
Kondorosi Á. (Gif-sur-Yvette)	Regulation of nodulation gene expression in Rhizobium meliloti	Regulation of gene expression
Nagy F.	Circadian rhythm regulated gene expression in higher plants	Regulation of gene expression
Farkas T.	Molecular architecture and composition of membrane phospholipids in relation to temperature adaptation and stress	Biochemical aspects of low temperature stress
Joo F.	Biochemical approaches to cerebral blood vessels	Neurobiochemistry

Néhány érdeklődésre számot tartó eredmény:

Fémionok ill. komplexeik krónikus betegségek, valamint sugárkezelt állatok kezelésére

Különösen gazdag története van már az esszenciális fémionoknak, mint rádioprotektív anyagoknak. Sajnálatos módon azonban az eddigi eredmények nagyrészt nem tisztázták azok anyagcserében betöltött pontos szerepét. Erre ma már lehetőség van, különös tekintettel az esszenciális fémion-függő enzimek szerepére, melyet a toxikus anyagcseretermékek felhalmozódásának kivédésében, a biokémiai, sejt és szövet repair-mechanizmusokban, továbbá sugársérülés kivédésében ill. gyógyításában töltenek be.

Sorenson és mtsai (Arkansas, USA) kimutatták, hogy a Cu, Zn, Fe és Mn komplexek reagálnak az oxigén szabad gyökökkel (pl. O_2^- , OH^-). Különösen kedvező eredményeket értek el a réz-komplexekkel, melyek közül a leghatékonyabb, SOD-mimetikus és lipofil komplex, a Cu(II)(3,5-di-izopropil-szalicilát)₄ volt. E komplex jelentős antitumor, antimutagén, antidiabétikus, valamint radioprotektív és sugársérülést gyógyító hatást mutatott. A rádioprotektív hatást a vas-, mangán- és zink-komplexekről is megállapították.

A legújabb vizsgálatok egyik jelentős eredménye: a fémion-komplexekkel végzett kezeléseket sugársérülés megelőzésére ill. mérséklésére, de sugársérülés után is eredményesen lehet végezni. A hatódózis megállapításánál azonban a fém-komplexek toxicitását is figyelembe kell venni. Általában a hatódózis az egyes komplexek ill. fémsók (pl. Mn(II)Cl₂) toxikus dózisának a tizede vagy kilencede, éspedig általában 60-80 umol/kg között van. Azt is meg kell jegyezni, hogy a nemek kezelési érzékenységében különbség van. Érdekes, hogy az egyes fémionok (nyomelemek) kombinált adagolásáról nem esett szó.

Alacsony hőmérsékletű stressz (hideg stressz) biokémiai aspektusai

Kacperska (Warsaw, Poland) szerint a növények akklimatizációja alacsony hőmérséklettel szemben egy lépcsőzetes folyamat, amely végülis fagy elleni rezisztenciához vezet. A Brassica napus var. oleifera esetében e folyamatnak két fázisát állapították meg: 1) a reakció fázisa, amely a sejtanyagcsere egyensúlyának a hiányát, 2) a visszaalakulás fázisa pedig új egyensúlyt, új összetevők szintézisét jelenti.

Több előadás (Farkas, Szeged, Russel, Wales, UK, Somerville, Michigan, USA) is bizonyította a lipid-összetétel jelentőségét az alacsony hőmérsékletű stressz-helyzetekben állatoknál és növényeknél egyaránt.

A kiállításra zömmel a szigetországból érkeztek a kiállítók : nagy világcégek szigetországi képviselői, ill. leányvállalatai. Feltűnt, hogy ismert világcégek, mint pl. a Beckman nem vettek részt a kiállításon. Kelet-Európa országainak cégei is távol maradtak.

34th INTERNATIONAL CONFERENCE on the BIOCHEMISTRY OF LIPIDS

August 25-28, 1993
Noordwijkerhout, The Netherlands

The topics of the conference are:

CELLULAR PHOSPHOLIPASES AND PHOSPHOINOSITIDE KINASES

Speakers: L.C. Cantley (USA), H.J. Chap (F), G.H. de Haas (NL), C.P. Downes (UK),
R.M. Kramer (USA), M. Liscovitch (Israel), S.G. Rhee (USA), H. van den Bosch (NL)

*

INTRACELLULAR LIPID TRANSPORT AND METABOLISM

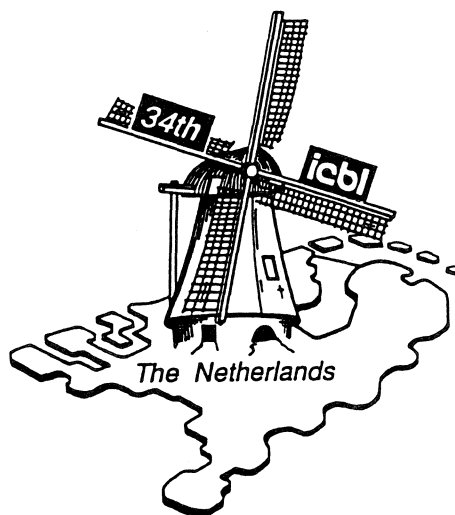
Speakers: V.G. Bankaitis (USA), G.M. Carman (USA), D. Hoekstra (NL),
C.H. Merrill (USA), G.T. Snoek (NL), G. Tettamanti (I), F.T. Wieland (FRG)

*

LIPIDS AND RECOGNITION

Speakers: S.I. Hakomori (USA), K. Inoue (Jpn),
A. Janoff (USA), C.R.H. Raetz (USA), H.-D. Söling (FRG)

CORRESPONDENCE / INFORMATION:
Secretariat 34th ICBL
Dept. of Lipid Biochemistry
C.B.L.E./University of Utrecht
P.O. Box 80.054
3508 TB Utrecht, The Netherlands
Tel.: +30-533425 / Fax: +30-522478



Lapunk minden olvasójának kellemes karácsonyi ünnepeket és
békés, sikerekben gazdag, boldog új évet kíván a
szerkesztő bizottság