

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója  
Quarterly Bulletin of the Hungarian Biochemical Society

Szerkesztőbizottság:

ALKONYI ISTVÁN, BÁNFALVI GÁSPÁR, ELŐDI PÁL, FALUS ANDRÁS, FÉSÜS LÁSZLÓ,  
GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS

Felelős szerkesztő:

SZÉKÁCS ANDRÁS

XXIV. ÉVF. 1. SZÁM

2000. MÁRCIUS

A tartalomról:

- ◇ Humán placenta protein 13 (PP13): aminosav-szekvencia, szerkezet és funkció – *Than Nándor, Visegrády Balázs, Berente Zoltán, Than Gábor, Sümegei Balázs*
- ◇ A bilirubin UDP-glukuroniltransferáz indukciója diabéteszes, acetonnal kezelt és éhezõ patkányokban – *Csala Miklós, Braun László, Marcus J. Coffey, Puskás Ferenc, Kardon Tamás, Nagy Gábor, Abigail A. Conley, Brian Burchell, Mandl József*
- ◇ Vas-kén fehérje bioszintézis – a mitokondrium esszenciális funkciója – *Kispál Gyula*
- ◇ A veszélyes géntechnika? – *Jenes Barnabás, Halász Gergely*
- ◇ GM élelmiszerek detektálása: a tudomány jelenlegi állása – *Szamos Jenõ*
- ◇ Az első „Hõgyes Délután” – *Nagy Tamás*
- ◇ Biotechnológiai inkubátor Szegeden – *Török Zsolt*
- ◇ ELISA teszrendszer mikotoxinok mérésére – *Barna-Vetró Ildikó*
- ◇ Új ökotoxikológiai laboratórium megnyitása a Tudomány Napján – *Almási Asztéria*
- ◇ Receptorológia (könyvismertetés, Horváth Edit: Receptor-ligand kölcsönhatás) – *Arányi Péter*
- ◇ Biotechnológia és felelõsség (könyvismertetés, Ferenczi Andrea: Genetika – Génétika) – *Pethõ Ágnes*
- ◇ Régi latin növénynevek enciklopédiája (könyvismertetés, Stirling János: Lexicon nominum herbarum...) – *Grynaeus Tamás*

Címlapkép: *A PP13 humán placenta protein homológia modellezéssel készített térszerkezete. A „jellyroll” szerkezetet egy-egy öt- és hatszálú β-lemez szendvicsszerűen összesimulva építi fel, mely két rövidebb α-helikális szakasszal egészül ki a fehérje pólusain. A galektineknél nagymértékben konzervált CRD a hatszálú β-lemez konkáv felszínén, az ábra előterében helyezkedik el. Az ábrát Visegrády Balázs készítette (ld. a vonatkozó közleményt az 1–6. oldalakon).*

Hátsó borító: *Fekõ fa – Szirtes János festménye (tempera merített papíron, 1996) (lásd a „Művészsarok” rovatot a 22. oldalon.)*



Contents:

- ◇ Human placental tissue protein 13 (PP13): amino acid sequence, structure and function – *Nándor Than, Balázs Visegrády, Zoltán Berente, Gábor Than, Balázs Sümegei*
- ◇ Induction of bilirubin UDP glucuronyl transferase in diabetic, acetone treated and starving rats – *Miklós Csala, László Braun, Marcus J. Coffey, Ferenc Puskás, Tamás Kardon, Gábor Nagy, Abigail A. Conley, Brian Burchell, József Mandl*
- ◇ Biosynthesis of iron-sulfur proteins – the essential function of mitochondria – *Gyula Kispál*
- ◇ The dangerous gene technology? – *Barnabás Jenes, Gergely Halász*
- ◇ Detection of GM foods: current state of the art – *Jenõ Szamos*
- ◇ The first “Hõgyes Afternoon” lectures – *Tamás Nagy*
- ◇ Biotechnology business incubator in Szeged – *Zsolt Török*
- ◇ ELISA test systems to detect mycotoxins – *Ildikó Barna-Vetró*
- ◇ The opening ceremony of a new ecotoxicology lab on the Day of Science – *Asztéria Almási*
- ◇ Receptorology (book review) – *Péter Arányi*
- ◇ Biotechnology and responsibility (book review) – *Ágnes Pethõ*
- ◇ Encyclopaedia of historic plant names (book review) – *Tamás Grynaeus*



Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1518 Budapest, Pf. 7  
e-mail: [biokemia@nki.hu](mailto:biokemia@nki.hu) <http://korb1.sote.hu/biokemia/biokemia.htm>

Felelõs kiadó: Dr. Friedrich Péter

Készült a dART studio gondozásában.

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455

# Humán placenta protein 13 (PP13): aminosav-szekvencia, szerkezet és funkció

## Human placental tissue protein 13 (PP13): amino acid sequence, structure and function

Than Nándor<sup>1</sup>, Visegrády Balázs<sup>2</sup>, Berente Zoltán<sup>1</sup>, Than Gábor<sup>3</sup>, Sümegei Balázs<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pécsi Orvostudományi Egyetem, Biokémiai Intézet

<sup>2</sup> Központi Kutató Laboratórium

<sup>3</sup> Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika  
7624 Pécs, Szigeti út 12.

### Összefoglalás

A két identikus, 16 kD alegységből álló humán placenta protein 13 (PP13) expresszióját emberi lepényszövetben és más, különféle egészséges illetve tumoros szövetmintákban detektáltuk monospecifikus, anti-PP13 szérum segítségével felépített kemilumineszcens Western-blot assay alkalmazásával. A PP13 cDNS-ének izolálása és szekvenciaanalízise alapján megállapítottuk, hogy a kódolt fehérje 139 aminosavból áll. A PP13 elsődleges szerkezete 69%-ban homológ a 16,5 kD humán eozinofil *Charcot-Leyden crystal proteinnel*, amely többfunkciójú fehérje: az élővilágban széles körben elterjedt, konzervált S-típusú  $\beta$ -galaktozid-kötő lektin (galektin) család tagja, és lizofoszfolipáz aktivitással is rendelkezik. Kutatásaink szerint a PP13 a galektin család újonnan felfedezett tagja, melynek háromdimenziós szerkezetét számítógépes homológia modellezéssel térképeztük fel. <sup>1</sup>H és <sup>31</sup>P NMR vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a PP13 is rendelkezik lizofoszfolipáz aktivitással.

Than, N.<sup>1</sup>, Visegrády, B.<sup>2</sup>, Berente, Z.<sup>1</sup>, Than, G.<sup>3</sup>, Sümegei, B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Medical School of Pécs, Department of Biochemistry

<sup>2</sup> Central Research Laboratory

<sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, H-7624 Pécs, Szigeti St. 12, Hungary

### Summary

Expression of the 16 kD homodimer placental tissue protein 13 (PP13) was detected in human placental and in other different normal and tumorous tissues by a chemiluminescence Western-blot assay using monospecific anti-PP13 serum. By isolation and sequence analysis of its cDNA, PP13 turned out to be a 139 residue-long protein. Primary structure of PP13 shows 69% homology to the 16.5 kD human eosinophil *Charcot-Leyden crystal protein*, which is a unique dual-function protein: a member of the highly widespread and conserved  $\beta$ -galactoside binding S-type animal lectin (galectin) superfamily, possessing lysophospholipase activity, as well. By the results of computer assisted homology search, PP13 is a new member of the galectin superfamily, its three-dimensional structure was obtained by computer homology modeling. Lysophospholipase activity of PP13 was confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR measurements.

### A Magyar Biokémiai Egyesület

1999 márciusában graduális vagy posztgraduális képzésben részt vevő fiatal biokémikusok számára meghirdetett pályázatát

*Csala Miklós és Than Nándor* nyerték el.

Az ösztöndíj **anyag támogatást** nyújtott a *26th Meeting of the Federation of Biochemical Societies* (FEBS '99) **kongresszuson való részvételhez**, ahol a díjazottak munkájukat – előadás vagy poszter formájában, melyben az illető díjazott volt az első szerző – bemutatták. A díjazottaknak gratulálunk, és a két kitüntetett munkát újságunk e számában ismertetjük.

## Előzmények

Az „onkodevelopmentális fehérjék” a különféle szövetekben és testnedvekben élettani körülmények között általában csak kis mennyiségben fordulnak elő, ezzel szemben fiziológiás viszonyok között a terhesség során, illetve tumoros betegekben gén-reexpresszió következtében mennyiségük jelentősen megnövekszik. Pontos fiziológiás funkciójuk, illetve a tumorok kialakulásában játszott szerepük az esetek egy részében még ma is tisztázatlan. Ezen fehérjéket a „*pregnancy-related protein*”-ek családjába sorolják, melyeket az *Advances in Pregnancy-Related Protein Research* [1] című könyvünkben rendszereztünk. Munkacsoportunk már közel harminc éve folytatja a kutatásukat, az utóbbi években pedig molekuláris biológiai módszerek segítségével néhány onkodevelopmentális protein strukturális és funkcionális karakterizálását is elvégeztük. A fehérjéket kódoló cDNS-ek izolálása, szekvenálása, illetve a fehérjék szerkezeti és funkcionális analízise mellett vizsgáltuk expressziójukat különböző tumorszövetekben, mennyiségüket tumoros betegek testfolyadékaiban, valamint tumormarkerként való esetleges alkalmazhatóságukat is [2–5].

A „*pregnancy-related protein*”-ek családjába tartozó placenta protein 13 (PP13) homodimer, két 16 kD molekulatömegű, diszulfid-híddal összekapcsolt alegységből áll, szénhidrátartalma minimális (0,6%). Egy átlagos, terminusból származó humán lepény

3,7 mg PP13-at tartalmaz. Korábban elektroimmunoassay és Ouchterlony géldiffúziós teszt segítségével a PP13-at csak lepényszövetben sikerült detektálnunk, ugyanakkor RIA vizsgálatokkal a testfolyadékokban nem volt kimutatható [6,7]. Legújabb eredményeink szerint a PP13 nem lepényszövet-specifikus, néhány egészséges felnőtt és magzati szövetben, valamint tumorszövetben igazoltuk expresszióját. A PP13-at kódoló cDNS szekvencia, valamint a fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a PP13 a humán *Charcot-Leyden crystal protein* közeli rokona, valamint az állatvilágban széles körben elterjedt  $\beta$ -galaktozid-kötő S-típusú lektin (galektin) család tagja, amely lizofoszfolipáz aktivitással is rendelkezik. Eredményeink alapján a PP13 fiziológiás, illetve a tumorgenezisben játszott szerepére is lehet következtetni.

## Módszerek

### Western blot analízis

A Western blot assay felépítéséhez PP13 antigént (Op. 234/266) használtunk, melynek fiziko-kémiai módszerekkel történő tisztítása és a monospecifikus anti-PP13 szérumának (160 ZB) előállítására kollaborációs partnerünk, Dr. Hans Bohn (Behringwerke AG) nevéhez fűződik. Vizsgálatainkban száz, huszonegyfajta egészséges felnőtt és magzati szövetből származó szövetmintát, illetve öt külön-



A Pécsi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetében 1973-ban, a Női Klinikával közösen kezdődtek a részint nemzetközi kollaborációkban végzett terhességi-, lepény-, illetve endometrium eredetű fehérjék alap- és alkalmazott kutatásai. Az elmúlt, közel három évtized folyamán munkacsoportunk kilenc *pregnancy-related protein* ( $\alpha_2$ -PAG, SP1, PP4/annexin V, PP5/szerin proteáz inhibitor, PP10/plazminogén aktivátor inhibitor-2, PP12/IGFBP-1, PP13, PP14/glikodelin-A, PP17) azonosítását, mérőmódszereinek kidolgozását, valamint mennyiségi viszonyainak feltérképezését végezte egészséges és kóros viszonyok közt. 1997 óta három szolubilis

lepényszöveti fehérje (PP17a, PP17b/TIP47 és PP13/galektin és lizofoszfolipáz) cDNS-ének izolálását és a fehérjék molekuláris biológiai karakterizálását végeztük. A cikk szerzői (balról jobbra): **Sümegei Balázs** biokémikus, tanszékvezető professzor, a molekuláris biológiai munkacsoport vezetője, a MTA doktora; **Visegrády Balázs** fizikus, aki a homológia modellezést végezte; **Than Nándor** orvos nevéhez fűződik a molekuláris biológiai kísérletek, aki 1999-ben védte PhD-téziseit, majd „*Promotio sub auspiciis Praesidentis Rei Publicae*” kitüntetéses doktorrá avatták; **Berente Zoltán** okleveles vegyész, aki az NMR spektroszkópiás méréseken dolgozott; **Than Gábor** szülészprofesszor a *pregnancy-related protein* kutatócsoport vezetője, a MTA doktora. Than Nándor e munkájával elnyerte a Magyar Biokémiai Egyesület 1999. márciusi, graduális vagy posztgraduális képzésben részt vevő fiatal biokémikusok számára kiírt pályázatát, amely anyagi támogatást nyújtott, hogy e munkát bemutassa a *26th Meeting of the Federation of Biochemical Societies* (FEBS '99) kongresszuson.

böző fajta tumorból származó szövetmintát dolgoztunk fel. A szöveteket homogenizálás után ultracentrifugáltuk és a felülúszókat Laemmli-oldatban 1 mg/ml fehérjekoncentrációra hígítottuk. Egészséges, először szülő nőktől a 7. és a 40. terhességi hét között, hetente gyűjtött vérmintákból (n=75) a szérumot ultracentrifugálással különítettük el és Laemmli-oldatban hígítottuk. A 12%-os SDS/poliakrilamid gél-elektroforézissel szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Az immunblottot anti-PP13 nyúlszérummal és torma-gyökérperoxidáz-jelölt másodlagos anti-nyúl immunoglobulinnal végeztük. A PP13 immunreaktív fehérjéket ECL kemilumineszcens analízissel tettük láthatóvá, az ezt követő kvantitatív denzitometriás analízis pedig Scion Image for Windows szoftverrel történt.

#### *cDNS klónozás és szekvencia analízis*

A PP13-at kódoló cDNS-t lepényi expressziós génkönyvtár szűrési vizsgálatával, monospecifikus anti-PP13 szérum segítségével izoláltuk. Az elsődleges immunreakciót alkalikus foszfatáz-konjugált másodlagos anti-nyúl immunoglobulinnal, 5-bróm-4-klor-3-indolil-foszfát / nitro blue tetrazólium foszfatáz reakció segítségével detektáltuk. A pozitív plakkot tisztítottuk, majd az izolált fagot R408 helper faggal alakítottuk pBluescript SK-plazmiddá [8]. A baktériumok tenyésztése, a plazmid DNS tisztítása, a cDNS inzert restrikciós karakterizálása, valamint a cDNS inzert restrikciós fragmentjeinek szubklónozása pedig már korábban leírt módszerek segítségével történt [9]. A cDNS inzertek mindkét szálának nukleotid szekvenciáját dideoxi-szekvenálási módszerrel határoztuk meg [10].

#### *Számítógépes nukleotid- és aminosav-szekvencia analízis*

A szekvenciákat különböző gén és fehérje adatbank programokkal elemeztük. A PP13 feltételezett jellegzetes biológiai, funkcionális profiljainak feltérképezése a PROSITE, ProDom és O-glycibase adatbázisok felhasználásával történt [11–13]. A PP13 szekvenciákat az összes eddig ismert nukleotid- és aminosav-szekvenciával összehasonlítva végeztünk homológiakutatást a washingtoni GenBank BLAST programja segítségével [14].

#### *Számítógépes térszerkezet modellezés*

A PP13 háromdimenziós szerkezetét homológia modellezéssel építettük fel. A struktúrameghatározás alapjául a legközelebbi tíz, már ismert térszerkezetű homológ fehérjének a brookhaveni (USA) Protein Data Bank adatállományából letölthető háromdimenziós struktúrája szolgált. A számításokat Indy (Silicon Graphics) munkaállomáson, Sybyl 6.5 (Tripos) szoftver és a hozzá tartozó Composer modul felhasználásával végeztük.

#### *NMR spektroszkópia*

A PP13 lizofoszfolipáz aktivitását Varian UNITYINOVA 400 WB spektrométeren végzett  $^{31}\text{P}$  és  $^1\text{H}$  NMR mérésekkel igazoltuk. *L*- $\alpha$ -lizofoszfadilkolinból három, egyenként 2,5 mg-os részletet oldottunk fel 700-700 ml Hepes (200 mM, pH=7; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl) és  $\text{D}_2\text{O}$  7:3 arányú elegyében. Az első oldathoz 20 mg natív PP13-at, a másodikhoz pedig 20 mg hődenaturált PP13-at adtunk a mérések indításakor. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, és a  $^{31}\text{P}$  NMR spektrumukat folyamatos időközökben, 161,90 MHz frekvencián regisztráltuk. A natív PP13-at tartalmazó elegyből a kísérlet során kivált csapadékot centrifugáltuk,  $\text{CDCl}_3$ -ban oldottuk vissza és meghatároztuk  $^1\text{H}$  NMR-spektrumát.

### **Eredmények**

SDS/poliakrilamid gél-elektroforézissel a PP13 16 kD molekulatömegű alegység expresszióját figyeltük meg humán későterhességi lepényszövetben. A nagy specifitású antiszérum immunreakciót adott a 16 kD fehérjével egészséges szövetekben (magzati/felnőtt lép, magzati vese és felnőtt húgyhólyag) és tumorszövetekben (máj adenocarcinoma, malignus melanoma és idegi eredetű tumor) egyaránt. Megállapítottuk, hogy a PP13 a keringésbe nem szekretálódik, mivel sem terhesektől, sem pedig egészséges, nem-terhes kontrolloktól származó szérummintákban nem volt kimutatható (1. ábra).

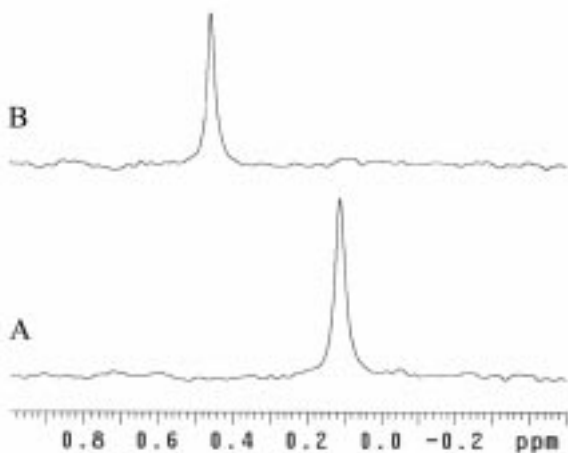
Humán lepényi cDNS könyvtár szűrési vizsgálata során  $10^6$  rekombinánsból egy pozitív klónt sikerült izolálnunk. Az 578 bp hosszúságú cDNS inzertben az 5' nemkódoló rész 14 bp, a kódoló régió 417 bp, melyet 147 bp hosszú 3' nemkódoló rész követ, tartalmazván a feltételezett poliadenilációs szignált és egy, a poliadenilált mRNS-ek 3' végére jellemző szekvenciát (GenBank elérhetőségi szám: AF117383) [15]. A transzlációs iniciációs kodon konszenzus



PP13 a többi galektinhez hasonlóan „jellyroll” szerkezettel rendelkezik, melyet egy-egy öt- és hatszálú  $\beta$ -lemez szendvicsszerűen összesimulva épít fel, a fehérje pólusain két rövidebb  $\alpha$ -helikális szakasszal kiegészülve. A galektinekben nagymértékben konzervált CRD – mely a hatszálú  $\beta$ -lemez konkáv felszínén helyezkedik el – a PP13-ban a homológokéval megegyező struktúrával bír [21–23] (4. ábra). A szerkezeti egyezés valószínűsíti a PP13 szénhidrátkötését, az erre vonatkozó funkcionális vizsgálatok folyamatban vannak.

**4. ábra** (lásd a címlapon) A PP13 homológia modellezéssel készített térszerkezete. A „jellyroll” szerkezetet egy-egy öt- és hatszálú  $\beta$ -lemez szendvicsszerűen összesimulva építi fel, mely két rövidebb  $\alpha$ -helikális szakasszal egészül ki a fehérje pólusain. A galektinekben nagymértékben konzervált CRD a hatszálú  $\beta$ -lemez konkáv felszínén, az ábra előterében helyezkedik el. (Az ábrát Visegrády Balázs készítette.)

A PP13 – galektin-10-zel való hasonlósága folytán feltételezett – lizofoszfolipáz aktivitását  $^{31}\text{P}$  NMR-rel, *L*- $\alpha$ -lizofoszfadilkolint (LPC) és PP13-at tartalmazó elegyben mutattuk ki. Kísérleti körülményeink között a LPC ( $\delta=0,11$  ppm) PP13 jelenlétében egy más foszfortartalmú anyaggá ( $\delta=0,46$  ppm) alakult át, fehér szilárd termék lassú kiválása mellett (5. ábra). A kontroll elegyekben (LPC ugyanazon pufferben, PP13 távollétében, illetve hődenaturált PP13 jelenlétében) ez az átalakulás nem ment végbe. A reakció termékét kémiai eltolódása alapján glicero-3-foszfobil-kolinként (G3PC) azono-



**5. ábra** *L*- $\alpha$ -lizofoszfadilkolint ( $\delta=0,11$  ppm) és PP13-at tartalmazó elegy  $^{31}\text{P}$  NMR-spektruma a kiindulási állapotban (A) és az enzimreakció végállapotában (B). A reakcióban megjelenő terméket ( $\delta=0,46$  ppm) glicero-3-foszfobil-kolinként azonosítottuk.

sítottuk, melyet megerősít az is, hogy a reakcióban kivált csapadékot  $^1\text{H}$  NMR-spektruma alapján zsírsavnak találtuk. Mindezekből arra következtettünk, hogy az LPC átalakulása G3PC-ná PP13 jelenlétében a fehérje lizofoszfolipáz aktivitásának következménye volt.

## Konklúzió

Western-blot analízis alapján megerősítést nyert, hogy a PP13 két identikus, 16 kD molekulatömegű alegységből áll. Ellentétben az irodalmi adatokkal [1,6], kiderült, hogy a PP13 nem lepényszövet-specifikus, mivel néhány egészséges felnőtt és magzati szövetben, valamint tumorszövetben igazoltuk – változó mennyiségű – expresszióját. Hasonló jelenség figyelhető meg több onkodeszignálási fehérje esetében is [1,2]. Korábbi RIA méréseink eredményeit igazolva megállapítottuk, hogy a PP13 sem terheesség alatt, sem pedig egészséges kontrollokban nem szekretálódik a szérumba [7].

Humán lepényi cDNS könyvtárból egy 578 bp hosszú cDNS-t izoláltunk, mely a 139 aminosavból álló PP13-at kódolja [4], ami identikus az 1983-ban tisztított PP13 antigénnel [6]: (1) A PP13 aminosav-szekvencia alapján számolt molekulatömege (16,118 kD) megegyezik az SDS/PAGE vizsgálatban mért értékkel (16,000 kD); (2) A PP13 számított aminosav-összetétele jól egyezik a tisztított antigén fizikokémiai módszerekkel megállapított értékeivel.

A PP13 aminosav-szekvencia számítógépes analízise érdekes adatokat szolgáltatott: (1) Lehetséges, hogy a PP13 kazein kináz 2 vagy tirozin kináz által regulált fehérje. (2) Összehasonlító vizsgálatok szerint a PP13 a  $\beta$ -galaktozid kötő S-típusú állati lektin (galektin) család tagja és közeli rokona néhány IgE-kötő fehérjének is, mivel hasonlóságuk 50% feletti, és az ezen fehérjékben nagyfokban konzervált szénhidrátkötő domén a PP13-ban is megőrzött [19,20]. (3) A PP13 a legnagyobb homológiát a 16,5 kD-os humán eozinofil *Charcot-Leyden crystal proteinnel* (galektin-10) mutatja, amely többfunkciójú, lizofoszfolipáz aktivitással és szénhidrátkötő tulajdonságokkal rendelkező fehérje [17,18].

Homológia modellezés szerint a PP13 a galektinre jellemző „jellyroll” térszerkezettel rendelkezik, és a feltételezett szénhidrátkötő doménje is a homológokéval megegyező struktúrával bír [21–23]. Hasonlóan a galektinek egy részéhez, két identikus alegységből épül fel, melyek a szénhidrátkötő

doménnel ellentétes oldalukon kapcsolódnak egymáshoz. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a PP13 alkalmas szénhidrát-tartalmú struktúrák, így adhéziós molekulák megkötésére, és más galektinekhez hasonlóan – fiziológiás körülmények közt – a sejt–sejt és sejt–mátrix interakciókban, a sejtnövekedés regulációjában és a lepény mikroköznyezeti szerveződésében játszhat szerepet [24–26]. Néhány galektinről kimutatták, hogy befolyásolni tudja a tumorsejtek adhézióját lamininhez, ezáltal a metasztázis készség és az invazivitás modulátoraként szerepelhet többek közt különböző emésztőrendszeri tumor és malignus melanoma eseteiben. Ezen adatok jól korrelálnak a PP13 onkoregulatorikus eredetére vonatkozó megfigyeléseinkkel [27,28].

A *Charcot-Leyden crystal protein*hez hasonlóan a PP13 is rendelkezik lizofosfolipáz aktivitással, melyet NMR spektroszkópiai úton igazoltunk. Mint tudjuk, a lizofosfolipidok erős membránkárosító hatással rendelkeznek [29], így a PP13-nak feltehetően protektív szerepe van a magzatra nézve, illetve a terhesség fenntartását illetően. Mivel a lizofosfolipidok részt vesznek a biológiai membránok fúziójában, így például a nyúlebriók beágyazódási folyamataiban [30], a PP13-nak szerepe lehet a humán embrió beágyazódási folyamatainak regulációjában is.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Dr. Hans Bohnnak, hogy a PP13 antigént és a monospecifikus anti-PP13 szérumot rendelkezésünkre bocsátotta. A projekt az alábbi kutatási támogatások segítségével valósulhatott meg: OTKA T-010310, T-020622, T-023076, T-029824, ETT 382/1996, T-01 102/1998, FKFP 1393/1997, 1210/1998, 0010/1999.

## Irodalomjegyzék

- [1] Than, G.N., Bohn, H., Szabó, D.G. (1993) In: *Advances in Pregnancy-Related Protein Research*. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, pp. 1-333.
- [2] Than, N.G., Sümegi, B., Than, G.N., Kispál, Gy., Bohn, H. (1998) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding human placental tissue protein 17 (PP17) variants. *Eur. J. Biochem.*, **258**: 752-757.
- [3] Than, N.G., Sümegi, B., Than, G.N., Kispál, Gy., Bohn, H. (1999) Cloning and sequencing of human oncodevelopmental soluble placental tissue protein 17 (PP17): Homology with adipophilin and the mouse adipose differentiation-related protein. *Tumor Biol.*, **20**: 184-192.
- [4] Than, N.G., Sümegi, B., Than, G.N., Berente, Z., Bohn, H. (1999) Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein. *Placenta*, **20**: 703-710.
- [5] Than, N.G., Sümegi, B., Than, G.N., Kispál, Gy., Bohn, H. (1999) Is placental tissue protein 17b/TIP47 a new factor in cervical cancer genesis? *Anticancer Res.*, közlésre elfogadva.
- [6] Bohn, H., Kraus, W., Winckler, W. (1983) Purification and characterisation of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17). *Oncodev. Biol. Med.*, **4**: 343-350.
- [7] Than, G., Szabó, D., Göcze, P., Arany, A., Bognár, Z. (1986) Lepényi fehérjék (PP5, PP10, PP12, PP13, PP17) szérum- és magzatvízértékei egészséges terhességekben. *Magy. Nőorv. L.*, **49**: 11-15.
- [8] Short, J.M., Sorge, J.A. (1992) *In vivo* excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. *Methods Enzymol.*, **216**: 495-508.
- [9] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [10] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- [11] Bairoch, A., Bucher, P., Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 217-221.
- [12] Corpet, F., Gouzy, J., Kahn, D. (1998) The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 323-326.
- [13] Hansen, J.E., Lund, O., Rapacki, K., Brunak, S. (1997) O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 278-282.
- [14] Altschul, S.F., Madden, T.L., Shaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- [15] Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R., Chambon, P. (1980) The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res.*, **8**: 127-142.
- [16] Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 8125-8148.
- [17] Ackerman, S.J., Corrette, S.E., Rosenberg, H.F., Bennett, J.C., Mastrianni, D.M., Nicholson-Weller, A., Weller, P.F., Chin, D.T., Tenen, D.G. (1993) Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J. Immunol.*, **150**: 456-468.
- [18] Dyer, K.D., Rosenberg, H.F. (1996) Eosinophil Charcot-Leyden crystal protein binds to beta-galactoside sugars. *Life Sci.*, **58**: 2073-2082.
- [19] Barondes, S.H. (1984) Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science*, **223**: 1259-1264.
- [20] Barondes, S.H., Cooper, D.N.W., Gitt, M.A., Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20807-20810.
- [21] Rini, J.M. (1995) X-Ray crystal structures of animal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**: 617-621.
- [22] Leonidas, D.D., Elbert, B.L., Zhou, Z., Leffler, H., Ackerman, S.J., Acharya, K.R. (1995) Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure*, **3**: 1379-1393.
- [23] Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P., Acharya, K.R. (1998) Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry*, **37**: 13930-13940.
- [24] Perillo, N.L., Marcus, M.E., Baum, L.G. (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.*, **76**: 402-412.
- [25] Vicovac, Lj., Jankovic, M., Cuperlovic, M. (1998) Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Human Reprod.*, **13**: 730-735.
- [26] Inohara, H., Akahani, S., Raz, A. (1998) Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp. Cell Res.*, **245**: 294-302.
- [27] Van den Brule, F.A., Buicu, C., Baldet, M., Sobel, M.E., Cooper, D.N.W., Marschal, P., Castronovo, V. (1995) Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**: 760-767.
- [28] Ohannesian, D.W., Lotan, D., Thomas, P., Jessup, J.M., Fukuda, M., Gabius, H.-J., Lotan, R. (1995) Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, **55**: 2191-2199.
- [29] Weltzien, H.U. (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**: 259-287.
- [30] Morin, C., Langlais, J., Lambert, R.D. (1992) Possible implication of lysophosphatidylcholine in cell fusion accompanying implantation in rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, **96**: 827-836.

# A bilirubin UDP-glukuroniltranszferáz indukciója diabéteszes, acetonnal kezelt és éhező patkányokban

## Bilirubin UDP-glucuronyl transferase induction in spontaneously diabetic, acetone-treated and starved rats

Csala Miklós, Braun László, Marcus J. Coffey\*, Puskás Ferenc, Kardon Tamás, Nagy Gábor, Abigail A. Conley\*, Brian Burchell\*, Mandl József

SOTE Orvosi Vegytani Intézet,  
1444 Budapest, Pf. 260

\*Dundee Egyetem Molekuláris és Sejtpatológiai Intézet, Dundee DD1 9SY, Nagy-Britannia

### Összefoglalás

A máj biotranszformációs enzimeinek összehangolt indukciója általános tulajdonsága a biotranszformáció szabályozásának egészséges és patológiás viszonyok között egyaránt. Jelen munkánkban a bilirubin UDP-glukuroniltranszferáz (UGT1A1) aktivitását és mennyiségét vizsgáltuk BB/Wor diabéteszes, éhező és acetonnal kezelt patkányok májában. Mind a három kezelés fokozta a bilirubin glukuronidációját, ami jól korrelált a máj mikroszómák emelkedett UGT1A1 fehérjemennyiségével. Diabétesz és éhezés esetén transzkripciós szintű UGT1A1 indukciót mutattunk ki, de acetonkezelés hatására nem, így ez utóbbi feltehetőleg a fehérje stabilizációja révén hatott. A diabéteszben és éhezésben kialakuló hormonális/anyagcsere változások a születés utáni állapot modelljeként is szolgálhatnak. Az anyai eredetű glukózellátás hirtelen megszűnése kiválthatja az UGT1A1 fokozott termelését, ami új lehetséges magyarázatát adhatja az újszülöttkori bilirubin glukuronidáció fiziológias indukciójának.

Csala, M., Braun, L., Coffey, M. J.\*, Puskás, F., Kardon, T., Nagy, G., Conley, A. A.\*, Burchell, B.\*, Mandl, J.

Department of Medical Chemistry,  
Semmelweis University of Medicine,  
H-1444, Budapest, POB. 260, Hungary

\*Department of Molecular and Cellular Pathology, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School,  
Dundee DD1 9SY, United Kingdom

### Summary

The coordinated induction of several hepatic drug-metabolizing enzymes is a common feature in regulation of drug metabolism under normal and pathological conditions. In the present study the activity and expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) were investigated in livers of BB/Wor diabetic-, fasted- and acetone-treated rats. Bilirubin glucuronidation was stimulated by the treatments, and this correlated with an increase in UGT1A1 protein concentration in hepatic microsomes. Transcriptional induction of UGT1A1 was also observed in diabetes and starvation, but not by acetone treatment, which presumably caused translational stabilization of the enzyme protein. The hormonal/metabolic alterations in diabetes and starvation may be a model for postnatal development. The sudden interruption of maternal glucose supply is signalling an enhanced expression of UGT1A1 giving a novel explanation for the physiological induction of bilirubin glucuronidation in newborn infants.

### Bevezetés

A cukorbetegségben tapasztalható összetett anyagcserezavar nem csupán a szénhidrát-, lipid- és fehérje-metabolizmust, hanem a gyógyszer-metabolizmust is érinti. A biotranszformáció első fázisával kapcsolatban ismert, hogy mind a mesterségesen

kiváltott, mind a genetikai alapon kialakuló inzulinfüggő cukorbetegség fokozott citokróm P450 1, 2B és 2E aktivitással jár [1,2]. A citokróm P450 2E1 koncentrációjának szabályozása számos mechanizmust magába foglaló összetett folyamat [3,4]. A biotranszformáció második fázisának mennyisé-



gileg legjelentősebb reakcióútja minden gerincesben a glukuronidáció [5]. Az UDP-glukuroniltranszferázok (UGT-k) az endoplazmás retikulum integráns membránfehérjéi, melyeknek aktív centruma a lumen felé tekint [5]. Az UGT-k számos endogén és xenogén vegyületet hatástalanítanak, melyek ilyen módon kiüríthetőkkelé válnak. Az endogén szubsztátok közül a hem lebontásának végtermékét, a bilirubint vizsgálták leginkább [5]. Mivel a bilirubin magas koncentrációban agy- és vesekárosodást okoz, kiürítése létfontosságú [5]. Kimutatták, hogy az etanol fokozza a bilirubin eltávolítását és a májban a hem lebontását, ami Gilbert-kór vagy újszülöttkori hiperbilirubinémia esetén előnyös hatást vált ki [6–8]. Ráadásul a bilirubin UGT aktivitás patkányban indukálódik etanol hatására [9]. Az UGT géncsaládban nyolc különböző patkány UGT-t és tizennégy emberi UGT-t azonosítottak cDNS klónozással [10]. Az aminosavsorrendek hasonlósága alapján az UGT enzimeket két nagy családba osztották. Az UGT1-es család tagjai a fenolok és a bilirubin, míg az UGT2-es család tagjai a szteroidok konjugációját végzik. Az UGT izoenzimek heterogenitását az eltérő induktorok is jól mutatják.

Mivel az UGT1A1 aktivitás a citokróm P450 2E1-hez hasonlóan indukálódott etanol hatására, megvizsgáltuk a máj UGT1A1 expresszió molekuláris változásait három *in vivo* modell rendszerben (cukorbeteg, acetonnal kezelt és 96 órán át éhező patkányokon), amelyekben a P450 2E1 is indukálódik. Az emberi inzulinfüggő (I. típusú) cukorbetegség

állatmodelljéül BioBreeding/ Worcester (BB/Wor) hím patkányokat választottuk, hogy az erősen toxikus diabetogén vegyszerek (sztreptozotocin, alloxán) indukáló és represszív hatását elkerüljük [11,12].

## Módszer

**Állatkísérletek.** A BB/Wor patkányok a Wistar egyik beltenyésztett törzse, melyek hím példányainak kb. 87%-ában a 120 napos életkorig spontán kialakul az inzulinfüggő diabetes. 80 napos BB/Wor egészséges és inzulin implantátummal ellátott patkányokat (180–200 g testsúly) vásároltunk a Charles River Hungary Ltd.-től (Budapest). A vércukorszintet naponta megmértük az implantátum kimerüléséig. Miután a vércukorszint elérte a 20 mM-t, még három napig tartottuk az állatokat inzulinkezelés nélkül, majd leöltük őket. Hím Wistar patkányokat (180–200 g testsúly) szintén a Charles River Ltd.-től vettünk. Az egyik kísérletsorozatban az állatokat 96 órán át éhezettük, egy másikban pedig öt napig acetonnal kezeltük őket, melyet az ivóvizükhöz adtunk (1%; v/v) öt napig [3].

**Patkánymáj mikroszóma preparálás.** A BB/Wor és Wistar hím patkányokból máj mikroszómát készítettünk a korábban leírt módszerrel [13]. A 10–20 mg fehérje/ml koncentrációjú mikroszómát MOPS-K pufferban (20 mM MOPS, 100 mM KCl, 20 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,2) fagyasztva tároltuk folyékony nitrogénben. Néhány kísérletben a mikroszómát alamethicinnel (0,05 mg/mg fehérje) permeabilizáltuk.



A közlemény magyar szerzői a SOTE Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetében a máj biokémiájával foglalkozó munkacsoport tagjai. A csoport és egyben az Intézet vezetője **Mandl József** professzor (a képen középen), tagjai: **Bánhegyi Gábor** docens (hátsul-balra), **Braun László** adjunktus (hátsul-jobbra), **Csala Miklós** tanársegéd (hátsul-középen), **Kardon Tamás** gyakornok, **Nagy Gábor** TDK-s hallgató (a kép készültékor nem voltak jelen) és **Szénásiné Mile Valéria** asszisztens (elől-jobbra). A képen látható még Bombicz Józsefné titkárnő (elől-balra), Puskás Ferenc a cikkben szereplő kísérletekben ösztöndíjas PhD-hallgatóként vett részt, jelenleg az Amerikai Egyesült

Államokban tartózkodik. A csoporthoz csatlakozott Szarka András ösztöndíjas PhD-hallgató. Munkacsoportunk fő kutatási területei a máj endoplazmás retikulumában zajló transzportfolyamatok, a biotranszformáció és az antioxidánsok, különösen az aszkorbát metabolizmusának szabályozása. Nemzetközi kapcsolatokat alakítottunk ki egy olasz, két skóciai laboratóriummal (egyiknek tagjai a jelen cikk társszerzői), továbbá más amerikai és európai munkacsoportokkal. A csoport oktatói-kutatói előadóként és gyakorlatvezetőként az orvostanhallgatók és PhD-hallgatók oktatásában vesznek részt. Csala Miklós e munkájával elnyerte a Magyar Biokémiai Egyesület 1999. márciusi, graduális vagy posztgraduális képzésben részt vevő fiatal biokémikusok számára kiírt pályázatát, amely anyagi támogatást nyújtott, hogy e munkát bemutassa a 26th Meeting of the Federation of Biochemical Societies (FEBS '99) kongresszuson.

*Ellenanyagok.* Anti-P450 2E1 ellenanyagot Prof. Arthur Cederbaumtól kaptunk (The Mount Sinai Medical Center New York, NY). A poliklonális ellenanyagot nyúlban termeltették hörcsög P450 2E1 ellen. Ez az ellenanyag kötődik patkány, egér és ember P450 2E1-hez. A patkánymáj UGT elleni antitestet (RAL) birkában termeltették [13]. Az anti-UGT1A1 ( $R_{10}$ ) antitestet nyúlból izolálták [14] tisztított patkánymáj bilirubin UGT felhasználásával [15].

*Western blot.* Denaturált mikroszómát (10–20  $\mu$ g fehérje) 0,1% SDS, 7,5% poliakrilamid gélen futtattuk (16). Nitrocellulózra történő transzfer és blokkolás után (17) (PBS; pH 7,4; 0,1% (v/v) Tween-20 és 7,5% laktalbumin) a PBS-T oldatban hígított antitestekkel (Anti-P450 2E1 (1:200), RAL (1:30000) or  $R_{10}$  (1:500)) inkubáltuk a membránt 1–2 órán át. Végül tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel és ECL oldattal (Enhanced Chemi-Luminescent, Amersham) tettük láthatóvá az eredményt.

*RNS izolálás és Northern blot.* Teljes RNS-t izoláltunk guanidin tiocianátos módszerrel [18]. Agaróz gélelektroforézis és nylon membránra történő transzfer után a membránt  $^{32}$ P-vel jelölt humán eredetű UGT 1A1 próbával hibridizáltuk [19].

*Metabolitok mérése.* *p*-Nitro-fenol UGT aktivitásméréséhez a mikroszómát 5 mM UDP-glukuronsav és 100  $\mu$ M *p*-nitro-fenol jelenlétében inkubáltuk 30 percig 37 °C-on. A triklór-ecetsavas kicsapás utáni felülúszóban mért *p*-nitro-fenol fogyásból számítottuk az enzimaktivitást [20]. A bilirubin UGT aktivitás mérésekor a mikroszómát 10 mM UDP-glukuronsav és 122  $\mu$ M bilirubin jelenlétében inkubáltuk (30 perc, 37 °C) sötétben. A reakciót 2 M glicin/HCl, pH 2,7 adásával állítottuk le, és mértük a bilirubin koncentrációját [21]. A szérum glukózkoncentrációt UV-VIS hexokináz módszerrel [22], acetonszintet Urbach reakcióval mértük [23].

*Egyéb.* A mikroszómális fehérjekoncentrációt Bio-Rad fehérjemérő oldattal határoztuk meg. Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba formában fejeztük ki és a statisztikai számításokat Student *t*-teszttel végeztük.

## Eredmények

### *UGT1A1 indukciója spontán diabéteszes BB/Wor patkányokban*

Egészséges és diabéteszes BB/Wor patkányok máj mikroszómáját vizsgáltuk. A beteg állatok polydipsia, polyuria és fogyás tüneteit, valamint emelke-

dett vércukor- és acetonszinteket mutattak (*I. táblázat*). A diabéteszes patkányokban magasabb konjugált szérum bilirubinszintet mértünk (*I. táblázat*), bár az összbilirubinszint nem változott. A beteg patkányokban a P450 2E1 mennyisége megemelkedett (*1.A ábra*), ami megfelel korábbi eredményeknek [3]. A RAL antitesttel végzett Western blot, amely kimutatja az UGT1 család két tagját (54 kD bilirubin- és 53 kD fenol UGT) és az UGT2 család két tagját (52 kD androszteron- és 50 kD tesztoszteron UGT) [13], azt mutatta, hogy az UGT1 izoenzimek mennyisége nő a diabéteszes állatokban (*1.B ábra*). A bilirubin UGT-re specifikus ( $R_{10}$ ) antitesttel végzett Western blot megerősítette, hogy a bilirubin UGT indukálódott cukorbetegségben (*1.C ábra*). A mikroszóma bilirubin UGT aktivitása hétszeresen fokozódott, míg a *p*-nitro-fenol glukuronidáció nem változott jelentősen (*I. táblázat*). Northern blotot kimutatható, hogy az UGT1A1 mRNA mennyisége emelkedett a diabéteszes állatokban (*2. ábra*). A cukorbetegség tehát fokozott UGT1A1 géntranszkripciót okoz, ami fokozott enzimaktivitással jár, bár az mRNA- és fehérjestabilizáció sem zárható ki.

### *UGT1A1 expresszió és aktivitás változása acetonekezelés és éhezés hatására*

Acetonekezelés vagy éhezés kiválthat néhány diabéteszben jelentkező tünetet és/vagy anyagcsere zavart. A vércukorszint jelentősen csökkent 96 órás éhezés után (*II. táblázat*), amelyet jelentős testsúlycsökkenés kísért. Az acetonszint megemelkedett mind az éhező, mind az acetonekezelt állatokban (*II. táblázat*). Enyhe emelkedést tapasztaltunk az acetonnal kezelt állatok szérum direkt bilirubin (bilirubin glukuronid) koncentrációjában, de csökkenést az éhezőkében (*II. táblázat*). Az összbilirubin mindkét csoportban változatlan volt. Korábbi eredményekkel [3] összehangban a P450 2E1 expresszió mindkét csoportban megemelkedett (*3.A, 4.A ábrák*). Csak a bilirubin glukuronidáció aktivitása emelkedett az acetonnal kezelt (3,5-szeres) és az éhező (6,6-szeres) patkányok máj mikroszómájában, a *p*-nitro-fenol glukuronidáció nem változott (*II. táblázat*). RAL antitesttel végzett immunoblot az UGT1 izoenzimek emelkedését mutatta mindkét csoportban (*3.B, 4.B ábrák*). Az UGT1A1 izoenzim emelkedését a specifikus  $R_{10}$  antitest is megerősítette (*3.C, 4.C ábrák*). Az

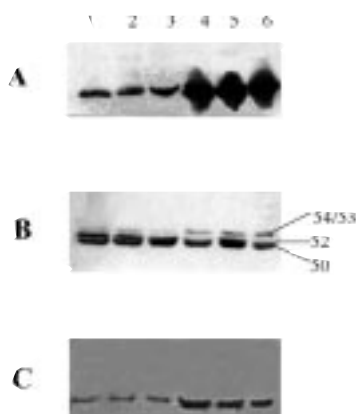
UGT1A1 mRNS-ének szintje is emelkedett az éhezõ állatok májában, de nem változott az acetonkezelt állatokéban, amint azt a Northern blot mutatja (5. és 6. ábrák). Éhezésben a fokozott UGT1A1 aktivitás, legalább részben, a fokozott génexpresszió következménye, míg acetonkezelés csupán az enzimfehérje mennyiségét fokozza.

### Következtetések

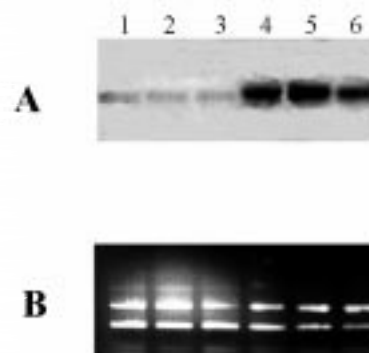
A bilirubin UGT fokozott aktivitását figyeltük meg diabéteszben, éhezésben és acetonkezelés hatására, ám az UGT1 géncsalád másik tagja (fenol UGT) ezekben az állapotokban nem változott (I. és II. táblázatok). A bilirubin UGT fokozott aktivitása enyhén emelte a szérumbilirubin-glukuronid kon-

centrációt diabétesz és acetonkezelés esetén, de éhezésben nem (I. és II. táblázatok). Az UDP-glukuronsav termelésének UDP-glukóz-ellátása és így a glukuronidáció is a máj glikogénraktárától függ [24]. Ez magyarázhatja, hogy éhezésben a bilirubin glukuronidáció nem fokozódott az UGT1A1 indukciójának dacára.

A bilirubin UGT aktivitásának fokozódását az enzim indukciójával magyarázhatjuk. Ezt támasztja alá a Western blottal kimutatott UGT1A1 fehérjemennyiség emelkedése (1, 3. és 4. ábrák). Korábban kimutatták, hogy alkil-ke-tonok aktiválják az UGT-t patkánymájban [27]. Mivel a ke-tonok felhalmozódása (amit az emelkedett szérumbilirubin-glukuronidáció mutat) mindhárom általunk vizsgált állapotban



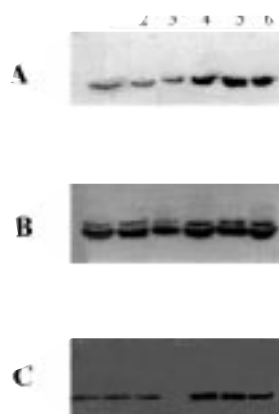
**1. ábra** Diabétesz hatása a máj mikroszóma citokróm P450 2E1 és UGT fehérjetartalmára. Denaturált patkánymáj mikroszomális fehérjeminták (10 vagy 20 µg) anti-P450 2E1- (A), RAL- (B) és R<sub>10</sub> (C) antitestekkel készült blotjai. A RAL antitest az 54 kD-os bilirubin-, az 53 kD-os fenol-, az 52 kD-os androszteron- és az 50 kD-os tesztoszteron UGT-eket ismeri fel, de csak három csík különíthető el. Az egészséges minták az 1–3 helyeken, a diabéteszes minták a 4–6 helyeken találhatók.



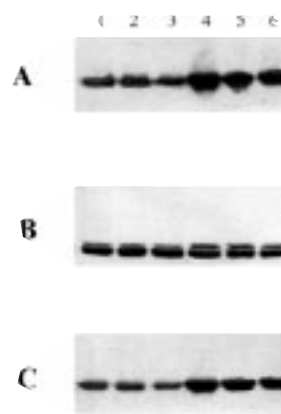
**2. ábra** Diabétesz hatása a máj bilirubin UGT mRNS tartalmára. Teljes patkány RNS (20 µg) α-<sup>32</sup>P dCTP-vel jelölt UGT1A1 cDNA próbával készült Northern blotjai. Az autoradiográfia az UGT1A1 mRNS-t mutatja (A). A felvitt RNS minták azonos mennyiségét etidium-bromidos festéssel mutatjuk ki (B). Az egészséges minták az 1–3 helyeken, a diabéteszes minták a 4–6 helyeken találhatók.

BB/Wor	szérumbilirubin-glukóz-koncentráció (mM)	szérumbilirubin-aceton-koncentráció (µM)	szérumbilirubin-direkt-koncentráció (µM)	p-nitro-fenol UGT aktivitás		p-nitro-fenol UGT latencia (%)	bilirubin UGT aktivitás		bilirubin UGT latencia (%)
				natív (nmol/perc/mg fehérje)	permeabilizált (nmol/perc/mg fehérje)		natív (nmol/perc/mg fehérje)	permeabilizált (nmol/perc/mg fehérje)	
kontroll	8,73 ± 0,68	0,37 ± 0,09	2,3 ± 0,3	1,10 ± 0,12	15,95 ± 0,46	93,12 ± 0,65	0,005 ± 0,001	0,231 ± 0,054	97,43 ± 0,82
diabétesz	28,24 ± 2,35*	1,34 ± 0,10*	3,6 ± 0,01	0,89 ± 0,06	16,03 ± 0,31	94,44 ± 0,27	0,018 ± 0,002*	1,816 ± 0,130*	99,02 ± 0,07

**I. táblázat** Diabétesz hatása néhány szérumbilirubinparaméterre és a máj mikroszomális UGT aktivitására. Egészséges és spontán diabéteszes patkányok szérumbilirubin-, aceton- és konjugált bilirubinszintjeit határoztuk meg. Az állatok májából mikroszómát állítottunk elő, és p-nitro-fenol és bilirubin UGT aktivitásokat mértünk az intakt, illetve alameticinnel (0,05 mg/mg fehérje) permeabilizált mikroszómában. (Az UGT latencia a natív és permeabilizált mikroszóma aktivitása közötti különbség a permeabilizáltban mérhető aktivitás százalékaként kifejezve.) A három-három állatból nyert adatok átlag ± standard hiba formában szerepelnek. Statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll és diabéteszes állatok adatai között: \*P<0,01.



**3. ábra** Mikroszomális P450 2E1 és UGT fehérjeszintje kontroll és éhező patkányok májában. Denaturált patkánymáj mikroszomális fehérjeminták (10 vagy 20  $\mu$ g) anti-P450 2E1- (A), RAL- (B) és R<sub>10</sub> (C) antitestekkel készült blotjai (ld. 1. ábra). A kontroll minták az 1–3 helyeken, az éhező állatok mintái a 4–6 helyeken találhatóak.



**4. ábra** Mikroszomális P450 2E1 és UGT fehérjeszintje kontroll és éhező patkányok májában. Denaturált patkánymáj mikroszomális fehérjeminták (10 vagy 20  $\mu$ g) anti-P450 2E1- (A), RAL- (B) és R<sub>10</sub> (C) antitestekkel készült blotjai (ld. 1. ábra). A kontroll minták az 1–3 helyeken, az acetonnal kezelt állatok mintái a 4–6 helyeken találhatóak.

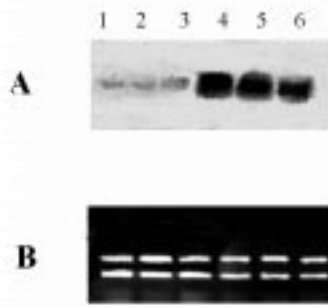
	szérum glukóz-koncentráció (mM)	szérum aceton-koncentráció (mM)	szérum direkt bilirubin-koncentráció ( $\mu$ M)	p-nitro-fenol UGT aktivitás		p-nitro-fenol UGT latencia (%)	bilirubin UGT aktivitás		bilirubin UGT latencia (%)
				natív (nmol/perc/mg fehérje)	permeabilizált		natív (nmol/perc/mg fehérje)	permeabilizált	
kontroll	8,56 $\pm$ 0,43	0,33 $\pm$ 0,06	2,1 $\pm$ 0,2	0,41 $\pm$ 0,16	16,08 $\pm$ 0,28	97,45 $\pm$ 1,00	0,006 $\pm$ 0,001	0,217 $\pm$ 0,031	97,21 $\pm$ 0,47
acetonnal kezelt	9,38 $\pm$ 0,70	1,69 $\pm$ 0,03 <sup>†</sup>	3,9 $\pm$ 0,3 <sup>†</sup>	0,39 $\pm$ 0,07	16,43 $\pm$ 0,23	97,60 $\pm$ 0,45	0,020 $\pm$ 0,002 <sup>†</sup>	0,762 $\pm$ 0,018 <sup>†</sup>	96,76 $\pm$ 0,87
96 órát éhező	6,49 $\pm$ 0,22	0,93 $\pm$ 0,10 <sup>†</sup>	1,2 $\pm$ 0,05 <sup>†</sup>	0,40 $\pm$ 0,08	16,20 $\pm$ 0,02	97,53 $\pm$ 0,52	0,028 $\pm$ 0,005 <sup>†</sup>	1,439 $\pm$ 0,042 <sup>†</sup>	97,94 $\pm$ 0,36

**II. táblázat** Acetonkezelés és éhezés hatása néhány szérumparaméterre és a máj mikroszomális UGT aktivitására. Kezeletlen, öt napig acetonnal kezelt és 96 órán át éhező patkányok szérum glukóz-, aceton- és konjugált bilirubinszintjeit határoztuk meg. Az állatok májából mikroszómát állítottunk elő, és p-nitro-fenol és bilirubin UGT aktivitásokat mértünk az intakt, illetve alameticinnel (0,05 mg/mg fehérje) permeabilizált mikroszómában. (A latencia meghatározását ld. az I. táblázat szövegében.) A 3-3 állatból nyert adatok átlag  $\pm$  standard hiba formában szerepelnek. Statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll és kezelt állatok adatai között: \*P<0,05; <sup>†</sup>P<0,02; <sup>‡</sup>P<0,01.

megfigyelhető, feltételezhető a ketontestek szerepe a bilirubin UGT indukciójában (I. és II. táblázatok). Az UGT1A1 mRNS emelkedése csak diabéteszben és éhezésben volt kimutatható Northern blotlalt (2. és 5. ábrák). Vagyis korábbi megfigyelésekkel összhangban, a ketonok (aceton) önmagukban közvetlenül aktiválják vagy stabilizálják az UGT1A1 fehérjét (6. ábra) [28]. Bár a glukózhiány és/vagy a következményes hormonszintváltozások diabéteszben és éhezésben képesek indukálni a bilirubin UGT-t mRNS szinten (2. és 5. ábrák), a ketontestek ezen állapotokban is hozzájárulnak a bilirubin UGT aktivitásának fokozásához.

Az UGT expresszió az egyedfejlődés során változik [5]. Kimutatták, hogy a magzati patkánymájban csak fenol UGT található, a többi UGT születés után

jelenik meg [29]. A bilirubin UGT aktivitása születés után folyamatosan fokozódik és az első hónap vége felé éri el a maximális aktivitását [5]. Az emberi UGT enzimek közül is csupán egy van jelen teljes aktivitással a magzati májban [30,31]. A többi UGT (beleértve a bilirubin UGT-t) fetális szintje kevesebb mint 20%-a a felnőttének [31]. Az UGT1A1 aktivitása fokozatosan nő a születés után [30,31]. Az újszülöttek indirekt hiperbilirubinémiája az elégtelen bilirubinkonjugáció következménye [32]. Az UGT1A1 születéskori indukciójának szabályozó tényezői nem teljesen ismertek, bár a kortikoszteroidok [33] és a tiroid hormonok [34] szerepe feltételezhető. A diabéteszben és éhezésben fellépő hormonális és metabolikus változások hasonlítanak a születés utáni állapothoz. Az anyai glukózellátás hirtelen megszűnése az endogén glukóz



**5. ábra** Kontroll és 96 órát éhező patkányok májának bilirubin UGT mRNS tartalma. Teljes patkány RNS (20  $\mu$ g)  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP-vel jelölt UGT1A1 cDNA próbával készült Northern blotjai. Az autoradiográfia az UGT1A1 mRNS-t mutatja (A). A felvitt RNS minták azonos mennyiségét etidium-bromidos festéssel mutattuk ki (B). A kontroll minták az 1–3 helyeken, az éhező minták a 4–6 helyeken találhatók.

gyors mobilizálását teszi szükségessé. Születéskor a glukagonszint 3–5-szörösére emelkedik, az inzulin koncentrációja pedig leesik és alacsony szinten marad napokig [35,36]. Ezek a hormonális változások glikogénlebomlást, glukoneogenezist és ketogenezist váltanak ki [35,36], és előidézhetik a bilirubin UGT indukcióját. A metabolikus tényezők – főként a fokozott ketontesttermelés – hozzájárulhatnak az UGT1A1 közvetlen aktiválásához és/vagy stabilizálásához.

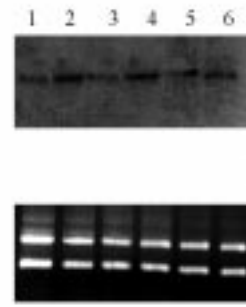
### Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Szénási Valériának a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét. Köszönjük Prof. Arthur Cederbaumnak (The Mount Sinai Medical Center, New York, NY) az anti-P450 2E1 poliklonális antitestet. Ezt a munkát az OTKA (Országos Tudományos Kutatási Alap) és a Népjóléti, valamint az Oktatási Minisztérium támogatta.

*Rövidítések listája:* BB/Wor, BioBreeding/Worcester patkány; ECL, Enhanced Chemi-Luminescent; RAL, patkány máj UGT elleni antitest; R<sub>10</sub>, anti-UGT1A1 antitest; P450, citokróm P-450; SDS, nátrium-lauril-szulfát; UGT, UDP-glukuroniltranszferáz.

### Irodalomjegyzék

[1] Thomas, P.E., Bandiera, S., Maines, S.L., Ryan, D.E., Levin, W. (1987) *Biochemistry*, **26**: 2280-2289.  
 [2] Ioannides, C., Bass, S.L., Ayrton, A.D., Trinick, J., Walker, R., Flatt, P.R. (1988) *Chem. Biol. Interact.*, **68**: 189-202.  
 [3] Koop, D.R., Tierney, D.J. (1990) *Bioessays*, **12**: 429-435.  
 [4] Koop, D.R., Casazza, J.P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**: 13607-13612.  
 [5] Clarke, D.J., Burchell, B. (1994) In: *Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity* (Kauffman, F.C., Ed) Volume 112 (Springer-Verlag, Budapest) pp. 3-43.  
 [6] Samson, D., Halliday, D., Chanarin, I. (1976) *Lancet*, **2**: 256.  
 [7] Waltman, R., Bonura, F., Nigrin, G., Pipat, C. (1969) *Lancet*, **2**: 1265-1267.



**6. ábra** Acetonkezelés hatása a máj bilirubin UGT mRNS tartalmára. Teljes patkány RNS (20  $\mu$ g)  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP-vel jelölt UGT1A1 cDNA próbával készült Northern blotjai (ld. 2. ábra). Az autoradiográfia az UGT1A1 mRNS-t mutatja (A). A felvitt RNS minták azonos mennyiségét etidium-bromidos festéssel mutattuk ki (B). A kontroll minták az 1–3 helyeken, az acetonnal kezelt minták a 4–6 helyeken találhatók.

[8] Dioguardi, N., Ideo, G., Del Ninno, E., de Franchis, R. (1970) *Lancet*, **1**: 1063.  
 [9] Ideo, G., de Franchis, R., Del Ninno, E., Dioguardi, N. (1971) *Experientia*, **27**: 24-25.  
 [10] Burchell, B., Nebert, D.W., Nelson, D.R., Bock, K.W., Iyanagi, T., Jansen, P.L.M., Lancet, D., Mulder, J., Roychowdhury, J., Siest, G., Mackenzie, T.R. (1991) *DNA Cell. Biol.*, **10**: 487-494.  
 [11] Eisenbarth, G.S. (1986) *New Engl. J. Med.*, **314**: 1360-1368.  
 [12] Mordes, J.P., Desemone, J., Rossini, A.A. (1987) *Diabetes Metab. Rev.*, **3**: 725-750.  
 [13] Coughtrie, M.W.H., Burchell, B., Shepherd, I.M., Bend, J.R. (1987) *Mol. Pharmacol.*, **31**: 585-591.  
 [14] Burchell, B. (1978) *Biochem. J.*, **173**: 749-757.  
 [15] Burchell, B. (1982) *Biochem. J.*, **201**: 653-656.  
 [16] Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**: 680-685.  
 [17] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.  
 [18] Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.  
 [19] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York) section 7.39-7.52.  
 [20] Bock, K.W., Burchell, B., Dutton, G.J., Hanninen, O., Mulder, O.J., Owens, I.S., Siest, G., Tephly, T.R. (1983) *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 953-953.  
 [21] Walters, M.L., Gerarde, H.W. (1970) *Microchem. J.*, **15**: 231.  
 [22] Stein, M.W. (1963) In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed.) (Academic Press, New York) p. 117.  
 [23] Urbach, C. (1931) *Biochem. Z.*, **236**: 164.  
 [24] Bánhegyi, G., Garzó, T., Antoni, F., Mandl, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **967**: 429-435.  
 [25] Morrison, H., Hawksworth, G.M. (1984) *Biochem. Pharmacol.*, **33**: 3833-3838.  
 [26] Watkins, J.B., Sherman, S.E. (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**: 1337-1343.  
 [27] Lalani, E.M.A., Burchell, B. (1979) *Biochem. Pharmacol.*, **177**: 993-995.  
 [28] Lalani, E.M.A., Weatherill, P.J., Kennedy, S.M.E., Burchell, B. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, **29**: 2367-2371.  
 [29] Scragg, I., Celier, C., Burchell, B. (1985) *FEBS Lett.*, **183**: 37-42.  
 [30] Leakey, J.E.A., Hume, R., Burchell, B. (1987) *Biochem. J.*, **243**: 859-861.  
 [31] Coughtrie, M.W.H., Burchell, B., Leakey, J.E.A., Hume, R. (1988) *Mol. Pharmacol.*, **34**: 729-735.  
 [32] Done, A.K. (1964) *Clin. Pharmacol. Ther.*, **5**: 432-479.  
 [33] Dutton, G.J. (1980) *Glucuronidation of drugs and other compounds*. (Boca Raton, Anonymous CRC Press)  
 [34] Labruere, P., Myara, A., Huguette, P., Foliot, A., Vial, M., Trivin, F., Odievre, M. (1992) *J. Pediat. Gastroentol. Nutr.*, **14**: 79-82.  
 [35] Ktorza, A., Bihoreau, M.T., Nuriyhan, N., Picon, L., Girard, J. (1985) *Biol. Neonate.*, **48**: 204-220.  
 [36] Girard, J. (1990) *Biol. Neonate.*, **58** (suppl.1): 3S-15S.

# Vas-kén fehérje bioszintézis – a mitokondrium esszenciális funkciója

## Biosynthesis of iron-sulfur proteins – the essential function of mitochondria

*Kispál Gyula*

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Biokémia Intézet,  
7624 Pécs, Szigeti út 12.

### Összefoglalás

Eukarióta sejtekben a változatos funkciójú vas-kén fehérjék megtalálhatók a mitokondriumban, a citoplazmában és a sejtmagban. Bioszintézisük az utóbbi időben került a kutatások előterébe. A vas-kén komplex szintézis a mitokondrium mátrixterében indul. Ez az organelum tartalmaz egy prokarióta isc operon kódolt génekkel homológ bioszintetikus apparátust, amely magában foglal egy cisztein deszulfuráz aktivitású, szulfid-előállító enzimet, egy ferredoxint, néhány további, még nem analizált, de magasan konzervált fehérjét, valamint egy 70 és egy 40 kD molekulatömegű chaperont. Ez az apparátus végzi a mitokondriális mellett a citoplazma vas-kén fehérjeinek aktiválását is. Az extramitokondriális vas-kén fehérjék aktiválása a mátrixteré zártága miatt szükségessé tesz egy transzporter funkciót, amelyet az egyik mitokondriális ABC transzporter tölti be. Ez a kizárólag eukariótákban előforduló típusa az ABC transzportereknek – élesztőben *Atm1p*, emberben *hABC7* – feltételezhetően a szulfid, vagy a vas és szulfid együttes exportját végzi a mátrixból.

A vas-kén komplex bioszintézist végző gének többsége esszenciális, deléciójukat követően a sejtek elveszítik életképességüket. Ez bizonyította a mitokondrium első esszenciális funkcióját, továbbá felhívta a figyelmet további, ma még nem ismert esszenciális funkciójú vas-kén fehérjék létezésére.

*Kispál, Gy.*

University Medical School, Institute of  
Biochemistry, 7624 Pécs, Szigeti út 12.

### Summary

In eukaryotic cells, iron sulfur proteins are localized in mitochondria, the cytosol and the nucleus. The biogenesis of these proteins has only recently become the focus of investigations. Mitochondria are the major site of iron-sulfur cluster biosynthesis in the cell. The organelle contains an Fe-S cluster biosynthesis apparatus that resembles that of prokaryotic cells. This apparatus consists of some ten proteins including a cysteine desulfurase producing elemental sulfur, a ferredoxin involved in reduction, and among other highly conserved proteins two chaperones. The mitochondrial Fe-S cluster synthesis apparatus assembles not only the mitochondrial Fe-S proteins but also initiates the formation of extramitochondrial Fe-S proteins. This involves the export of sulfur and possibly iron from the mitochondria to the cytoplasm, the reaction is performed by a mitochondrial ABC transporter, *Atm1p* in yeast and *hABC7* in humans. These ABC transporters characteristic for eukaryotes are localized in the inner membrane of the mitochondria.

Many of the mitochondrial proteins involved in the Fe-S biosynthesis are essential illustrating the first known essential mitochondrial function, also demonstrating that the Fe-S proteins are essential for life in eukaryotes, similar to those in prokaryotes.

### Bevezetés

A vas-kén komplex számos fehérjében előforduló, multifunkcionális proszтетikus csoport. Ilyen fehérjék megtalálhatók az evolúció mindhárom fő ágához tartozó élőlényekben, ezért joggal feltételezhető, hogy ez a proszтетikus csoport magával az élet-

tel együtt keletkezett, és megőrizte szerepének sokrétűségét [1]. Oxidációs-redukciós reakciókat katalizáló vas-kén fehérjékkel találkozunk a leggyakrabban. A komplex elektronfelvevő, -raktározó és -leadó képessége, valamint széles tartományban változó redox potenciálja lehetőséget ad arra, hogy a vas-

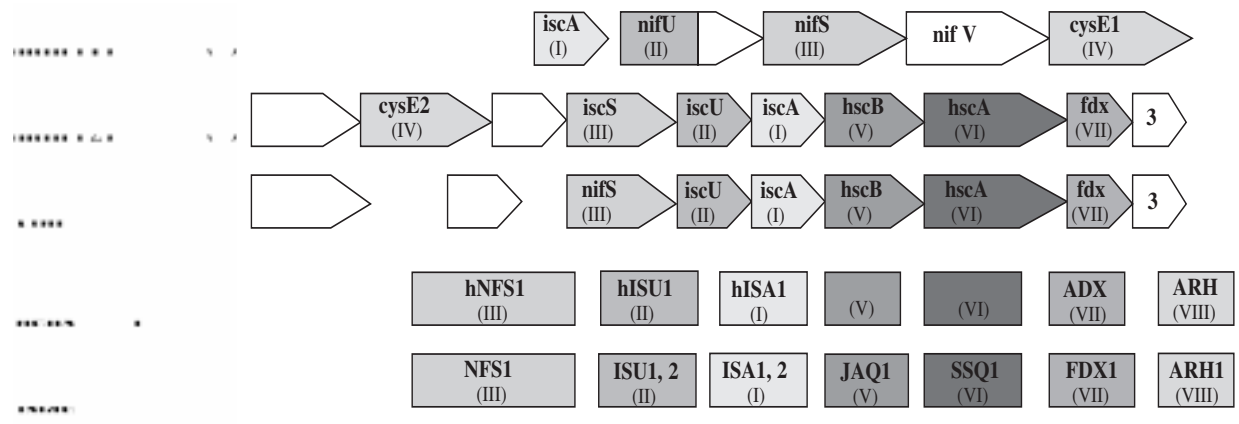
kén fehérjék a N<sub>2</sub> ammóniává történő redukciójától a szerves vegyületek hidroxilálásáig a reakciók széles spektrumát katalizálhassák [2]. Az izomerizációs reakciókat katalizáló vas-kén fehérjék egy további jelentős csoportot alkotnak, ezek egyik típusa az akonitáz enzim [3].

Az utóbbi időben vált ismertté a vas-kén fehérjék szenzor funkciója, ahol a fehérjén a vas-kén komplex kialakulását illetve elvesztését követő nagymértékű szerkezetváltozás szignálként szolgál. A bakteriális FNR és SoxR transzkripció faktorok vas-kén komplexe vasra, illetve szuperoxidionra érzékenyek, transzkripciót aktiváló hatásukat a komplex megléte (FNR) vagy oxidációs állapota (SoxR) határozza meg [4].

Magasabb rendű eukariótákban hasonló funkcióval a citoszólban elhelyezkedő akonitáz-homológ, az IRP (*iron regulatory protein*) rendelkezik, amely a sejtek vasfelvételét és -raktározását szabályozza. Alacsony celluláris vaskoncentráció mellett a fehérje vas-kén csoportja disszociál, ezzel az IRP elveszíti akonitáz aktivitását, és átalakul mRNS-kötő fehérjévé. A több mRNS-en is megtalálható rövid szekvencia motívum, az IRE (*iron responsive element*) az IRP specifikus kötőhelye. A transferrin receptor 3' végéhez kötődve az IRP gátolja az mRNS lebomlását, ezzel celluláris vashiány esetén fokozza a sejtek vasfelvételét. A transferrin receptor és ferritin mRNS-e mellett az eritropoetikus levulinát szintáz, az akonitáz és a szukcinát dehidrogenáz vas-kén csoportot tartalmazó alegység mRNS-e tartalmaz IRE-t [5].

Néhány enzimben a komplex a katalízisben nem vesz részt, kizárólag a fehérje aktív konformációját stabilizálja. Erre a legjobban ismert példa az *E. coli* endonukleáz III [6]. Eukariótákban vas-kén fehérjék legnagyobb számban a mitokondriumban fordulnak elő, de megtalálhatók a citoplazmában és a sejtmagban is [7].

A vas-kén komplex bioszintézisére az első adatokat az *Azetobacter vinelandii* nitrogenáz, a molibdént is tartalmazó, összetett szerkezetű vas-kén komplex-szel rendelkező enzim aktiválásának vizsgálata adta. A nitrogenáz aktiválását végző néhány enzimet, fehérjét is azonosítottak, ezek a Nif (*nitrogen fixation*) fehérjék [8]. Később vált ismertté az *A. vinelandii* *isc* (*iron sulfur cluster*) operon (1. ábra), amelynek génjei a sejt további vas-kén enzimeinek



**1. ábra** A vas-kén komplex bioszintézis génjei. Az *A. vinelandii* *nif* cluster (1) és *isc* operon (2), az *E. coli* *isc* operon, valamint a humán *hISU1* és *hISA1* EST szekvenciadarabok összeállítása. A homológokat szürke árnyalattal és azonos római számmal jelöltük a génnevek alatt.



**Kispál Gyula** 1981-ben végzett a Pécsi Orvostudományi Egyetemen, PhD (az orvostudományok kandidátusa) címet 1990-ben szerzett (Az enzim interakciók szerepe a citrátkör szabályozásában). 1981 óta a Pécsi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetében dolgozik, jelenleg docensi beosztásban. 1991-ben EMBO, 1993-ban Humboldt ösztöndíjat nyert. Kutatási területe a mitokondrium biogenezeise. Ezen belül a mitokondriális intermembrán térbe történő fehérjeimporttal és újabban a vas-kén fehérjék biogenezeisével, illetve az ezen folyamat zavara okozta betegségek pathomechanizmusának vizsgálatával foglalkozik.

aktiválását végzik, s a nitrogeáz aktiválásában nincs szerepük. Az *isc* operon génjei az eddig megismert prokariótában, továbbá az eukariótákban is konzerváltan megtalálhatók, ismeretük felbecsülhetetlen értékű segítséget nyújtott az eukarióta vas-kén komplex bioszintézis megismeréséhez [9].

### Nfs1p, a cisztein deszulfuráz

A vas-kén komplex bioszintézishez szükséges kén előállítását, a deszulfuráz reakciót, és ezzel a komplex szintézisének elindítását a prokarióta *IscS*, *NifS* fehérjék [10], illetve eukariótában ezek homológjai (élesztőben *NFS1p*) végzik [11]. Ezek a fehérjék a transzaminázok távoli rokonai, s utóbbi enzimekhez hasonlóan piridoxál-foszfátot kötnek. Reakciójuk során ciszteinből elemi kén és alanin képződik. Erősen redukáló közegben, DTT jelenlétében, kén helyett szulfidion lesz a reakció terméke [12]. A szabad ciszteinből származó kén a reakció első lépésében az enzim egyik cisztein maradékával perszulfidot alakít ki. Genetikai és biokémiai bizonyítékokkal alátámasztották, hogy az így mobilizált kén épül be a vas-kén komplexbe. A *nif* operonon kódolt *NifS* mutációja a nitrogeáz komplex aktiválás megszüntetéséhez vezet. *In vitro*, izolált *NifS* segítségével több bakteriális vas-kén fehérje apoproteinének aktiválását sikerült elérni cisztein és vas jelenlétében redukáló közegben [13].

A *NifS* funkciójához szükséges piridoxál-foszfátot kötő lizin és a deszulfuráz reakcióban részt vevő ciszteinmaradék az eukarióta homológokban is konzerváltan megtalálhatók, ezek az élesztő *Nfs1p*-ben a lys-299 és a cys-421. Az eukarióta és prokarióta deszulfurázok között az egyetlen lényeges különbség az eukarióta homológok *N*-terminálisán található aminosav-szekvencia, ami a mitokondriális irányító szekvenciákkal rokon [14]. E kiterjesztés a prokarióta fehérjékben nem figyelhető meg.

Kísérletesen, egyértelműen bizonyítani lehetett, hogy ez az eukarióta homológokra jellemző szekvenciárészlet valójában meghatározza az intracelluláris elhelyezkedést, és az élesztő *Nfs1p* kizárólag a mitokondrium mátrixterében található meg [14]. A későbbiekben ezt a megállapítást tőlünk függetlenül is megerősítették [15].

Az *NFS1* deléciója élesztőben letális következményekkel jár, a mutáns sejtek elveszítik életképességüket, ezért nem vizsgálhatók [16]. Az *Nfs1p*

funkció vizsgálata ezért promóter mutáns sejtek felhasználásával történt, amelyekben az *Nfs1p* fokozatosan depletálható a promóter repressziójával [14]. Az *Nfs1p* depléciójának korai következménye a mitokondriális vas-kén fehérjék aktivitásának megszűnése volt. Ezzel együtt az egyik citoszólban elhelyezkedő vas-kén fehérje, a *Leu1p* aktivitása is mérhetetlenül alacsony értékre csökkent. A vas *Leu1p*-be történő beépítésének meghatározása  $Fe^{55}$ -el történő jelölést követően immunprecipitáció segítségével is azt mutatta, hogy az enzim aktiválása megszűnt a *Nfs1p* depléciója során [11]. Az *Nfs1p* mitokondriális irányító szekvencia nélküli kifejezése az élesztősejtekben egy, a citoszólban lokalizálódó fehérjét eredményez, ami nem helyettesíti a mitokondriális enzim vas-kén bioszintézisben betöltött szerepét sem a mitokondriális, sem a citoszólban elhelyezkedő vas-kén fehérjék aktiválásában [14].

Az *E. coli* *NifS* homológ teljes mértékben komplementálta az *Nfs1p* depléció következményeit élesztősejtben, de ezt a funkciót kizárólag egy mitokondriális irányító szekvenciával történő fúziót követően volt képes elvégezni [14]. Ez kísérletesen bizonyította, hogy a prokarióta *NifS* fehérjék eukarióta homológja is deszulfuráz aktivitással rendelkezik, továbbá megerősítette az *Nfs1p* mitokondriális lokalizációjának funkcionális jelentőségét.

### Yah1p, egy 2Fe-2S ferredoxin

A prokarióta *isc* operonon kódolt és már részlegesen vizsgált 2Fe-2S ferredoxin az eukarióták mitokondriális ferredoxinjával mutat rokonságot. Ennek megfelelője élesztőben a *Yah1p* [17], emberben pedig egy mitokondriális ferredoxin ismert, az adrenodoxin, amelynek szerepe a szteroid hormon bioszintézis oldallánc-lehasító (*side chain cleavage*) és néhány mitokondriumban zajló hidroxiláz reakciójában már régóta ismert [18]. A *Yah1p*, hasonlóan az adrenodoxinhoz, kizárólag a mitokondriumban mutatható ki [19]. A mitokondriális lokalizációt a *Yah1p* *N*-terminálisán elhelyezkedő irányító szekvencia határozza meg.

A *YAH1* élesztőben esszenciális, deléciós mutáns sejtek elveszítik életképességüket. A *Yah1p* vas-kén fehérje biogenezisben betöltött szerepének vizsgálata regulátoros mutánsok felhasználásával történt [19]. Ezekben a sejtekben a *Yah1p* depléciója során mind a mitokondriális mind a citoszólban elhe-



lyezkedő vas-kén fehérjék aktivitása csökkent. A vas-kén fehérjék aktiválása, azaz a vasbeépítés is ezzel együtt megszűnt, bizonyítva, hogy az aktivitáscsökkenés nem a vas-kén komplex sérülésének a következménye ezekben a sejtekben, hanem a bioszintézis hiányáról van szó. Az *isc* operonon kódolt ferredoxinnak vas-kén fehérjék apoproteinjeinek aktiválásban betöltött szerepe is ismertté vált [20]. Az, hogy a vas-kén komplex bioszintézishez egy ferredoxin is szükséges, rámutat arra, hogy e proszretikus csoport előállításához már egy előzőleg létező vas-kén komplexre is szükség van, így szükséges önmagának az előállításához is.

A mitokondriális ferredoxinnak a vas-kén komplex bioszintézisben betöltött közvetlen szerepe ma még csak találgatások tárgya. Egy reálisan feltételezhető szerepe a deszulfuráz reakcióban lehet, ahol a Nfs1p-n létrejövő perszulfidból a szulfidion felszabadulásához szükséges redukáló ekvivalenseket szolgáltathatja, vagyis azt a redukciós hatást, amelyet az *in vitro* rendszerben DTT-vel értek el.

### További homológok

Az *isc* operonon kódolt *iscU* két homológja ismert élesztőben: az *Isu1p* és *Isu2p*. Mindkét közeli homológ fehérje a mitokondriumban található, és szerepük a vas-kén komplex szintézisben már bizonyított [21]. Vas-kén fehérje aktivitás defektus csak a két fehérje együttes depléciója esetén tapasztalható, azaz a két fehérje egymást kiegészítő funkcióval rendelkezik [22]. Funkciójukat még csak a mitokondriális vas-kén fehérjék esetén írták le. A fehérjék együttes deléciója letális, mutatva, hogy a sejtek számára az *Isu* funkció is, hasonlóan az *Nfs1p*-hez és a *Yah1p*-hez, esszenciális.

Az *IscA*-nak szintén két homológja található az élesztőben, az *Isa1p* és *Isa2p*. Jellemzőjük a két ciszteint tartalmazó *HesB* motívum [Pelzer, személyes közlés]. Mindkét élesztőfehérje jellemzően hosszabb a bakteriális homológoknál, ez az *N*-terminális kiterjesztés szerkezetileg megegyezik a mitokondriális irányító szekvenciákkal. Ez a megfigyelés nagyban valószínűsíti az *Isa* fehérjék mitokondriális lokalizációját. Funkciójuk a vas-kén bioszintézisben még nem ismert. Érdekességüket az adja meg, hogy ellentétben az előbbieken részletezett fehérjékkel, amelyek homológjai az archeákban, prokariótákban és eukariótákban is megtalálhatók, az *IscA* homológok előfordulása nem univerzális, jelenlétük archeákban nem mutatható ki.

Az *isc* operonon kódolt két chaperon fehérje a 70 és a 40 kD molekulatömegű hőszokk fehérjék csoportjába tartozik. Ezek homológjai élesztőben az *Ssq1p* és *Jaq1p*, s mindegyik bizonyítottan részt vesz a mitokondriális vas-kén fehérjék aktiválásában [23]. A *JAQ1* esszenciális, az *SSQ1* önmagában nem esszenciális, de deléciója a sejtek növekedését alapvetően befolyásolja. Az *SSQ1* deléció hatását a másik, már régóta ismert mitokondriális 70 kD molekulatömegű hőszokk fehérje, a *Ssc1p* magas szinten kifejezve képes pótolni, azaz a deléció letális következményeit elfedő extragenikus szuppresszorként működik [24]. A hőszokk fehérjék extramitokondriális vas-kén komplex szintézisben betöltött szerepét még nem vizsgálták.

### *Atm1p*, mitokondriális ABC transzporter

A szerkezeti és szekvencia-homológia alapján egy csoportba sorolható ABC transzporterek a fehérjéktől a kis molekulákig számos, kémiaiilag jelentősen különböző anyag membránon keresztüli transzportját képesek végrehajtani [25]. A transzporter-család jellemzője a magát a transzportot végrehajtó membrán domén és az ehhez kapcsolódó ATP kötő és hidrolizáló ABC (*ATP-binding cassette*) domén, ami az ATP hidrolízise útján az aktív transzporthoz szükséges energiát szolgáltatja. Ilyen transzporterek nagy számban megtalálhatók minden élő sejtben, eukariótákban a sejtmembránban, illetve a sejten belüli membránokban is [26]. Az élesztő *Atm1p*-je az első mitokondriális képviselője volt az ABC transzportereknek [11]. Az *Atm1p* transzporter membrándoménje a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el, a hidrofíli ABC domén a mátrix tér felé néz. Ez az elhelyezkedés arra enged következtetni, hogy a fehérje által katalizált transzport a mitokondrium mátrixából a citoplazma irányába történik.

A későbbiekben ismertté vált az *Atm1p* funkcionális humán homológja az *hABC7* [14], továbbá az egér és az *A. thaliana* homológ szekvenciája is megtalálható az adatbankban. Prokariótában, archeában (vagyis intracelluláris organellummal nem rendelkező sejtekben) ezzel szemben közeli homológ nem mutatható ki. Az *atm1* deléciós mutáns sejtek ugyan életképesek, de növekedésük már glukózt tartalmazó táptalajon is nagyon lassú, ami arra utalt, hogy az *Atm1p* a mitokondriális energiatermelésén túlmenő, alapvető funkciót tölt be a sejtek

életében [11]. Az *atm1* deléció mutánsok fenotípusának számos komponense vált ismertté a lassú növekedés mellett, ezek közül a jelentősebbek a hem-hiány, a citokrom biogenezis defektus, a fokozott oxidált glutationszint, a  $H_2O_2$  érzékenység és a nagyfokú mitokondriális vasfelhalmozódás [27]. A transzporter funkciójának megértéséhez a deléció mutáns sejtek egy később leírt jellemzőjének, a leucin auxotrófiának vizsgálata vezetett el [28].

Az *ATM1* deléciója során fellépő leucin auxotrófia oka a leucin bioszintézis egyik enzimének a Leu1p-nek inaktivitása volt. A Leu1p már jól jellemzett, a citoszólban elhelyezkedő, izopropil-malát izomeráz aktivitással rendelkező vas-kén fehérje. Inaktivitása arra utalt, hogy az *Atm1p* funkciója a citoszólban, vagyis az extramitokondriális térben elhelyezkedő vas-kén fehérjék aktiválásában keresendő. Ez az eredmény a következőkben a *ATM1* promóter mutáns sejtekkel is megerősítést nyert [14]. Itt az *Atm1p* depléciójának korai következményeként megfigyelhető volt a Leu1p aktivitásának, és ezzel együtt a fehérjébe történő vasbeépítésnek a megszűnése. Ebben a növekedési periódusban az *atm1* deléció mutánsokra jellemző további fenotípusos jelenségek nem fejlődtek ki, ezért ezek alapján elmondhatjuk, hogy az *Atm1p* közvetlen funkciója specifikusan az extramitokondriális vas-kén fehérjék aktiválásához szükséges.

### Az esszenciális mitokondrium funkció

A vas-kén komplex bioszintézis eukarióta útjának mechanisztikus részletei ma még nem ismertek, ennek ellenére, pusztán a bioszintézist végző komponensek egy részének ismerete is több, biológiailag jelentős következtetés levonását teszi lehetővé. Ennek a proszketikus csoportnak a szintézise eukariótákban is a prokariótákban megismert úton történik: homológ, azonos aktivitású fehérjék vesznek részt a folyamatban. Ezek a komponensek a mitokondriumban, az eukarióta sejtek bakteriális eredetű organellumában foglalnak helyet. A lokalizációnak funkcionális jelentősége van, más kompartmentben, így a citoszólban elhelyezkedő aktivitás a komplex bioszintézisének még részreakcióját sem képes végrehajtani.

A mitokondrium mátrixterében elhelyezkedő aktivitások végzik a mitokondriális és az extramitokondriális vas-kén fehérjék aktiválását is, ezért itt egy transzportfunkciónak kell kiegészíteni a bakteriális reakciósorozatot. Ezt a funkciót a kizárólag

eukariótákban megtalálható, mitokondriális elhelyezkedésű ABC transzporter látja el [14]. A transzportált szubsztrát még nem ismert, de az eddigi ismeretek alapján már bizonyítottan tekinthető, hogy csak a mitokondriumban képződő szulfid épülhet be a komplexbe. A szulfid mitokondriumból történő exportja ezek alapján szükségszerűnek tűnik. Ez – természetesen a szulfid kémiai tulajdonságai miatt – csak egy, az oxidációtól védő komplexált formában képzelhető el. A szulfid és a vas együttes exportja egy, a mátrixban már elkészült vas-kén komplex formájában szintén a reális lehetőségek közé tartozik. Ennek részjelenségére, azaz a vas mitokondriumból történő exportjára már vannak kísérletes bizonyítékok [29].

A vas-kén komplex bioszintézis eddigi vizsgálatának talán legmeglepőbb eredménye az, hogy e folyamat sérülései súlyosabb következménnyel járnak a sejtek életére, mint az eddig ismert nagyszámú mitokondriális folyamat bármelyikének hiánya. Már régóta ismert volt, hogy a mitokondrium esszenciális organellum, azonban az eddig ismert mitokondriális funkciók, az ATP-termelés vagy a változatos anaplerotikus reakciók elvesztése sem okozta a sejtek életképességének elvesztését.

Az *NFS1*, a *YAH1* és az *ISU1/2* gének deléciójának letális hatása többszörösen bizonyította, hogy az általuk katalizált reakciósorozat, a vas-kén komplex bioszintézis, a mitokondrium már régóta feltételezett egyik, először megismert esszenciális funkciója. Már ismert volt, hogy a vas-kén fehérje bioszintézis prokariótákban esszenciális jelentőségű [9]. Váratlan eredmény volt azonban az a megfigyelés, hogy ez a folyamat az eukarióta sejtek számára is esszenciális. Eukariótákban ugyanis az eddig ismert vas-kén fehérjék egyikének hiánya sem jár letális következményekkel. Ezek közül a legrészletesebben vizsgáltak a mitokondriális légzési lánc egyes fehérjéi, az akonitáz, az izopropil-malát izomeráz, vagy a magasabbrendűek citoszóljában található IRP. Ez a jelenség felhívja a figyelmet arra, hogy itt, a már ismerteken kívül további vas-kén fehérjék léteznek, amelyek funkciója a sejt számára életfontosságú. A fehérje adatbankok átvizsgálása során több vas-kén kötő motívumot tartalmazó fehérjét találhatunk, amelyeket még nem, vagy csak kevésbé vizsgáltak. Az érdekesebbek ezek közül a ferredoxin motívumot tartalmazó RN-áz L inhibitor [30] és az *E. coli* endonukleáz III eukarióta homológja [6]. Ezek minden eukariótában konzer-

váltak előforduló fehérjék, amelyek az aminosav-szekvencia analízise alapján az extramitokondriális térben helyezkednek el. Funkciójuk vizsgálata a mitokondrium és a sejt szimbiózisának bizonyíték, és nem metabolikus alapú területét tárja majd fel.

## Irodalomjegyzék

- [1] Beinert, H., Kiley, P.J. (1999) Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**: 152-157.
- [2] Beinert, H., Holm, R.H., Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*, **5326**: 653-653.
- [3] Fansler, B., Lowenstein, J.M. (1969) Aconitase from pig heart. *Methods Enzymol.*, **13**: 26-30.
- [4] Bauer, C.E., Elsen, S., Bird, T.H. (1999) Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**: 495-523.
- [5] Hentze, M.W., Kuhn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 8175-8182.
- [6] Alseth, I., Eide, L., Pirovano, M., Rognes, T., Seeberg, E., Bjoras, M. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **19**: 3779-3787.
- [7] Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol. Chem.*, **380**: 1157-1166.
- [8] Roll, J.T., Shah, V.K., Dean, D.R., Roberts, G.P. (1995) Characteristics of NIFNE in *Azotobacter vinelandii* strains. Implications for the synthesis of the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **270**: 4432-4437.
- [9] Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, **273**: 13264-13267.
- [10] Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallo-cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 2754-2758.
- [11] Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., Lill, R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.*, **418**: 346-350.
- [12] Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Dean, D.R. (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry*, **33**: 4714-4720.
- [13] Zheng, L., Dean, D.R. (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18723.
- [14] Csere, P., Lill, R., Kispal, G. (1998) Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p. *FEBS Lett.*, **441**: 266-270.
- [15] Li, J., Kogan, M., Knight, S.A., Pain, D., Dancis, A. (1999) Yeast Mitochondrial Protein, Nfs1p, Coordinately Regulates Iron-Sulfur Cluster Proteins, Cellular Iron Uptake, and Iron Distribution. *J. Biol. Chem.*, **274**: 33025-33033.
- [16] Kolman, C., Soll, D. (1993) SPL1-1, a *Saccharomyces cerevisiae* mutation affecting tRNA splicing. *J. Bacteriol.*, **175**: 1433-1442.
- [17] Barros, M.H., Nobrega, F.G. (1999) YAH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene*, **233**: 197-203.
- [18] Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Lancaster, J.R.J., Salerno, J.C., Kamin, H. (1985) Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Mol. Cell Biochem.*, **45**: 13-31.
- [19] Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., Lill, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**: közlésre benyújtva.
- [20] Jung, Y.S., Gao-Sheridan, H.S., Christiansen, J., Dean, D.R., Burgess, B.K. (1999) Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J. Biol. Chem.*, **274**: 32402-32401.
- [21] Fu, W., Jack, R.F., Morgan, T.V., Dean, D.R., Johnson, M.K. (1994) nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry*, **33**: 13455-13463.
- [22] Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E., Culotta, V.C. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.*, **4**: 897-890.
- [23] Knight, S.A., Sepuri, N.B., Pain, D., Dancis, A. (1998) Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **273**: 18389-18393.
- [24] Craig, E.A., Voisine, C., Schilke, B. (1999) Mitochondrial iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.*, **10**: 1167-1167.
- [25] Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**: 67-113.
- [26] Gottesman, M.M., Pastan, I., Ambudkar, S.V. (1996) P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**: 610.
- [27] Lange, H., Kispal, G., Lill, R. (1999) Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **274**: 18989-18996.
- [28] Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.*, **14**: 3981.
- [29] Radisky, D.C., Babcock, M.C., Kaplan, J. (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J. Biol. Chem.*, **274**: 4497-4499.
- [30] Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., Salehzada, T. (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J. Biol. Chem.*, **270**: 13308-13317.



18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology  
 "Beyond the Genome" – Understanding and Exploiting Molecules and Cells in the 3rd Millennium  
 IUBMB/FEBS Congress 2000  
 (International Conference Centre (ICC), Birmingham, UK, 16–20 July 2000)

The Biochemical Society is hosting this 18th International Congress which is, for the first time, sponsored jointly by IUBMB, FEBS and the Biochemical Society. The full programme is now available at <http://www.iubmb2000.org/programme/programme.cfm?meetno=iubmb2000>

Visit our web site NOW to view this exciting and topical science programme and please – bring it to the attention of your colleagues. Posters are welcome on all topics and the deadline for submission of abstracts is 14th April 2000. You can register online from the web pages. Please contact us at [info@iubmb2000.org](mailto:info@iubmb2000.org) if you need further information or advice. We look forward to seeing you at the ICC in the city of Birmingham in July.

Keith Gull, Chair, Programme Committee  
 IUBMB/FEBS Congress 2000, The Biochemical Society  
 59, Portland Place, London, W1N 3AJ, England, UK  
 Tel.: (+44) (0)207 580 3481 Fax: (+44) (0)207 637 7626 e-mail: [info@iubmb2000.org](mailto:info@iubmb2000.org)

## A veszélyes géntechnika?

Az ember már évszázadok óta próbálkozik a maga számára leghasznosabb növényfajok kiválogatásával, létrehozásával. Erre régi, jól bevált technika a nemesítés. E módszert régóta elismerik, a nemesítéssel létrehozott növények széles körben elterjedtek, s nap mint nap fogyasztjuk őket. Ezzel az átlagember is tisztában van, az azonban kevésbé tudatosult a közvéleményben, hogy egy-egy keresztezésnél két, teljesen ismeretlen génhalmazt gyúrnak össze. Az eredményt csak a fenotípusból sejtethetjük, s a későbbi szelektálás is ez alapján történik. Így fogalmuk sincs arról, hogy a keresztezési partner vad faj esetlegesen káros, eddig meg nem nyilvánult génjeiből hányat és melyeket hordoz az új fajjelöltünk, hiszen gének ezreinek nem vizsgáltuk meg a géntermékét az új jelöltben, mivel nem is tudjuk pontosan, hogy miket is kellene vizsgálnunk. Ennek ellenére a mezőgazdaság igen sokat köszönhet a nemesítőknek. Napjainkban – már közel 20 éve – azonban megjelent egy új ágazat, a géntechnológia. S fejlődésével együtt nőtt az ellene irányuló – többnyire alaptalan – támadások száma. Ezen vádak közé tartozik a génmanipulált növények emberi szervezetre gyakorolt káros hatása is. Amelyek aligha hitelt érdemlőek, hiszen a géntechnológiai „iparban” – akárcsak a növény-nemesítésnél – minden transzgenikus növényt valamilyen jól körvonalazott céllal állítanak elő – pl. gyomirtószerezisztencia, szárazságtűrés, lassúbb érés, magasabb fehérjetartalom stb. –, ehhez pedig igen pontosan meghatározzák a kívánt hatás eléréséhez szükséges fehérjét és az azt kódoló DNS szakaszt (a szabályzó régiókkal együtt). Így ismerik a beépített génen kódolt fehérje hatásait is, hiszen egy-egy gént a felhasználás előtt hosszasan vizsgálnak. Ellenőrizhető és irányítható az is, hogy a gén a növény eredeti genomjában hova épül be, míg a nemesítésnél csak a véletlen és a genetika szabályai diktálnak. Tehát a génmanipulációnál a nemesítéssel ellentétben ellenőrzött körülmények között történik meg a génbevitel. Ha bármilyen genetikai hiba, átrendeződés, mutáció stb. adódik, az az első molekuláris vizsgálaton kiderül, és az ilyen növényeket kiselejtezik. A továbbvitt transzgenikus növények pedig újabb és újabb vizsgálatokon esnek át egészen addig, amíg csak azok az egyedek maradnak meg, amelyekben akkor, olyan mértékben, ott

és úgy működik a bevitt új gén, ahogy azt az elején elterveztük. Tehát a nemesítés során meglévő többgenerációs szelekciós idő a géntechnológiában is jelen van. Bár még e biztonsági tényezők mellett sem lehet százszázalékos biztonságot elérni – hiszen az emberi tényező sosem elhanyagolható –, az így készült növény azonban sokkal biztonságosabb, mint a nemesítéssel előállított változata, mely utóbbi pedig mindig is gyanún felül elfogadott volt az élelmiszerpiacon, noha szinte ellenőrizhetetlen génkészlettel – köztük esetleg káros génekkel – dolgozik. Szándékosan karcinogén transzgént tartalmazó élőlény előállítása pedig épeszű embernek vagy géntechnológiai cégnek nem lehet érdeke, ha csak nem hadászati célból teszi ezt, ez azonban nem azonos lapra tartozik a mezőgazdasági hasznos növények előállításával. Ennek szabályozása már a törvényhozók feladata, nem a tudóstársadalom felelőssége.

A sajtónak azonban annál inkább feladata a hiteles tájékoztatás. A Pusztai-ügy elindítója is a sajtó volt, amikor egy félkész kutatás eredményeit tényként közölte, holott maga Pusztai Árpád sem tekintette kísérletsorozatát befejezettnek. A legtöbb ember tájékozatlan a géntechnológia kérdésében, s így könnyen befolyásolható. Sokakban a géntechnológiától való félelem oka a technika bonyolultsága, ez azonban megfelelő tájékoztatással kiküszöbölhető, orvosolható. Tehát a géntechnológia sorsa igen nagy mértékben a médiától is függ. A médiától függ, hogy a tudósoknak a részeredmények magyaráztatására, vagy még tökéletesebb, még hatékonyabb, még biztonságosabb, az emberiség hasznát szolgáló technológiák létrehozására kell fordítani erejüket. S a médiától függ, hogy az emberek szabadon eldönthetik-e a génmanipulált élelmiszerek létjogosultságát, s esetleg megoldható az emberiség ellátása – az éhínségek felszámolása –, vagy ok nélkül elijesztik az embereket áltudományos hírekkel. Ily módon kialakulhat egy olyan egészséges ellenőrzési rendszer mely nemcsak a mezőgazdaság fejlődését, hanem az ember és a természet harmóniáját is elősegíti.

*Jenes Barnabás és Halász Gergely*

# GM élelmiszerek detektálása: a tudomány jelenlegi állása

*Food Control* Vol. 10, No. 6, 1999. december

(Kiadványismertetés)

**Elsevier Science, New York – ILSI Europe, Brussels, 1999**

A *Food Control* folyóirat 1999. decemberi száma az ILSI (International Life Sciences Institute) Europe és ILSI International Food Biotechnology Committee által összehívott tudományos fórumon genetikailag módosított (GM) élelmiszerek detektálásáról elhangzott előadásokat ismerteti. A workshop célja az alábbi témakörök vizsgálata volt:

1. Helyes mintázási stratégiák és mintakészítési módszerek
2. GMO-k és származékaik detektálására jelenleg használt fehérjealapú és rekombináns DNS-alapú módszerek fejlesztése és alkalmazása
3. Validálási kritériumok és a detektálási módszerek teljesítményének becslése
4. Standard referenciaanyagok kritériumai és készítése
5. A GMO-k küszöbértékének meghatározására vonatkozó egyéb tudományos szempontok

Az egyenként is áttekinthető jellegű cikkek mondani valója tömörített formában az alábbiakban összegezhető. A DNS-alapú analitikának nagy kihívást jelent a genetikailag módosított DNS detektálása élelmiszerekben. A módszerek fejlesztése hozzávetőleg négy évvel ezelőtt kezdődött, és a különböző intenzitású nemzeti fejlesztéseken kívül létezik egy 12 európai országból 24 laboratóriumot tömörítő Európa-szintű program, amely PCR-alapú módszerek, automatikus rendszerek, alternatív megközelítések és adatbázis fejlesztésére irányul. A 35S promotor és NOS terminátor szekvenciákat detektáló screening módszerek széles körben elterjedtek, azonban a pozitív eredményt meg kell erősíteni az egyedi génkonstrukciót meghatározó specifikus assay-vel. A kvantitatív módszerek száma csekély, ugyanakkor az EU jelölési kötelezettség és a laboratóriumok közötti szórást drámaian csök-

kentő hatásuk miatt fejlesztésük különösen fontos. Előnyük a korlátozott érzékenységgel és specifikus screening módszerekkel szemben, hogy referencia standardokkal könnyen ellenőrizhetők. A GM élelmiszerek számának gyors növekedése a jövőben multidetektáló rendszerek kifejlesztését igényli, ugyanakkor a szükséges szekvenciainformáció a GMO előállítójától származik, így hivatalosan nem engedélyezett GMO detektálása nagy valószínűséggel nem lehetséges. A mai napig nincs nemzetközileg validált módszer transzgenikus növények detektálására élelmiszerekben. A kereskedelmi forgalomban lévő GM élelmiszereket és az azonosításukhoz szükséges információkat tartalmazó adatbázis 1999 októberére készült el.

A PCR-alapú detektáló módszerek legfontosabb előfeltétele a bevezetett idegen génkonstrukció teljes ismerete, ugyanakkor a GMO-tartalom meghatározásának döntő lépése a mintavétel és mintakészítés, amin belül kritikus pontot képez a minta homogenitása (körvizsgálatban a laboratóriumok közötti legnagyobb eltérést a nem megfelelő homogenizálás okozta), a „DNS minősége”, azaz degradációjának mértéke, valamint a DNS tisztasága és hozama.

A fehérjealapú módszerek fejlesztésének jelenlegi szakaszában nincs jelentősége az immunoassay érzékenységének, mivel a kívánt érzékenység nagyszámú módszerrel elérhető, de az extrém érzékenység kontaminációs problémákat vet fel. Az extrakció optimalizálása és az assay érzékenységének növelése után Western blot technikával detektálható például az a célzott génmódosítás révén termeltetett enzim, mely a glifozát toleranciáért felelős, mennyisége pedig ELISA-val mérhető.

Az ismertetés nem tudott kitérni az analitika és módszerfejlesztés szempontjából igen értékes és elgondolkodtató részletekre, megoldásokra és problémafelvetésekre, amelyekben ez a szám különösen gazdag, és hosszú ideig a terület vezérfonala lehet.

*Szamos Jenő*

## Az első „Hőgyes Délután”

A Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Hőgyes előadójában 2000. február 8-án rendezték meg a „Hőgyes Délutánok” keretében az első előadóülést. Az előadás-sorozat a gyógyszerészeti tudományokkal kapcsolatos legújabb eredmények és várható trendjeinek bemutatására teremt rendszeres fórumot. A téma fontosságát jól mutatja a nagy érdeklődés: a hallgatóságban nem kis számban voltak jelen a gyógyszerkutatásban és gyógyszerészetben érdekelt kiváló hazai szakemberek. Az ülést a három rendező szervezet nevében Vincze Zoltán, az Egyetemi Gyógyszertár igazgatója, a Gyógyszerésztudományi Kar dékánja, Mátyus Péter, a Szerves Vegytani Intézet igazgatója, a Magyar Kémikusok Egyesülete Szerves- és Gyógyszerkémiai Szakosztályának elnöke, valamint Hermeicz István, a Chinoin osztályvezetője, a MTA Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Munkabizottságának elnöke nyitották meg. Vincze Zoltán örömet fejezte ki az előadás-sorozat megindításáért, s javasolta, hogy e fórumon vitassák majd meg a gyógyszerészet általános és aktuális problémáit, úgymint a szakma helyzete, kilátásai; a hazai gyógyszerészképzés jelene és jövője. Mátyus Péter megemlítette, hogy az előadás-sorozat a sikeres Bruckner-termi előadások mintájára jött létre, és hozzátette, hogy a nagyszámú hallgatóság jelenléte igazolja is az igényt az ilyen típusú előadások iránt. Hermeicz István elmondta, hogy a szervezők a továbbiakban is hasonló színvonalú és látogatottságú üléseket szeretnének megrendezni.

Az első előadásban Blaskó Gábor az EGIS kutatási igazgatója „A kémiai kutatás szerepe a gyógyszeripari innovációban” című előadásában az elmúlt tíz év alatt a gyógyszerkutatásban végbement jelentős szemléleti és kémiai metodikai változásokat foglalta össze. Korábban a kémia szinte a „vezető” tudományterület volt. Mára a helyzet megfordult, a kémia mintegy „kiszolgálja” a biológiát és az orvostudományt. Hatalmas tőkekoncentrációval óriáscégek jönnek létre a gyógyszeriparban (Novartis, SmithKline-Glaxo), és a tőkeerős cégek egyre nagyobb pénzüsségeket fordítanak új gyógyszerek kifejlesztésére. Ez azonban különösen jövedelmező befektetés, mert a legnagyobb profitot termelő iparág a gyógyszergyártás. (Jövedelmezőbb, mint pl. az üdítőital-gyártás vagy a számítástechnika). A kémiai módszerek fejlődése új módszerek kifejlesz-

tésével párosul. Ezek közül az egyik legjelentősebb a Furka Árpád nevéhez kapcsolódó kombinatorikus kémia. A polimerhordozós szintetikus módszerek és az aszimmetrikus szintézisek területén is jelentős fejlődés ment végbe. A nagyszámú molekula gyors tesztelésére alkalmas automatizált módszerek révén hatékonyan lehet vezérmolekulához jutni, amelynek optimalizálásához számítógépes modellezési technikák nyújtanak segítséget. Egy új gyógyszer kifejlesztése során azonban csak az első lépés a hatékony molekula megtalálása és szintézise. Ezt követik a nagyon költséges klinikai vizsgálatok. A kémia szerepe az innovációs láncban tehát átalakulóban van, jelentősége látszólag csökken, de természetesen a korszerű gyógyszerkutatás számára is nélkülözhetetlen tudományterület jelent.

Gráf László az ELTE Biokémiai Tanszékének vezetője „Protein-engineering és a gyógyszerkutatás” című előadásában néhány szép, saját kutatási eredményeket ismertető példán keresztül mutatta be a két terület szoros kapcsolatát. A fehérjék átalakításának korszerű technikája a „protein engineering” (fehérjemérnökség), amely a fehérjéket kódoló génnek irányított mutagenézise, vagy /és átszabása útján változtatja meg a fehérjék szerkezetét. A módszer egyrészt a fehérjék szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítését szolgálja (analízis), másrészt lehetőséget nyújt a természetestől eltérő tulajdonságú fehérjék előállítására (szintézis). A kétfajta alkalmazás közötti dinamikus kapcsolat jó példái a gyógyszerkutatás körébe tartozó fehérjehormonokkal (pl. inzulin) és enzimekkel (pl. szöveti plazminogén aktivátor) kapcsolatos szerkezet-hatásstabilitás kutatások. A pusztán alap kutatás-jellegű és a biomedicinális fehérjekutatás szoros kapcsolatát illusztrálja az ELTE Biokémiai Tanszékén folyó szerin proteáz kutatás is. Gráf László és munkatársai több mint egy évtizede tanulmányozzák a hasnyálmirigy szerin proteázait annak érdekében, hogy felderítsék a működésükhöz elengedhetetlen funkciók, a zimogén aktiváció és autoaktiváció, a szubsztrátspecifikus katalízis, valamint az autolízis molekuláris mechanizmusait. Stratégiájuk a tripszin és kimotripszin specifikitásának minimális számú aminosavcserével történő egymásba alakítása és a természetes proteázok autolízis-rezisztens mutánsainak előállítása. Egy-egy sikeres átalakítás a

szubsztrátspecifitásért felelős, illetve az aktív enzim autolitikus degradációjában szerepet játszó szerkezeti tényezők azonosításához vezetett. Megállapították, hogy a katalízis szubsztrátspecifitásért és a zimogén aktivációjáért lényegében véve ugyanaz a szerkezeti elem, az ún. aktivációs domén felelős, míg az autolízis sebességét az Arg117-Val118 peptidkötés elhasadása határozza meg. Új klinikai eredmény, hogy az örökletes hasnyálmirigygyulladást (pankreatitisz) a kationos tripszint kódoló gén két egymástól független pontmutációja okozza. Gráf és *mtsai.*, illetve Sahin-Tóth Miklós és *mtsai.* vizsgálatai szerint ezek közül az egyik (Arg117His) a tripszin autolízisét, a másik (Asn211Ile) a tripszinogén autoaktivációját befolyásolja. Ezen megfigyelések nyomán felvetették, hogy az örökletes pankreatitisz hátterében a tripszinogén molekula stabilitásának mutációk okozta megnövekedése áll. A tripszinogén/tripszin autoaktiváció/autolízis molekuláris mechanizmusainak az ismeretében talán nem alaptalan abban bízni, hogy a proteáz működésében beállt zavart előbb-utóbb gyógyszeres kezelés útján el lehet majd hárítani.

Magyar Kálmán (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerhatástani Intézet) rövid történeti áttekintéssel kezdte „A gyógyszeres terápia fejlődése és perspektívái” című előadását. Kiemelte, hogy a történelem során a gyógyszer fogalmával együtt járt a hatás, a mellékhatás és egy „mágikus erő”, amely tulajdonságok közül hol egyik, hol másik jelentősége vált hangsúlyosabbá. Röviden említette az allopatia korszakát, amikor a tünetek mindenáron való elnyomására törekedtek. Ezt felváltotta a homeopátia, amikor a gyógyszerek olyan hígításait alkalmazták, amikor a készítményben már nem volt hatékony molekula. Említette a kísérletes farmakológia kor-

szakát, amely évszázados múltra tekint vissza és felbecsülhetetlen értékű felfedezésekhez vezetett. Ma a kombinatorikus kémia a molekulák ezreit állítja elő, amelyeknek a tesztelése csak az automatizálás és miniatürizálás mellett oldható meg. Megnövekedett a gyógyszerkutatás költségigénye, és a molekulától az engedélyezett gyógyszerig terjedő komplett út felvállalására csak a multinacionális cégek képesek. A tőkekoncentráció oda vezetett, hogy a gyógyszerkutatás olyan kezekbe került, akik nem is értik a kutatás eredményeit (közgazdászok, jogászok), csak az üzleti szempontokat tartják szem előtt: mit, mikor, mennyiért? Előadásában nagy hangsúllyal említette, hogy a molekuláris biológia felfedezései forradalmasítják a gyógyszerkutatást. Ennek az irányzatnak máris jelentős gyakorlati eredményei vannak, mint a szubtypusú receptorok (5-HT, dopamin,  $\alpha_1$ -receptorok) felfedezése, melyekből szelektívebben ható, kevesebb mellékhatással rendelkező gyógyszerek születtek. Aggódva szólt a hazai gyógyszerkutatás jövőjéről. A lehetséges választási stratégiákból az originális, a „me-too”, a generikus és a technológiailag megújított készítmények kutatását említette. Azt a reményét fejezte ki, hogy a mintegy 100 éves múltra tekintő, és még ma is jelentős eredményeket felmutató hazai gyógyszerkutatás nem veszíti el az originális vegyületek kimunkálásának lehetőségét. Hangsúlyozta az előadó, hogy ha a múlt század az elektronika évszázada volt, a XXI. század a biológia és az orvostudomány évszázada lesz. A humán genom megismerésével a gyógyszerkutatás olyan lehetőségei tárulnak fel, amelyek a hatékony gyógyszerek soha nem látott sokaságát eredményezhetik.

Nagy Tamás  
Szerves Vegytani Intézet  
e-mail: gts@szerves.sote.hu

**Szirtes János** 1954-ben született Budapesten. A pozsonyi és a budapesti Képzőművészeti Főiskolán tanult, jelenleg a Magyar Iparművészeti Főiskolán tanít. Fontosabb díjai: Kondor Béla-Díj (1982), Derkovits ösztöndíj (1983–84), Munkácsy-díj (1990). A hazai művészetbe, mondhatni, berobbanó Szirtes igazi kísérletező művész: festészetében különféle technikákkal, s emellett számos más vizuális módszerrel kísérletez, elsősorban is a performance-szel, melynek a hetvenes évek óta hazai előfutára, és amelyet egyfajta élőkép-festészetnek tekint. Munkásságában, legyen az festészet, rajz, installáció, performance, film, akció vagy zene, következetesen alkalmazza egyéni módon kialakított ábrázoló-értelmező motívumrendszerét különféle gondolatkörök – nem ritkán nyo-

masztó asszociációs elemeket tartalmazó – megjelenítésére. 1996-os „Fekvő fa – fekvő kristály” sorozata az egyetlen közvetlen természetábrázoló munkája, melyet a Negev-sivatagban látott bozót-szerű fák inspiráltak. „A sorozat az alkalmazkodóképességről, a helymegtalálásról szól,” mondja, „melyben a szikár fák képei nem amorf formák, nem a legyőzetés jelenik meg bennük, hanem ennek az ellenkezője, a győzelem: ezek a fák megtalálták azt az élethelyzetet, amelyben tovább léteznek – többezer évig –, mint másutt élő társaik. A legszélsőségesebb helyzetekben is a kiválasztódás diadala érvényesül: sok minden eltűnt, de ezek a fák még ott vannak. Minden helyzetben az marad meg, amelyik túl tud élni.”

## Biotechnológiai inkubátor Szegeden

Magyarországnak hosszú évtizedekre visszamenően nagy tradíciói vannak a kutatásban. E tudományos eredmények gyakorlati hasznosulása azonban az esetek többségében nem valósul meg. Az alkalmazásra kerülő új, tudományos eredmények esetében is – a bennük rejlő lehetőségekhez képest – az üzleti hasznosulás gyenge vagy korlátozott. Ennek egyik fő oka az, hogy hazánkban a kutatók új vállalkozásokon keresztül üzleti hasznosítása nem rendelkezik hagyományokkal, nincs kialakult „kultúrája” a K+F-re alapozott, szellemi terméket „gyártó” (hagyományos gyártással és forgalmazással gyakorlatilag nem rendelkező) cégeknek. Az ilyen spin-off cégek kialakítására, támogatására nincsen intézményesített forma, illetőleg olyan, területileg koncentrált vállalkozásfejlesztési forma, mely a high-tech szektor támogatását, erősítését oldaná meg.

E hiányosságok pótlását segítheti elő high-tech inkubátorok létesítése, melyek az összekötő láncszem szerepét töltenék be a vállalkozói szféra, a kutatóintézetek, a kockázati tőke, és a kormányzati, önkormányzati szervek között. A high-tech inkubátor tehát technológiaalapú mikro- és kisvállalkozások, illetve spin-off cégek koncentrációja, mely elősegíti a K+F eredmények megszületését, üzleti érvényesülését. Magyarország K+F központjaiban tehát különböző profilú, a helyi K+F tradícióknak leginkább megfelelő high-tech inkubátorok megvalósítása szükséges, melyek áthidalják a tudományos elmélet és az üzleti hasznosítás között tátongó szakadékot, és megfelelően kiaknázzák a helyi kutatási aktivitásokat.

Szeged és vonzáskörzete ideális feltételeket szolgáltat egy biotechnológiai inkubátor létesítésére. A

város kutatásfejlesztéseiben kimagaslóan magas a biológiai eredmények részaránya, melyek alapja a kitűnő tudományos háttér és humán erőforrás, valamint az alap- és alkalmazott kutatással foglalkozó intézmények és ezek jól felszerelt laboratóriumi. Ezen intézmények keretei között számos projekt törekszik arra, hogy eredményeit a gyakorlatban, az üzleti szférában kamatoztassa.

Ennek elősegítésére kezdeményezte a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjában működő Straub Örökség Alapítványa és annak elnöke, Vigh László egy szegedi központú biotechnológiai inkubátor létrehozását. A megvalósítást a szakma, a város és a régió vezetése is támogatja. Az alapítvány Gazdasági Minisztérium által inkubátorok létesítésére kiírt pályázatát a minisztérium támogatásra érdemesnek találta és amennyiben a pályázati struktúra második körén is túljut a Szeged Biotech Inkubátor megvalósulhat. Az inkubátor potenciális szereplői egyrészt már létező mikro- és kisvállalkozások, másrészt új tudományos eredményekre alapuló spin-off cégek, melyek alkalmazott biotechnológiai kutatásokat folytatva, kapcsolatba lépve mind a szakmai, mind a kockázati befektetési társaságokkal ezen üzleti szférában kívánnak tevékenykedni.

Várjuk mindazok jelentkezését, akik az élettudományok területén olyan kutatási eredményekkel, projektekkel rendelkeznek, melyek eredményei várhatóan az üzleti szférában hasznosíthatók lehetnek.

Török Zsolt

További felvilágosítás:

tel.: (62) 432-038, fax: (62) 432-048

E-mail: [tzsolt@nucleus.szbk.u-szeged.hu](mailto:tzsolt@nucleus.szbk.u-szeged.hu)

### A FORMALDEHID SZEREPE A BIOLÓGIAI RENDSZEREKBE – METILEZÉSI és DEMETILEZÉSI FOLYAMATOK

5. Jubileumi Nemzetközi Konferencia, 2000. október 9–13., Sopron, Siesta Hotel

A konferenciasorozat korábbi sikere nyomán ötödik alkalommal kerül megrendezésre a Formaldehid Konferencia, ezúttal Sopronban. Témakörei valamennyi, a formaldehid biokémiájával, a bioszférában betöltött szerepével, toxikológiai és egészségügyi vonatkozásaival, analitikájával és kvantum-biokémiai aspektusaival kapcsolatos területet felölelik, mely tárgyakban – angol nyelvű – előadások, poszterek benyújtását, szakmai hirdetőket s egyben minden érdeklődőt várnak a szervezők.

#### A következő címen kérhetnek 2. körlevelet:

COOPCONGRESS, 1371 Budapest, 5. Pf. 434

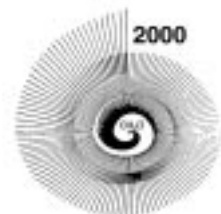
fax: 466-9051

Bővebb információért tekintsek meg a rendezvény honlapját a [html://www.nki.hu/hcho](http://www.nki.hu/hcho) internet címen.

#### Tudományos levelezés:

Tyihák Ernő 1525 Budapest Pf. 102

tel.: 355-8722/315 fax: 356-3698 E-mail: [etyih@nki.hu](mailto:etyih@nki.hu)





## ELISA tesztrendszerek mikotoxinok mérésére

Beszámoló a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban rendezett szakmai napról



1999. szeptember 10-én „Toxiklon Fumonizin B<sub>1</sub> mérésére alkalmas ELISA tesztrendszer bemutatása, valamint néhány fontosabb mikotoxin mérésével kapcsolatos tapasztalatok megbeszélése” címmel, gyakorlati bemutatóval egybekötött szakmai napot rendeztünk Gödöllőn, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban (MBK). Az előadás megszervezéséhez részben az Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Szaktanácsadási Bizottsága, részben a MBK nyújtott anyagi támogatást.

Intézetünk diagnosztikai munkacsoportja évek óta foglalkozik a mikotoxinok mérésére alkalmas enzim-immun (ELISA) tesztrendszerek és reagens kitek fejlesztésével. A közel kilencéves kutatási program eredménye négy mikotoxin, a T-2, a zearalenon, az ochratoxin-A és az aflatoxin B<sub>1</sub> kimutatására alkalmas ELISA tesztrendszerek kidolgozása, amelyek TOXIKLON márkanéven már kereskedelmi forgalomban is kaphatók. Az immár második alkalommal megrendezett szakmai rendezvény célja az volt, hogy a meghívott szakemberek megismerjék kutatási eredményeinket, jelen esetben a mikotoxin-család legújabb tagjának, a Fumonizin B<sub>1</sub> toxinnak mérésére kifejlesztett ELISA tesztrendszerünket.

Az előadásra elsősorban a megyei Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző laboratóriumok, valamint a Gabona- és Takarmánykeverő Rt-k mikotoxinvizsgálattal foglalkozó szakembereit hívtuk meg. Hornok László tanszékvezető egyetemi tanár, tudományos tanácsadó szívélyesen üdvözölte a jelenlévőket és megnyitotta a szakmai napot. A bevezető előadást „A mikotoxin téma jelentősége” címmel Solti László tanszékvezető egyetemi tanár, az Állatorvostudományi Egyetem rektora tartotta, röviden vázolván a mikotoxin kutatási program kezdeti buktatóit és a munkacsoport által eddig elért eredményeket. Meg kell említeni, hogy a mikotoxin projektet Solti László az intézet indulási évében, 1989-ben, mint a MBK Állatbiotechnológiai Intézetének igazgatója indította el. Előadásában beszámolt még arról az állatkísérletről is, amelynél ochratoxin-A-val etetett sertéseknél mérték a toxin koncentráció-

ját az állatok vérében, a különböző szövetekben és a spermában, valamint a toxinkiürülés sebességét. A diagnosztikai laboratórium tudományos munkatársa, Schrett János előadásában részletesen ismertette a fumonizin mikotoxinok felfedezését, szerkezetüket és biológiai hatásukat. A *Fusarium moniliforme* egyik, a nyolcvanas évek végén felfedezett toxincsoportját a *fumonizinek* alkotják. A természetben eddig legalább négyféle fumonizimolekula jelenlétét és szerkezetét igazolták (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>). Kémiaiilag a fumonizin-molekulacsoport egy 20 szénatomból álló alapvázból épül fel, ezen a láncon egy-három hidroxilcsoport, két trikarbonsavcsoport (TCA) és egy aktív amincsoport helyezkedik el. A fumonizinek közül az FB<sub>1</sub> a legfontosabb mikotoxin, amely a legnagyobb mennyiségben képződik, de viszonylag jelentős a fumonizin B<sub>2</sub> termelődése is. A fumonizin B<sub>1</sub> a szerkezet egészére hat, de az egyes állatfajok, illetve az ember megbetegedése esetén más-más szervek károsodhatnak. A fumonizin B<sub>1</sub> a szerkezet egyik fontos enzimjét, a szfinganin-acil-transzferázt bénítja, akadályozva a szfingolipidek képződését. Ezzel magyarázható a lovak agylágyulása, valamint sertéseknél a tüdőviznyő és mellvízkór kialakulása. Az FB<sub>1</sub> toxinnal kapcsolatban már egyértelműen bizonyították, hogy főleg Dél-Afrika és Kína egyes területein – ahol a lakosság alapélelmiszere, a kukorica gyakran erősen szennyezett fumonizin B<sub>1</sub> toxinnal – nagyobb gyakorisággal fordult elő a májrák és a nyelőcsőrák. Kukoricán kívül kisebb koncentrációban mérték fumonizin toxint rizsben, cirokban, sörben és búzából készült termékekben is. A fuzárium toxinok gyakran nagy koncentrációban fordulnak elő a hazai kukoricában. A fumonizin mérését eddig csak Svájc vezette be, a határértéket 1000 µg/kg értékben határozták meg FB<sub>1</sub>-re és FB<sub>2</sub>-re. Ez az előadás is azt igazolta, hogy a *Fusarium* T-2 és zearalenon toxinok mellett a fumonizin toxinokat is rendszeresen kellene vizsgálni. A fumonizin B<sub>1</sub> stabil toxin, hőkezelésnek, besugárzásnak, lúgos hidrolízisnek is ellenáll. A toxin állat- és humán egészségügyi kockázatát csak az élelmiszer-ellenőrzési rendszer szigorításával, valamint érzékeny vizsgálati módszerek alkalmazásával lehet csökkenteni.

A következő előadásban kerültek ismertetésre (előadó: Barna-Vetró Ildikó, tudományos munkatárs, programvezető) a Fumonizin B<sub>1</sub> mérésére alkalmas ELISA tesztrendszer fejlesztésének főbb lépései és gyakorlati alkalmazása. Munkacsoportunk előállította az immunkémiai alapreagenset, az FB<sub>1</sub> elleni monoklonális antitestet, valamint peroxidáz enzimhez kötött FB<sub>1</sub> toxinkonjugátumot. Ismertettük a teszt optimalizálási és validálási vizsgálatait, valamint a gabonaminták FB<sub>1</sub>-tartalmának kivonására szolgáló extraháló rendszert és módszert. FB<sub>1</sub> toxinnal természetes úton fertőzött kukoricaminták ELISA módszerrel mért eredményeit összehasonlítottuk a HPLC-vel mért adatokkal. FB<sub>1</sub> tesztünk mérési tartománya 10–500 ng/g, a legkisebb kimutatható toxintartalom 7,6 ng/g. Tesztünk paramétereit közel azonosak az R-Biopharm GmbH (Németország) cég által forgalomba hozott kit adataival.

Az előadás során bemutatásra került egy új ELISA kiértékelő program is, amely meggyorsítja a vizs-



gálati minták mikotoxin-tartalmának mennyiségi kiértékelését.

Az FB<sub>1</sub> kit gyakorlati bemutatóját és az eredmények ELISA programunkkal való értékelését Szabó Józsefné asszisztens tartotta.

A szakmai nap jó hangulatban zárult, az eredményeket már fehér asztal mellett, kötetlen beszélgetés keretében foglaltuk össze. A második alkalommal megrendezett szakmai nap is igazolta, hogy ez a fórum alkalmas az új eredmények ismertetésére és a mikotoxinok vizsgálatával foglalkozó szakemberek véleményének, tanácsainak megvitatására.

*Barna-Vetró Ildikó*

## Új ökotoxikológiai laboratórium megnyitása a Tudomány Napján



A hagyományokhoz híven 1999 novemberében is tudományos fórumokkal emlékeztek meg országszerte kutatóintézeteink a Tudomány Napjáról. A MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében az esemény fényét emelte

egy új, ökotoxikológiai laboratórium felavatása.

Az ünnepséget Kőmíves Tamás, az intézet igazgatója nyitotta meg. Köszöntötte az intézet munkatársait és a különböző kutatóintézetek, egyetemek és az akadémia képviselőit érkezett, nagyszámú vendéget. Bevezetőjében fölhívta a figyelmet a növényvédő szerek biztonságos felhasználásának és ellenőrzésének szükségességére, a környezetkímélő növényvédelem jelentőségére.

A laboratórium létrehozásában közreműködő kutatók három, egymásra épülő előadását hallgathattuk meg. Székács András „A növényvédő szerek kockázatai” címmel átfogó, kortörténeti képet rajzolt a növényvédelemben a kemikáliák alkalmazása során fölmerült problémákról. Elemezte, hogy milyen

tradicionális, elsősorban gazdasági szempontú érvek, és főként toxikológiai hatásokat latolgató ellenérvek szóltak a növényvédő szerek használata mellett, illetve ellen. Összefoglalta a legsúlyosabb környezeti károkat, amelyek az egyes korszakokban részben a mértéktelen vegyszerhasználat, részben az előre nem ismert vagy nem vizsgált hatások következtében keletkeztek. Így érintette a szerek káros mellékhatásait, a velük szembeni rezisztencia kialakulását, új mezőgazdasági kártevők megjelenését, a bioakkumuláció és biomagnifikáció problémakörét. Kitért a tisztán ökonómiai modell anomáliáira és az ökológiai modell szükségességére. Utalt a monokultúrás, nagyparcellás gazdálkodás hátrányaira a fajgazdagságra nézve, s a durva környezeti beavatkozások ellenében az egyensúly visszaállítására irányuló folyamatok fontosságára. A hetvenes évek fejleményeiről szólva kitért az integrált növényvédelem és az organikus mezőgazdaság gyakorlatára, s arra, milyen súlya volt a környezetkímélő növényvédelem terén is a bakteriális mutagenitási teszt (Ames-teszt) megjelenésének.

Előnyei ellenére azonban e vizsgálat eredményei is csak kellő óvatossággal és kritikával kezelhetők, hiszen a teszt speciális rendszerre vonatkozik, s bizonyított tény, hogy egyes, a szervezetünkbe bevitt természetes vegyületek jóval karcinogénébbek, mint a növényvédő szerek. Az előadó felvázolta napjaink legfrissebb (és egyesek szerint az elkövetkező évtized legsúlyosabb vitáját kavarázó) problémáit is: az immunmoduláns, valamint a hormonzártásunkat, endokrin rendszerünket zavaró hatásokat.

Darvas Béla „A kémiai növényvédelem kritikája” című előadásában a növényvédő szerek megítélésének, hatásvizsgálatának konkrét kérdéseivel foglalkozott. Magyarázatot adott arra a megdöbbentő tényre, miért olyan költséges (20–40 millió USD) egy-egy peszticid kifejlesztése: szerkezetükben, hatásmechanizmusukban, felhasználási területükben igen eltérő vegyületek elemzésére nem lehet egységes tesztrendszert kidolgozni: egyedi vizsgálatokat kell tervezni. Kiemelte, hogy a szerek minősítésének sokszempontú analízisen kell alapulnia, és az eredmények értékelése nagy körülményt igényel. Például a perzisztencia, azaz lebomlási értékek tekintetében lehet egy peszticid igen jó tulajdonságú átlagosan, de egy adott élőhely esetében kiemelkedően veszélyes (mint a piretroidok vízi élő szervezetekre nézve). Áttekinthettük a hazánkban alkalmazott peszticidek környezeti sajátosságait. Míg régebben a legtöbb hatóanyagot használó országok tartoztak a növényvédelem területén legfejlettebb államok közé, ma már (az európai redukációs programnak megfelelően) ennek az ellenkezője érvényesül a megítélésben. Magyarországon a szerfelhasználás területegységre megadott értéke (3 kg/ha) jóval alacsonyabb a skandináv államokénál (10 kg/ha), azonban nálunk ezek többségét a környezeti szempontból kifogásolható, olcsó, generikus szerek teszik ki. A hazánkban alkalmazott peszticidek akut mérgezőségének megállapítását bizonytalanná teszi az információhiány a kumulatív hatások veszélyét illetően. A krónikus mérgezőség tekintetében gondot jelent, hogy a nagyszámú mutagén anyag használata – melyeknek 50–60%-a később karcinogénnek is bizonyult – nem tiltott. Hasonlóan nehéz egy vegyület teratogén hatását bizonyítani. Darvas Béla fölvetette végül azt a még filozofikusnak tűnő kérdést, hogy ezek után mit volna helyesebb bizonyítani egy szerrel kapcsolatban: az ártalmasságát vagy az ártalmatlanságát (emberi szervezettel szemben).

Befejezésül Polgár A. László „Peszticidek és hasznos élő szervezetek” című előadását hallhatták a jelenlévők. Megtudtuk, hogy hazánk 1984 óta tagja a Nemzetközi Biológiai Védekezési Szervezet (IOBC) „Peszticidek és hasznos élő szervezetek” munkacsoportjának, melynek kutatói növényvédő szerek laboratóriumi tesztelését végzik hasznos ízeltlábú fajokon. E vizsgálatokra azért van szükség, mert a növényvédelemben alkalmazott készítmények hatásai nem csak a célzott kártevőt érintik. A munkacsoport célja nemzetközileg elfogadott, egységes tesztrendszer kidolgozása, a tesztorganizmusok körének bővítése. Az eddigi tesztelésekben már használt parazitoid, ragadozó, atka, pók tesztorganizmusok közé újabban rovarpatogén gombák és rovarparazita fonálférgek is bekerültek.

A tudományos előadások után a vendégek megtekintették az új ökotoxikológiai laboratóriumot, amelynek „lelke” a – nagyjából az intézet saját, (többéves) belső fejlesztési keretéből megvásárolt – korszerű, számítógép-vezéreltű Varian Saturn 2000 típusú, tömegspektrometriás detektorral ellátott kapilláris gázkromatográf (MS/MS rendszerű kiépítéssel), amelyet az ioncsapdás MS rendszer adott molekulai ionok detektálására is képessé tesz. A műszerhez automatikus mintaadagoló csatlakozik, és szilárdfázisú mikroextrakció (SPME) minta-előkészítésre is alkalmas. A közel 25 millió forintos beruházáshoz a kutatócsoport jelentős támogatást kapott az OTKA Infrastrukturális Fejlesztési Programjából (OTKA: M 27757), a laboratórium illetve a műszerek működtetési költségeihez pedig az OMFB Alkalmazott Kutatási Fejlesztési Program projektje nyújt anyagi segítséget.

A laboratórium felszereléséhez tartoznak még a mikrotálca mosóból, reagensadagolóból és spektrofotometriás leolvasóból álló „ELISA-sor”, egy UV spektrofotométer, valamint egy elemekből „háziilag” összeépített HPLC-készülék. A laboratórium induló célkitűzése ökotoxikológiai szempontból fontos vegyülettípusok, így növényvédőszer-hatóanyagok és -maradékok, környezeti toxinok, mikotoxinok, növényi és rovarhormonok, feromonok, illetve rovarélettani szempontból jelentős vegyületek meghatározása és monitorozása. A célvegyületek köre természetesen bővíthető, például antropogén környezetszennyező anyagokkal (poliaromás szénhidrogének, poliklórozott bifenilek). A kutatólaboratórium első nagyobb projektje mintegy másfél tucat növényvédő szer maradáknak felszíni-, talaj- és ivóvizekből történő kimutatására irányul.

*Almás Asztéria*

## Horváth Edit: RECEPTOR-LIGAND KÖLCSÖNHATÁS

### Módszertani alapismeretek

(Könyvismertetés)

ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 1999

A „receptorológia” a biokémiának a receptorokkal foglalkozó részterülete, az enzimológia kistestvére. Molekuláris szemléletében a két diszciplína a vizsgálódás tárgyát képező receptorok és enzimek hasonló felépítése miatt azonos. Ezen túlmenően a receptor- és enzimműködés fenomenológiai leírása is igen hasonló eredményekre vezet. Mégis, vagy tán éppen ezért, amíg az enzimológiát különböző szempontok szerint tárgyaló tankönyvek, egyetemi jegyzetek, ismeretterjesztő művek a hatvanas évek óta elérhetők magyar nyelven, „receptorológiai” tárgyú művekből a kínálat sokkal szűkösebb. Csupán farmakológiai, élettani, sejtélettani, sőt klinikai leírások részeként kapunk ismertetések a receptorokról, bár az orvostanhallgatók, gyógyszerész és biológus hallgatók graduális képzésében a receptorokat több ízben is taglaljuk, hiszen jelentőségük az életfolyamatok molekuláris szintű szabályozásában ma már közismert. Az eredeti gyógyszerkutatás ezért nagy jelentőséget tulajdonít a receptorok vizsgálatának. Mind az új hatóanyagok hatásmódjának értelmezése, mind pedig kiválasztásuk *in vitro* módszertana a receptor mérésekre épül. Dr. Horváth Edit kis könyve tehát hézagpótló jellegű munka. Lényegét tekintve laboratóriumi praktikum, mely a Gyógyszerkutató Intézet biokémiai főosztályán, osztályain, később receptogram laboratóriumában végzett mérésorozaton alapul.

Az elméleti alapokat vázlatosan mutatja csupán be a könyv első négy fejezete. Az egyes tárgyalt receptorosztályok és -altípusok mérési jegyzőkönyveinek



ismertetése előtt az adott receptor rövid bemutatása segít elhelyezni a mérés tárgyát a többi receptor között.

Több mint 30 különböző hormon- és neurotranszmitter receptorkötési teszt részletes ismertetése adja a munka legnagyobb értékét. A saját – feldolgozott – mé-

rési eredmények bemutatása bármely laboratóriumban jelentősen megkönnyítheti az adott módszer beállítását és igényes kivitelezését, validálását. Egyszerű nyelvezete lehetővé teszi, hogy akár középfokú végzettségű laboratóriumi dolgozók, akár egyetemi hallgatók sikerrel forgathassák. A legrészletesebbek a serkentő aminosavak receptoraira és a szerotonin receptorokra vonatkozó fejezetek. E két fejezet elméleti bevezetője önmagában is értékes szakmai áttekintést nyújt anélkül, hogy azokat aránytalanra duzzasztotta volna a szerző.

A gyógyszeripari kutatások jelenleg folyó technológiai forradalma minden bizonnyal hamarosan új, átdolgozott kiadás előkészítését teszi majd szükségessé, hiszen a klónozott receptorok csak most kezdenek általánosságban elérhetővé válni, és a mérés automatizálása, robotizálása (az ún. *high throughput screening*, azaz a nagy kapacitású szűrővizsgálati rendszer) is egyre inkább tért hódít a klasszikus rendszerek mellett, melyeket a könyv is tárgyal.

Arányi Péter

(A könyv megrendelhető az alábbi címen: ELTE Eötvös Kiadó, 1088 Bp., Puskin u. 11–13. Tel.: 266-9206)



A *Biochemical Education* folyóirat 1999. évi 27 (3) és (4) számai az *IUBMB Education Committee* ajándékaiként megérkeztek a DOTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetébe (4012 Debrecen, Pf.6, tel/fax: 52/ 416 432). A számok tartalomjegyzékai egyebek között a <http://www.elsevier.nl/inca/publications/store/6/0/4/> és a <http://www.hbz-nrw.de/elsevier/03074412/> internet címeken megtekinthetők. Az egyes közlemények másolatát az intézet szívesen megküldi az érdeklődő kollégáknak.

Dr. Fésüs László

## Ferenczi Andrea: GENETIKA – GÉNETIKA

### Beszélgetések

(Könyvismertetés)

Harmat Kiadó, Budapest, 1999

A Harmat Kiadó gondozásában jelent meg Ferenczi Andrea *Genetika – génetika* című riportsorozata. A szellemes cím jól érzékelteti, hogy a könyv a biotechnológiai beavatkozások etikai aspektusaival kíván foglalkozni.

A borítón látható hangszer – a húrjait meghatározó DNS bázisokkal – szinte utal arra, hogy az élet alaphangjairól, a génekről lesz szó. Tudjuk, hogy az élet dalának megszólaltatásához nélkülözhetetlenek, de nem elégségesek a felépítő molekulák. Ahogy hangszeren játszani, főleg jól játszani, csak megfelelő hallás, technikai tudás és szépérzék birtokában lehet, úgy az emberi élethez sem elegendők adottságaink, szükséges hozzá az ismeretszerzés és az etikus gondolkodás is. Szinte megelevenednek Petőfi intő szavai:

„Ne fogjon senki könnyelműen  
A húrok pengetéséhez!”

(Petőfi Sándor: A XIX. század költői)

Ez a könyv a genetika forradalmának kihívásairól, az emberi felelősségről szól. Arról, hogy a molekuláris genetika milyen távlatokat nyithat az emberiség számára, a biotechnológia milyen előnyöket nyújthat, és milyen veszélyeket tartogat az élő rendszerek (egyedek, populációk, ökoszisztémák) részére. Miféle etikai korlátokat kell szabnunk annak érdekében, hogy a kutatási eredmények ne csak az egyén, hanem az emberiség, sőt azon túl is földi létünk megőrzését szolgálják.

Ferenczi Andrea tizenhét jó nevű tudóssal – köztük négy akadémikussal és számos egyetemi tanárral – készített interjút. Érdekes név szerint megemlíteni a megkérdezetteket az általuk tolmácsoltságuk miatt: Csányi Vilmos etológus, Darvas Béla ökotoxikológus, Duda Ernő molekuláris biológus, Dudics Dénes molekuláris biológus, Falus András immunológus, Fekete György főorvos, Gráf László biokémikus, Hadlaczky Gyula biológus,



gyus, Kovács József orvos-bioetikus, Kroó Norbert atomfizikus, Papp Zoltán főorvos, Sarkadi Balázs főorvos, Sándor Judit jogász, Szűcs Ferenc teológus, Turgonyi Zoltán filozófus, Venetianer Pál molekuláris biológus, Vida Gábor genetikus. A témában közelebbről érintett szakemberek mellett – mint látható – megszólal bioetikus, jogász, fizikus, filozófus, teológus is, jelezvén, hogy a biotechnológia alkalmazása nemcsak más tudományterületeket is érint, de hatása az egész társadalomra kiterjed.

Egy részletes interjú számos lehetőséget nyújt mind a kérdező, mind a válaszolók számára. A tudósok java része tudományos folyóiratokban publikál, viszonylag kevés idejük marad a közvélemény formálására, kutatásaik népszerűsítésére. A könyvben szereplő interjúk során elmondják eredményeiket, beszámolnak terveikről, így az olvasók is részesülhetnek azokból a sikerekből, melyet például a humán inzulin gén bakteriális felszaporítása, a szomatikus sejthibridizáció növénynevelési alkalmazása vagy az amniocentézis bevezetése jelentett a humán orvoslásba.

A kutatók vallanak ezen túl a biotechnológiával kapcsolatos reményeikről és aggályaikról is. Nem rejtik véka alá a kutatóndó és megoldandó feladatokat. S bár nyíltan és széles látókörűen értékelik a molekuláris genetika eredményeit, mindegyikük saját szakterülete által, saját szemüvegén át nyil-

vánít más-más véleményt és képvisel néha egymással ellentétes álláspontot.

S ettől válik igazán elgondolkodtatóvá a könyv. Hiszen „génétikai” kérdések minden bizonynal már jóval a géntechnológia kialakulása előtt is felvetődtek. Az ember által működtetett „biológiai pokolgép” igen régen beindult. Valószínűleg már akkor, mikor a fajokat, fajtákat az ember tudatosan kezdte kiválogatni és szaporítani. Természetes környezetünk átalakítása újabb fordulatot vett a növény- és állatnemesítéssel. A géntechnológia beköszöntéig valójában „házasítottunk” bizonyos géneket a vad gének rovására, de szerkezetüket érintetlenül hagytuk. A génmanipulációval azonban evolúciós értelemben nem ismert új génkonstrukciókat alakíthatunk ki. S mivel technikai ismereteink bővülése gyorsabb, mint felelősségérzetünk alakulása, kételkedés ébred bennünk a siker biztonságossága iránt.

Jogosan vetődnek fel tehát a kérdések:

- Hasznos lesz-e az emberiség számára, ha az evolúciót „gyorsítva” a felszaporított klónokat anélkül juttatjuk a sejtekbe, hogy ismernénk azok beépülésének helyét, módját, hatását, a génműködés szabályozási mechanizmusát?
- Megéri-e osztódásra készítenünk „előregedett” testi sejteket mesterséges úton abból a célból, hogy új élet fakadjon belőlük?
- Mekkora a várható egészségügyi kockázata annak, ha genetikailag módosított takarmánnyal etetjük állatainkat, tápláljuk önmagunkat és gyermekeinket, tudván, hogy a bevitt gének „jótekonny vagy kártékony” megnyilvánulása bizonytalan, és működésük kiszámíthatatlan?!
- Szabad-e mesterséges kromoszómák által bejuttatnunk géneket, mikor sem a sejtek kromoszómaépítő mechanizmusa, sem a folyamat szabályozása nem ismert eléggé? Tudván azt, hogy egy-egy bázisnyi eltérés is komoly rendellenességeket produkálhat, megzavarhatjuk-e a DNS duplikáció folyamatát abból a célból, hogy a mesterséges kromoszómák által az új DNS szakaszokat beépítsük? S miként fogjuk ezek precíz működését garantálni, ha nem ismerjük a kromoszómális szerveződés finomszabályozó rendszerét?
- Megengedhetjük-e magunknak – miután a Föld természeti képét átalakítottuk, számtalan természetes élőhelyét elpusztítottuk, kiirtottuk fajok tízezreit –, hogy most saját ízlésünk szerint alakítsuk át a biológiai evolúció építőköveit, a géneket is?

- Erkölcsös-e még az eddigieknél jobban is kihasználni élőlénytársainkat, gyárakként üzemeltetve szervezetüket az ember számára hasznos anyagok termelésére?
- Akarjuk-e, hogy egy-egy multinacionális nagyvállalat szabja meg kenyérgabonánk bázisát azáltal, hogy génmanipulált vetőmag-előállításával kiszorítja versenytársait a piacról?
- Mi fontosabb a számunkra, az egyéni vagy a társadalmi érdek: a genetikailag sérült személyek génkorrekciója vagy a társadalom génkészletének minőségi megőrzése?
- Számolunk-e azzal, hogy a géntechnológia eredményeit egyesek majd a hatékony népirtás szolgálatába állítják?
- Részesesivé kívánunk-e válni az embert, társadalmat, életet átalakító lavinának?

A nyilatkozó tudósok reális képet adnak arról, hogy pillanatnyilag mi megvalósítható, illetve mi megengedhető, és mi az, ami nem. Állást foglalnak kutatói szabadságuk biztosítása érdekében. A biológiai biztonság azonban még ennél is előbbrevaló. Nem is a kutatások indokoltsága kérdőjelezhető meg – hiszen kutatások nélkül aligha tárnánk fel a világ törvényszerűségeit –, hanem a technikák gyakorlati alkalmazása mérlegelendő. Azt is be kell látnunk, hogy tiltással és büntetéssel legfeljebb csak korlátozni lehet, de leállítani nem azokat a személyeket, akik a tudományos eredményeket igaztalan célra kívánják fordítani. Többre megyünk a meggyőzéssel, a tények kendőzetlen feltárásával, a mérlegelés esélyének megteremtésével.

S ezért különösen példamutató ez a könyv. Ismereti az eredményeket, nem titkolja a problémákat. Okosan kérdez, vet fel kétségeket, sőt gondolkodtatja az olvasót. Minderre nagyon is szükség van fogyasztáscentrikus, fogyasztómanipulált világunkban. A lakosság igényli, hogy a kutatók közérthető módon tárlják számukra az ismereteket. Ezáltal válunk képessé arra, hogy állást tudjunk foglalni az életünket befolyásoló kérdésekben. Saját bőrünkön fogjuk megtapasztalni a géntechnológia előretörésének áldásos és átkos hatásait.

A „biológiai pokolgép” újabb állomásához érkezünk. Jobb, ha idejekorán felvértezzük magunkat ismeretekkel, hogy bölcs döntéseket hozzunk.

*Pethő Ágnes*

# Régi latin növénynevek enciklopédiája

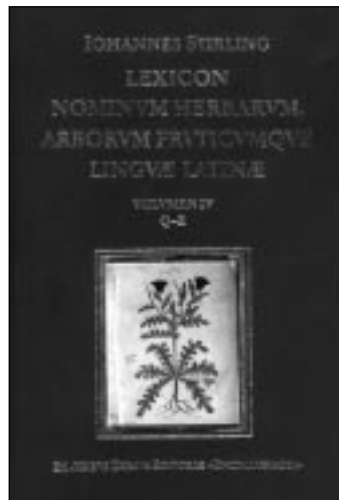
## J. Stirling: LEXICON NOMINUM HERBARUM, ARBORUM, FRUTICUMQUE LINGVAE LATINAE I-IV.

(Könyvismertetés)

Encyclopaedia Kiadó, Budapest, 1995–1998

Több évtizedes, tiszteletreméltó igyekezet, helyesen tágan értelmezett, gazdag forrásanyagon (Georgica!) alapuló munka igen szép kiállítású eredményét tarthatjuk kezünkben négy vaskos kötetben. A lexikon két fő célkitűzése:

1. A vizsgált három nagy korszakban (ókor, középkor, XVI. sz.) előfordult, használt *növénynevek* áttekinthető, használható *rendbe szedése* és bemutatása. Ismerve a számos torzult, elírt, „félrehallott”, romlott alakot, ez nem kis feladatot jelent. Ezt a buktatót a szerző – eléggé nem méltányolható módon – a címben hangsúlyozott *nomina* szó kimondásával elkerüli. Azt azonban elismeri, hogy nem egyszer *önkéntesen* kellett eljárnia (hajuknál fogva odarángatott szavakat, illetve új, talán sohasem létezett variánsok konstruálását említi). Valóban szükség volt-e erre?
2. Másik dicsérendő és tiszteletreméltó célkitűzése a különböző korszakokban használt *növénynevek azonosítása*. Ez utóbbi a munka Achilles-sarka. Módszertani bevezetője azonban meglehetősen szűkszavúan tájékoztat az alkalmazott eljárásról. Ha helyesen értelmezem, erre három lehetőség adódott:
  - a) Tekintélyelv alapján, mérvadónak, autentikusnak tartott forrásai azonosításainak elfogadása. Azt, hogy mi mérvadó, helyes, elfogadható, a szerző döntötte el, de nem derül ki, hogy az adott esetekben minek alapján, milyen kritériumok szerint. (Ennek közlése, természetesen, legalább négyzeresre növelte volna a terjedelmet, de az olvasónak/használónak általában nincs lehetősége e kritériumoknak a szerző idézte forrásokban *minden esetben* utánanézni).
  - b) Az idézett – és elfogadott – helyen található kiegészítő információk: morfológiai leírás, kép, termőhely, alkalmazás, hatásmód (~chemotaxonomia), a növényhez fűződő le-



gendák (Bevezetés, IV. rész) alapján. Tudjuk, hogy itt lehetőségeink milyen korlátozottak, mégis külön-külön mindegyik tétel mellé lehetne kérdő- és felkiáltójeleket írni. Itt most engedtessek meg példaként csak az utolsó tétellel kapcsolatban utalni az ún. Szt. László fü-

ve legenda rokonságára. Míg az egyik ismert legenda a *Carlina acaulis*ra, addig a másik a *Gentiana cruciata*ra vonatkozik, ez a két taxon pedig még csak távoli rokonságban sincs egymással.

- c) A szerző azonosította a növénynevet – de nem tudjuk, minek alapján.
- d) Mindenesetre föltűnő, hogy a három korból származó növénynevek mintegy 90–95 százalékát azonosítani tudta/merte. Ez igen magas százalékos arány – kívánom, bár igaz lenne!

Lehet, hogy már monomániának tűnik, mégsem győzöm elégszer, újra meg újra hangoztatni, hogy *csak a legszigorúbb módszertani elvek betartásával* lehet ebben az Augias istállójában *csak valamelyes rendet* is teremteni. Ezt többen – így Mollay Erzsébet is – kritizálták, túlzásnak tartották, de jobbat nem mondtak, nem adtak, s így csak az amúgy is nagy zűrzavart növelték. Az azonosítás – távolról sem százszázalékos! – valószínűséggel *csak a növénynév, a leírás és a növénykép* (mindegyik lehet hibás is!) *együttes és ellentmondásmentes figyelembevételével történhet*. A Lexiconban idézett, illusztrált források erre számos esetben lehetőséget kínálnak – föltételezem S. J. élt is ezzel a lehetőséggel, de hangsúlyozni kellett volna, hogy az azonosítás

- név + leírás + kép alapján (ez a legbiztosabb)
- név és leírás alapján (ez már kevésbé biztos), vagy csak a
- név alapján (ez a legbizonytalanabb)

történt. Mindezt pl. egy kiegészítő kötetben, címszavanként pótolni lehetne. Csak a növénynév alapján

nem lenne szabad azonosítani, még akkor sem, ha tudjuk, hogy a magyar botanikatörténeti irodalom is tele van ilyen felelőtlen „azonosításokkal”. Csak két magyar vonatkozású példa ennek bemutatására:

IV.2. „**quercus 4** < Quercus Cerris L.> *quercus - cher fa* Beszt.Szj.894 (FINÁLY,50.) || Schl.Szj. 1586. (SZAMOTA, 70: *arbor quercina cherfa uocata*) || *Quercus cerrus Plini, cher fa* Clusius Nom.Pann. 1583,26” Honnan tudjuk, hogy ott, akkor – Plinius, a Beszt.Szj, Clusius stb. idejében – mit neveztek cserfának? Úgy tűnik, az „azonosítás” itt csak az akkori és mostani név egybevágása alapján történt.

III.5. „**ilex -icis, f. 1** <Quercus Ilex L.> .....2 <Quercus coccifera L.>.....*ilex - twelfa* [= tölgyfa] Schl.Szj. 1585. (SZAMOTA,70) || *cher fa: ilex* Kolozsv.Gl. 2. (PÁLFI, 28) cf. *theelffa: ilex* ibid. 1. (PÁLFI, 11) || *illix telg fa* [= tölgyfa] Beszt.Szj. 893 (FINÁLY, 50)” Itt már látható, hogy az *ilex* hol cserfa, hol tölgyfa. Minek alapján soroljuk ide vagy oda?

Alaki pontatlanság, hogy a Lexicon alcíme a III–IV. kötetekben a korábbiaktól eltér. Az I. kötet három előnyelvi bevezetése közül az angol a leggördülékenyebb, a német és főleg a francia sokhelyt nehézkes, „zörög”, sajtó- és elválasztási hibák (ezek a korrektor lelkén száradnak) nehezítik megértésüket. (Érdeemes lett volna anyanyelvi lektorral átnevezni). S nem hiszem, hogy illetlenség lett volna a bevezetőt *magyar nyelven* is közölni.

A magyar forrásokban föllelhető névanyaggal meglehetősen mostohán bánik a szerző. Bár hivatkozik a Nyelvtörténeti Szótárra és az Oklevél Szótárra, mint példaképre, de igen gazdag, latin és magyar nyelvű növénynévanyagukat alig használja ki, pedig itt *jóval a Besztercei szószedet előtti időből* (XI–XIV. sz.) számos latin és magyar (nem egyszer a „vulgo, vulgariter” szóval „azonosított”, értelmezett) növénynév található, az oklevél kiadványokban (pl. Ila B., Bakács I., Györffy Gy.) pedig még ennél is jóval több. Ez kitölné a („megkésett”) magyar középkori adatok és az első (tema-

tikus) szójegyzékek közötti űrt. És illusztrálná a korai – igen gazdag! – magyar növényismeretet, jelezvén azt, hogy nem mindent *kaptunk*, nem minden *felülről szállt alá*, mint azt sokan (Rapaics, Gombocz) szeretnék beállítani, hanem van, amit *magunkkal hoztunk*.

Tiszteletreméltó elszántsággal, kitartással és küzdőképességgel Stirling János *lehetetlen feladatra* vállalkozott (csak igen nagy és nehéz feladatokra érdemes vállalkozni!), mert a tüzet a vízzel akarja összebékíteni. Az magától értetődő, hogy a szerző a Linné-féle szisztematika felől közelít – máshonnan nem is közelíthet. Ha azonban – kicsit durva túlzással – azt állítjuk, hogy *Linné előtt csak ethnobotanika volt*, tudós, természettudományos szisztematika, taxonomia nem, akkor figyelembe kellene venni az ethnobotanikának a linnéi binomiális rendszer-tanétól *gyökeresen eltérő rendező elveit* (szín, hasonlóság, forma, felhasználás stb. alapján azonosít illetve rokonít egyes fajokat, fajtákat). *Ez a két – különböző szemléletű – rendszer nem hozható* (teljes *fedésbe sohasem*. Ez szolgáljon S. J. mentiségére, de ezt a helyében hangsúlyoztam is volna.

És még egy kis „hazabeszélés”: Clusius Stirpium Nomenclator Pannonicusának következő évi, 1584-es antverpeni kiadását miért nem említi a szerző? (Az eltéréseket ld. *Collecta clusiana* 2. ed. Attila T.Szabó, 1992, 117 skk.)

A műnek egyetlen nagy szépséghibája van csupán: borsos ára. Az I–IV. kötet ára kb. 10,000 Ft., ami miatt csak gazdag könyvtárak (van ma ilyen??) vehetik meg. De erről már igazán nem a szerző tehet...

Nyomatékosan szeretném hangsúlyozni, Stirling Jánossal perben, haragban nem vagyok, de nem is szeretnék lenni. Ami észrevételt, megjegyzést, kritikát mondtam: jobbító szándékkal tettem, hisz „*grammatici certant*”. S ez csak *lovagias küzdelem* lehet. Bármiben, amiben tudok, készséggel állok segítségére.

Grynaeus Tamás

## ÁLLÁSHIRDETÉS

A MTA Növényvédelmi Kutatóintézete pályakezdő vagy néhány éves gyakorlattal rendelkező, diplomás **vegyészt** keres laboratóriumi kutatómunkára, tudományos segédmunkatársi/munkatársi beosztásban.

Továbbképzési (PhD) programban való részvétel lehetséges.

Tel.: 355-8722 Fax: 356-3698



# SZERZŐI UTASÍTÁS

## BIOKÉMIA – A Magyar Biokémiai Egyesület Tájékoztatója



A Biokémia folyóirat olvasótábora a Magyar Biokémiai Egyesület tagsága, a hazai biokémiai kutatás, az ipari és tudományos élet szereplői, valamint a gazdaság különböző területein dolgozó biokémikusok. A lap egyes szekcióiban egyaránt szerepeltet tudományos közleményeket, szakmai publicisztikai írásokat, cég-szerű, intézményi vagy egyéni hirdetéseket, az egyesület aktuális híreit, valamint konferencia- és rendezvényfelhívásokat.

Tudományos közleményként szerepelhet **áttekintő** (review) **tanulmány**, kísérleti eredményeket leíró **szakcikk**, illetve **rövid közlemény**. A folyóirat elsősorban magyar nyelvű írásokat szerepeltet, de indokolt esetben a közlemény angol nyelven is megjelenhet. A kéziratok szerkezetéről további információt folyóiratunk 1999. márciusi számában vagy az alábbi internet címen találhatnak:

<http://korb1.sote.hu/biokemia/biokemia/utmutato.htm>



Az EU 5 „Élelmiszer, Táplálkozás és Egészség”

(Quality of Life and Management of Living Resources „Food, Nutrition and Health”) Koordinációs Iroda felhívja a figyelmet az alábbiakban ismertetett pályázati lehetőségekre 2000–2002-ben:

(a lista a Koordinációs Iroda működési területét érintő programokat/kulcsakciókat és a vonatkozó pályázati határidőket tartalmazza)

		2000.		2001.		2002.
		márc.	okt.	feb.	okt.	feb.
1. Élelmiszer, táplálkozás és egészség	1.1/1.2 Élelmiszer-nyersanyagok, feldolgozás, nyomon követhető eredetmeghatározás; élelmiszer-biztonság		X			X
	1.3 Élelmiszerek az egészség elősegítésében, fenntartásában	X		X		X
3. A sejt mint „gyár” (Biotechnológia)	3.1.1 Új diagnosztikumok és készítmények		X		X	X
	3.1.2 Biológiai készítmények	X		X		
	3.1.3 Állatokkal történő tesztelés alternatívái		X			X
	3.2.1 Ipari szennyezés megelőzése	X		X		
	3.2.2 Biotesztek és bioszenzorok		X			X
	3.2.3 Biolemlés			X		
	3.2.4 Biodiverzitás		X			X
	3.2.5 A rekombináns szervezetek azonosítása				X	
	3.3.1 Celluláris és molekuláris tulajdonságok			X		X
	3.3.2 Mikrobákból, növényekből és állatokból származó termékek, illetve azokkal kapcsolatos folyamatok	X			X	
	3.3.3 Funkcionális biomolekulák	X			X	
	3.3.4 Metabolikus és genetikai diverzitás		X			X
4. Környezet és egészség	4.1.1 Környezeti tényezők hatása		X			X
	4.1.2 Az egészségre gyakorolt hatások becslése		X			X
	4.1.3/4.2/4.2.1 Kockázatkezelés; A környezet e.ü. kockázatainak értékelése/mérséklése; Környezeti kockázatok becslési módszerei	X			X	
	4.2.2 Prediktív toxicitáspróbák		X			X
5. Fenntartható mezőgazd./halászat/erdészet, vidéki/hegyvidéki területek integrált fejlesztése	5.1/5.2/5.3/5.4/5.5 Új és/vagy tökéletesített termelési rendszerek; Biológiai anyagok integrált termelése; Erdők; A közösségi politika támogatása; Új eszközök és modellek a vidéki és más területek integrált és fenntartható fejlesztésére		X		X	
6. Öregedő népesség és munkaképtelenség	6.1/6.2/6.3/6.4/6.5 Öregkori betegségek és e.ü. problémák; az öregedés demográfiája és epidemiológiája; időskori funkciócsökkenések; e.ü./szociális szolgáltatások időseknek	X		X		X
Generikus jellegű kutatási és technológiafejlesztési aktivitások			X		X	

Az EU 5 program felhívásait, a pályázatok határidőit, a feltételeket, a pályázatok részletes leírását megtalálja a <http://www.cordis.lu> valamelyik lapján angol, német vagy francia nyelven. Magyar nyelvű információkat közöl rendszeresen az OMIKK (<http://femirc.omikk.hu>), az OMFB (<http://www.omfb.hu>), a MTESZ (<http://www.mtesz.hu>) és az élelmiszercsoportban a MÉTE (<http://www.mtesz.hu/tagegy/mete/index.html>) is. A „Quality of Life” program pályázati határidőit módosította az EU (e-mail: [marko.heinonnen@dg12.cec.be](mailto:marko.heinonnen@dg12.cec.be)).

