

# 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

XXV. ÉVF. 2. SZÁM

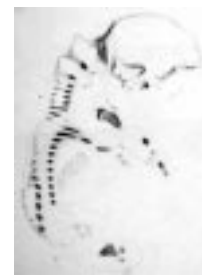
2001. JÚNIUS

A tartalomról:

- ◇ Fehérjék és fehérje méretű polipeptidek előállításuk kémiai ligációval – *Mihala Nikolett*
- ◇ Az egér kapcsolófehérje gén (*Crt11*): szerkezet, kifejeződés és funkció – *Otgonchimeg Rentsendorj, Deák Ferenc és Kiss Ibolya*
- ◇ A calretinin (kalciumkötő fehérje) NMR vizsgálata. Az első két domén – *Ambrus Attila, Batta Gyula, Kövér E. Katalin, Patrick Groves, Malgorzata Palczewska és Jacek Kuznicki*
- ◇ Proteázok: az eredeti gyógyszerkutatás molekuláris célpontjai – *Arányi Péter*
- ◇ IX. Fermentációs Kollokvium – *Bélafiné Bakó Katalin*
- ◇ Beszámoló a negyedik, ötödik és hatodik Hőgyes Délutánról – *Beke Gyula és Nagy Tamás*
- ◇ Fehérjéink tekergetői: a dajkafehérjék (könyvismertetés, Csermely Péter: A stresszfehérjék) – *Székács András*

Címlapkép:

*A kapcsolófehérje kimutatása immunperoxidáz-festéssel 14,5 napos egémbrióban. Mindegyik porcós vázelem erősen festődik. A fehérje megfigyelhető a fejlődő tüdőben, valamint a középbel és a gyomor falában is (ld. a vonatkozó közleményt a 32–35. oldalakon).*



Contents:

- ◇ Preparation of proteins and proteinoid polypeptides by chemical ligation – *Nikolett Mihala*
- ◇ The mouse linker protein gene (*Crt11*): structure, expression and function – *Otgonchimeg Rentsendorj, Ferenc Deák and Ibolya Kiss*
- ◇ An NMR study of calretinin, a calcium binding protein. The first two domains – *Attila Ambrus, Gyula Batta, Katalin E. Kövér, Patrick Groves, Malgorzata Palczewska and Jacek Kuznicki*
- ◇ Proteases: molecular targets of original drug research – *Péter Arányi*
- ◇ IXth Fermentation Colloquium – *Katalin Bakó-Bélafi*
- ◇ The fourth, fifth and sixth "Hőgyes Afternoon" – *Gyula Beke and Tamás Nagy*
- ◇ Chaperones: folding agents for our proteins (book review) – *András Székács*



Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1518 Budapest, Pf. 7

e-mail: [biokemia@nki.hu](mailto:biokemia@nki.hu) <http://webio.hu/biokemia/>

Felelős kiadó: Dr. Friedrich Péter

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

Készíti és terjeszti a dART studio (1137 Budapest, Újpesti rakpart 6. Tel.: 349-3426)

Ára • a Magyar Biokémiai Egyesület tagjai részére: tagdíj ellenében,

• nem egyesületi tagoknak: 680 Ft + postaköltség

# Fehérjék és fehérje méretű polipeptidek előállítása kémiai ligációval

## Synthesis of protein and protein-size polypeptides by chemical ligation

Mihala Nikolett

MTA Peptidkémiai Kutatócsoport,  
1518 Budapest 112 Pf. 32,  
E-mail: mihala@szerves.chem.elte.hu

### Összefoglalás

A cikk a természetes és nem természetes építőköveket tartalmazó peptid típusú, illetve fehérje típusú biomolekulák szintézisére alkalmas kémiai ligációs módszerekről nyújt rövid áttekintést. Ismerteti az egyes stratégiák előnyeit és korlátait. Rámutat, hogy ezek a stratégiák széles körben alkalmazhatók akár szintetikus, akár biokémiai úton előállított, nem védett polipeptidek összekapcsolására, valamint hangsúlyozza, hogy a kémiai ligáció módszerével kiküszöbölhetők a nagy tagszám okozta problémák.

Az utóbbi években – nem utolsósorban a human genom programnak köszönhetően – ugrásszerűen megsokszorozódott a nagy tagszámú, biológiailag aktív peptidok szintézise iránti igény. A biokémiai módszerekkel nem hozzáférhető polipeptidek kémiai szintézise nagy kihívást jelent a 100. születésnapját ünneplő peptidkémia számára. A hagyományos stratégiák úgy a lépésenkénti szintézis, mint a fragmenskondenzáció gyakran nem elégségesek nagy tagszámú peptidok szintéziséhez. Ezeknél a stratégiáknál elengedhetetlen az egyes aminosavrészek reaktív oldalláncának blokkolása, ugyanakkor a védőcsoportok jelenléte miatt – a szekvenciától függően, különösen hosszabb láncok esetében – a peptid oldékonysága jelentősen csökkenhet a szintézis során alkalmazott oldószerekben. Ez és a szintézis során, illetve a védőcsoportok eltávolításakor fellépő mellékreakciók olyan összetett termékelegyet eredményezhetnek, melyből a kívánt peptid gyakran nem, vagy csak igen kis mennyiségben izolálható. E nehézségek miatt a nagy tagszámú peptidok előállításához új stratégia kidolgozása vált szükségessé.

Wieland és Brennt [1] már az ötvenes években megfogalmazták azt az elvet, mely szerint a peptid-

Mihala, N.

Research Group of Peptide Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, H-1518 Budapest 112 POB 32, Hungary, E-mail: mihala@szerves.chem.elte.hu

### Summary

This article is a brief review focused on the concept, criteria, limitations and types of chemical ligation strategies suitable for the synthesis of peptides, peptide mimetics and proteins with a native or a non-native structure. Utilizing unprotected peptides or proteins from either chemical or biosynthetic sources, these ligation strategies have been shown to be general and exceptionally mild. The strategy of chemical ligation offers a means to avoid size limitations imposed by the traditional chemical synthesis of proteins.

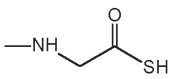
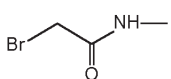
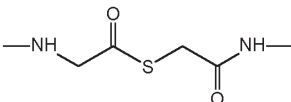
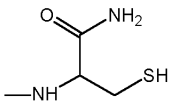
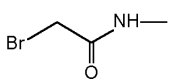
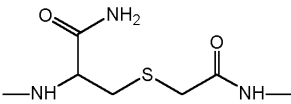
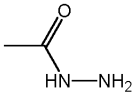
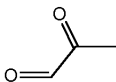
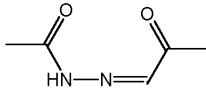
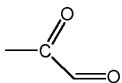
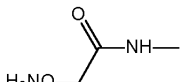
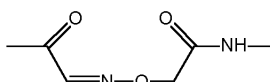
kötés kialakításához szükséges aktiválási energia csökken, ha csökken az entrópia. Vagyis amennyiben a reaktánsok geometriai elhelyezkedése kedvező (a megfelelő térállásban és úgy mond „közel” vannak), úgy csökken az entalpiatag, mely egyben a szelektivitás növekedését eredményezi. Szelektív reakció esetén nincs szükség a reaktív oldalláncok védelmére. A fenti elven alapuló módszert, mely két nem védett peptid között szelektíven hoz létre kovalens kötést, *kémiai ligációnak* nevezzük [2–4]. A kémiai ligációnak az az altípusa, melyben a szegmensek között amidkötés alakul ki, a natív kémiai ligáció (*native chemical ligation*).

A peptidkötés natív kémiai ligációval történő kialakítása nem egyszerű feladat. Ezt jelzi, hogy a probléma gyakorlati megoldására egészen eddig az évtizedig várnunk kellett. A korábban kidolgozott ligációs módszerek vagy nem amid típusú kötést hoznak létre a két partner között, vagy a peptidok részleges védelmét igénylik. A ligációs technikák közös jellemzője a reakció nagyfokú regiospecifitása és, hogy – ellentétben a hagyományos eljárásokkal – vizes oldatban mennek végbe. A ligációs módszereket a kötést létrehozó reakció mechanizmusa szerint három csoportba sorolhatjuk (*I. táblázat*).

I. táblázat A ligációs módszerek csoportosítása a reakció mechanizmusa szerint.

módszer	amidkötés	megjegyzés
kemoszelektív	-	fehérjekonjugációs módszerek
prior thiol capture	+	templáton történő acilvándorlás
ortogonális ligáció	+/-	kemoszelektív befogást követő acilvándorlás

II. táblázat Néhány kemoszelektív reakció típus.

az A szegmensen reagáló funkciós csoport	a B szegmensen reagáló funkciós csoport	a kialakuló kötés
 tiokarbonsav	 bróm-acetamido	 tioészter
 cisztein	 bróm-acetamido	 tioéter
 hidrazid	 aldehid	 hidrazon
 aldehid	 hidroxil-amin	 oxim

## A kemoszelektív ligáció

A kemoszelektív ligáció módszerével sikerült először két, védőcsoportot nem tartalmazó peptidláncot összekapcsolni. A módszer több variánsa ismert

Mihala Nikolett 1997-ben szerzett diplomát az Eötvös Loránd Tudományegyetem vegyész szakán. Jelenleg az



ELTE Doktori Iskolájának harmadéves hallgatója. Dolgozatát, mely a TIMP-1 C-terminálisának szintézisére és vizsgálatára irányul, a MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában készíti Süliné Vargha Helga irányításával.

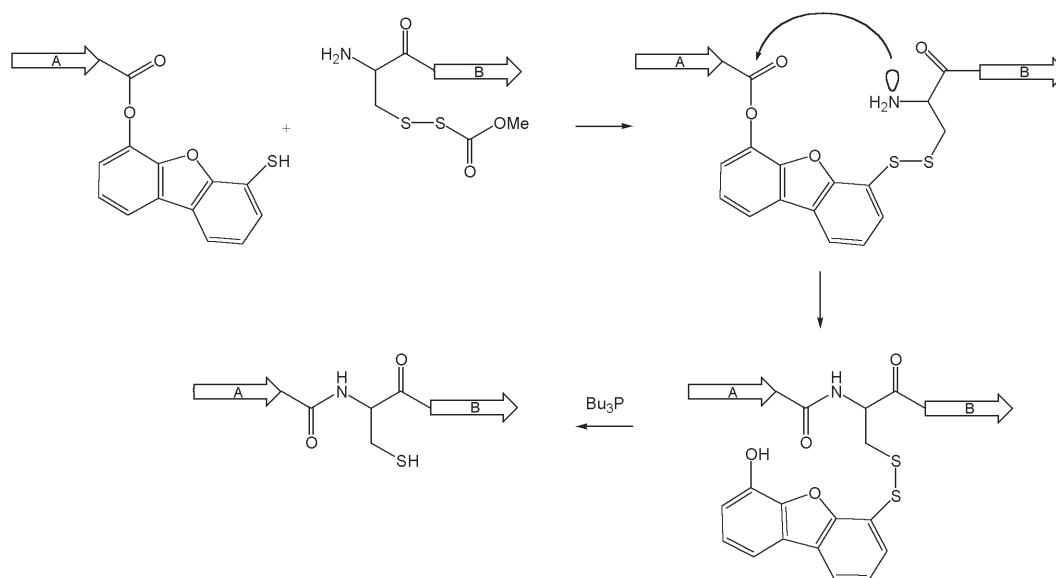
(II. táblázat), közös jellemzőjük hogy a szegmenseken elhelyezkedő elektrofil-nukleofil pár reakciójával egyik esetben sem amidkötés jön létre.

A legelső, nem védett peptidok kémiai ligációjával előállított nagy tagszámú peptid szintézise Kent és munkatársai nevéhez fűződik [5]. A csoport a 99 aminosavat tartalmazó HIV-1 proteázt építette fel két, 49, illetve 50 aminosavból álló egység közötti tioészterkötés kialakításával. A végtermék – mely homodimerje a ligációval előállított polipeptidnek – enzimatis aktivitása megegyezett a natív peptidláncot tartalmazó természetes proteázéval. A módszer hátránya, hogy a kialakuló tioészterkötés még enyhén bázikus közegben sem stabil. Nem

sokkal később ugyancsak Kent kidolgozta a stabilabb tioéterkötést eredményező módszert [6]. Ezzel párhuzamosan Rose és Offord aldehid- és hidrazid-csoportot tartalmazó peptidek reakciójával eljárást dolgozott ki hidrazon kötésű polipeptidek szintézisére [7]. Rose és Offord nevéhez fűződik az oximkötést kialakító módszer is [8]. Kent és munkatársai előállítottak kétféle kötéstípust (tioétert és oximot) tartalmazó enzimanalógot is [9]. Jóllehet ezek a módszerek (tioészter, tioéter, hidrazon, oxim stb.) széles körben használatosak a legkülönbözőbb biomolekulák előállítására, a kialakuló kötés érzékenysége miatt a figyelem új eljárások keresése felé fordult.

### A „prior tiol capture” módszer

A fent tárgyalt ligációs módszerekkel lehetőségessé vált jó kitermeléssel nagyméretű, nem védett peptidek összekapcsolása úgy, hogy jól definiált szerkezetű molekula keletkezzen, de natív szekvencia létrehozására nem alkalmas. Az első eljárást, mely szelektív amidkötést képes kialakítani Kemp dolgozta ki a kilencvenes évek elején [10]. A „prior tiol capture technika” újszerűsége abban rejlik, hogy a reakciópartnerek közé egy templátot iktat be, és ez biztosítja a reakcióhoz szükséges geometriai elrendezést. Ez a templát a triciklusos 4-hidroxi-6-merkaptodibenzofurán, mely észterként kapcsolódik az A fragmens C-terminális aminosav részéhez



1. ábra A „prior tiol capture” technika.

(1. ábra). Az első lépésben a B szegmens N-terminális védett/aktivált ciszteinje és a templát tiolcsoportja között diszulfidhíd jön létre, mely a két fragmens összekapcsolódását eredményezi. Ezután intramolekuláris acilvándorlás hozza létre az amidkötést.

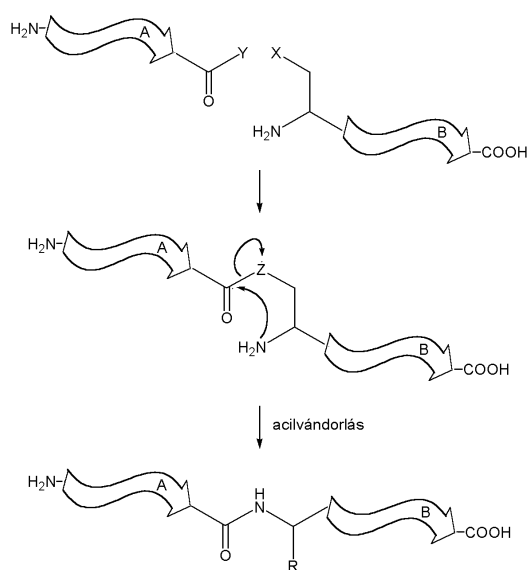
A reakciót nukleofil oldalláncú aminosavak (His, Arg, Lys) jelenléte nem zavarja. Az intramolekuláris acilvándorlás gyors, általában néhány óra, esetenként néhány perc alatt is végbemegy. A módszer alkalmazását korlátozza, hogy csak azoknál a peptideknél alkalmazható, ahol a Cys megfelelő pozícióban található.

### Az ortogonális kémiai ligáció

A harmadik, időrendben legkésőbb – 1992-ben – megjelent módszer azokat a reakcióvariánsokat írja le, melyekben először egy nem amid jellegű kötés alakul ki, melyet intramolekuláris acilezés követ a „térben egymáshoz közel került” amino- és karbonilcsoport között. (2. ábra) E módszert nevezzük Tam nyomán ortogonális ligációnak.

Érdeemes megjegyezni, hogy ez a reakciótypus köti össze az enzimátikus ligációt, a „splicing” módszereket és a kémiai szintézist. A kapcsolatot közöttük a zárólépésben fedezhetjük fel (észter-amid acilvándorlás).

A reakció két egymást követő lépésből áll: a befogásból, ill. az acilvándorlásból, ezért négy funkcióscsoportra van szükség. Általában a nukleofil részlet



2. ábra Az ortogonális kémiai ligáció elve

(X) helyezkedik az aminocsoporttal a B szegmens N-terminálisán, míg az elektrofil csoport (Y) C-ter-

minális észterként az acilező A szegmensben található. Fontos, hogy a komplementer pár reakciójával megfelelő távolság (3 kötéstávolságnyi vagy még kevesebb) jöjjön létre a B szegmensben lévő amino- és az A szegmens terminális karboxilcsoportja között.

Az itt tárgyalt technikák – a „prior thiol capture” módszerrel ellentétben – nem alkalmaznak templátot az amidkötés kialakításához, ezért az ott alkalmazott viszonylag nagy tagszámú gyűrű helyett itt az acilvándorlás egy kedvezőbb öt- vagy hattagú intermedieren történik. Mivel e stratégia nem korlátozódik csupán a tiolokra, nem szükséges a Cys jelenléte, így segítségükkel változatos kötéstípusokat hozhatunk létre.

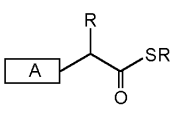
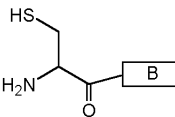
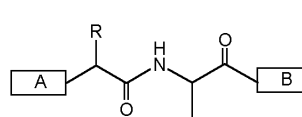
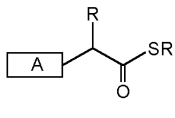
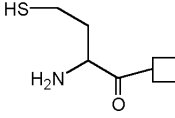
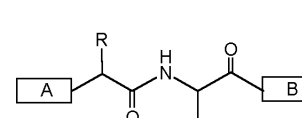
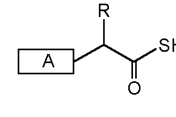
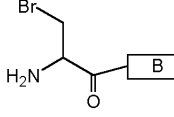
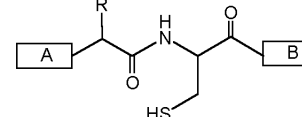
A táblázatok (III. táblázat) néhány lehetséges imin, illetve tioészter intermedieren keresztül létrejövő módszert foglal össze. Az imin típusú kötést kialakító módszereket Tam [3,11], a tioésztert képzőket Kent laboratóriumában dolgozták ki [11–14].

III. táblázat Ortogonális ligációs módszerek imin és tioészter intermedieren keresztül.

#### A. Ortogonális ligáció imin intermedieren keresztül

Módszer	az A szegmensben reagáló funkció csoport	a B szegmensben reagáló funkció csoport	a kialakuló kötés
tiazolidin X = S oxazolidin X = O			
	glikoaldehid-észter		tiazolidin X = S, oxazolidin X = O
His			
	glikoaldehid-észter	His	triazabicykulus
tiazabicykulus			
	$\gamma$ -formil-Abu	Cys	$\beta$ -turn peptid

## B. Ortogonális ligáció tioészter intermedieren keresztül

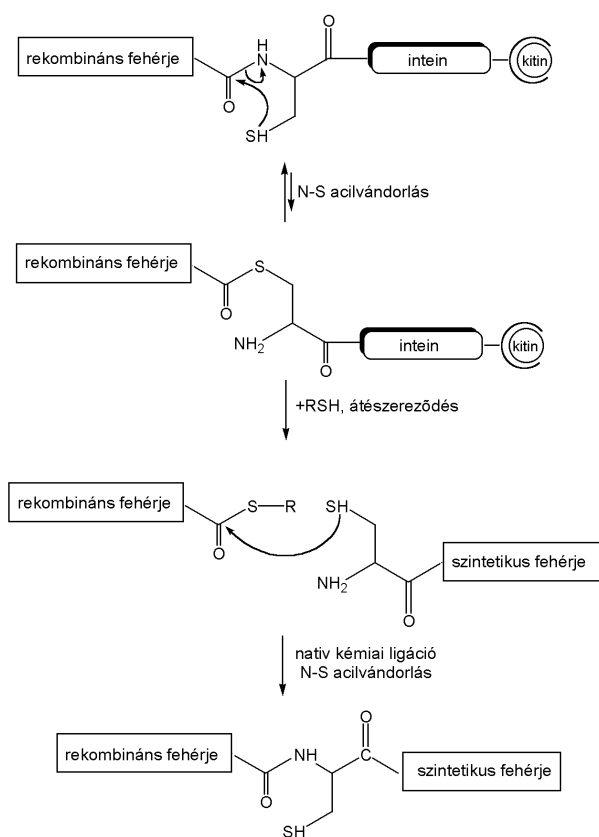
Módszer	az A szegmensen reagáló funkciós csoport	a B szegmensen reagáló funkciós csoport	a kialakuló kötés
Cys	 tioészter	 Cys	 Cys
Hcy	 tioészter	 Hcy	 Met
Br-Ala	 tiosav	 Br-Ala	 Cys

A reagáló csoportok kiválasztásakor a legegyszerűbb megoldás az, ha a B szegmens az *N*-terminális aminosav oldallánca a nukleofil reaktáns. A természetes aminosavak közül a Cys, Ser, Thr, Trp, His oldalláncai felelnek meg ennek a kritériumnak. A nem természetes aminosavak bőséges választékot kínálnak *N*-nukleofilekből, melyek peptidmimetikumok előállítására adnak lehetőséget. A *C*-terminálisnak az elektrofil csoportot és az acilező karbonilcsoportot kell tartalmaznia (A szegmens). E követelménynek tesznek eleget az egyszerre elektrofil és ugyanakkor acilező ágens *O*-glikoaldehidészter és az  $\alpha$ -tioészter.

Bár a táblázatból látszik, hogy az ortogonális ligációval milyen sokféleképpen megoldható két fragmens összekapcsolása, talán a legelőnyösebb, egyúttal a leggyakrabban alkalmazott eljárás a Cys, illetve Xaa- $\alpha$ -tioészter reakciója. E reakciót viszonylag részletesen tanulmányozták, optimalták. Megállapították, hogy több, a fehérjében jelen lévő Cys-csoport jelenlétében is megőrzi a szelektivitását. Segítségével ligációt szilárd fázison is lehetséges

vált létrehozni. A módszert kiterjesztették ciklopeptidek, elágazó peptidek, illetve mimetikumok szintézisére, sőt egy speciális tiol védőcsoporttal (Msc) megoldható a ligációs lépések egymás utáni végrehajtása. [15]. Az eljárás további előnye, hogy a reagáló szegmensek biokémiai úton *in situ* is előállíthatók.

Új fejezetet nyit a ligáció történetében az „*intein-mediated protein ligation*” (IPL) módszere (Xu és Muir), [16] (3. ábra). Az eljárás a természetben bekövetkező „*splicing*” folyamatot modellezi, melynek során az intron szekvencia (intein) is egy tioéter intermedieren keresztül hasad ki. Ha az inteinhez csak az egyik terminálisán csatlakozik extein szekvencia, a reakció leáll a tioészter szakaszban. Egy kereskedelemben beszerezhető vektor (pCYB) segítségével könnyen előállítható olyan fúziós fehérje, mely a tisztítást megkönnyítő kitin-kötő szakaszt is tartalmaz. A kitinoszlophoz kötött rekombináns fehérje tiol segítségével tioészterként eluálható és ligálható a kívánt szintetikus doménnel.



3. ábra Az intein mediált ligáció főbb lépései.

Ezt az új keletű technikát a biológiai és kémiai ligációs stratégiák ötvözéseként foghatjuk fel. Bizonyos értelemben ez a kémiai ligációs módszerek tetőpontja; segítségével könnyen hozzáférhetőek nem kódolt aminosavakat tartalmazó fehérjék, jelzett biomolekulák, polimer, illetve cirkuláris fehérjék. Ez a technika minden valószínűség szerint sok meglepetést tartogat még a peptidkémia számára.

### Irodalomjegyzék

- [1] Brenner, M. (1967) In: Peptides (Beyerman H.C., Van de Linde, A., Van den Brink, W. Eds.) (North Holland Publishing Company, Amsterdam) pp. 1-5.
- [2] Muir, T.W., Dawson, P.E., Kent, S.B.H. (1997) *Methods in Enzymology*, **289**: 266-298.
- [3] Tam, J.P., Yu, Q., Miao, Z. (1999) *Biopolymers*, **51**: 311-332.
- [4] Dawson, P.E., Kent, S.B.H. (2000) *Annu.Rev.Biochem.*, **69**: 923-960.
- [5] Schölzer, M., Kent, S.B.H. (1992) *Science*, **256**: 221-225.
- [6] Muir, T.W., Williams, M.J. Ginsberg, M.H., Kent, S.B.H. (1994) *Biochemistry*, **33**: 7701-7708.
- [7] Rose, K., Vilaseca, L.A., Werlen, R., Meunier, A., Fisch, I., Jones R.M., Offord R.E. (1991) *Bioconjugate Chem.*, **2**: 154-159.
- [8] Mikola, H., Hanninen, E. (1992) *Bioconjugate Chem.*, **3**: 182-186.
- [9] Canne, L.E. Ferré-D'Amaré, A.R., Burley, S.K., Kent, S.B.H. (1995) *JACS*, **117**: 2998-3007.
- [10] Kemp, D.S., Carey, R.I. (1993) *J. Org. Chem.*, **58**: 2216-2222.
- [11] Liu, C.F., Tam, J.P. (1994) *JACS*, **116**: 4149-4153.
- [12] Canne, L.E., Bark, S.J., Kent, S.B.H. (1996) *JACS*, **118**: 5891-5896.
- [13] Beligere, G.S., Dawson, P.E. (1999) *Biopolymers*, **51**: 363-369.
- [14] Hackeng, T.M., Griffin, J.H., Dawson, P.E. (1999) *Proc. Natl. Sci. USA*, **96**: 10068-10073.
- [15] Camarero, J.A., Cotton, G.J., Adeva, A., Muir, T.W. (1998) *J. Pept. Res.*, **51**: 303-316.
- [16] Evans, T.C., Xu, M.Q. (1999) *Biopolymers*, **51**: 333-342.
- [17] Ayers, B., Blaschke, U.K., Camarero, J.A. Cotton, G.J., Holford, M. Muir, T.W. (1999) *Biopolymers*, **51**: 343-354.



A veszprémi székhelyű  
**Biorex Kutató-Fejlesztő Rt.**  
<http://www.biorex.hu>



felvételre keres fiatal munkatársakat az alábbi munkakörökben:

- farmakológus, farmakológiai gyakorlattal
- molekuláris biológiai és/vagy biokémiai, sejtbiológiai gyakorlattal
- rendelkező biológus, orvos vagy vegyész kutató.

Az álláskeresőnek jó angoltudással kell rendelkeznie.

Jelentkezés:

- farmakológusok esetén Jednákovits Andreánál  
(andrea.jednakovits@rex.biorex.hu, 88-545-230)
- biológus, orvos vagy vegyész kutatók esetén Péntes Zoltánnál  
(zoltan.pentes@rex.biorex.hu, 88-545-253)

Bérezés és egyéb juttatások megállapodás szerint.

# Az egér kapcsolófehérje gén (*Crtl1*): szerkezet, kifejeződés és funkció

## The mouse link protein gene (*Crtl1*): structure, expression and function

Otgonchimeg Rentsendorj, Deák Ferenc és Kiss Ibolya

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet, 6701 Szeged, Pf. 521

### Összefoglalás

A kapcsolófehérje (LP) alapvető szerepet játszik a sejt közötti állomány szerveződésében azáltal, hogy stabilizálja a hialuronán és az aggregáló proteoglikánok, összefoglaló néven a hialektánok közötti kölcsönhatást. Üvegporcban a nagy vízmegkötő képességű hialuronán-aggregán-LP aggregátumok teszik összenomással szemben ellenállóvá a szövetet. A fehérje azonban kisebb mennyiségben más szövetekben is működik, és *N*-terminális peptidje növekedési hormonnaként is szerepel. Izoláltuk és jellemeztük a csirke és egér LP gént. Mindegyik 5 exont tartalmaz és 2 promoterről íródik át. Az *N*-végi, immunglobulinszerű domén aggregánhoz kapcsolódik, a *C*-terminális, az ismétlődő 2 modul pedig hialuronánnal lép kölcsönhatásba. Az egér LP gént (*Crtl1*) a *Dhfr* lokuszhoz közel, a 13. kromoszómára térképeztük. Eddig nem találtak olyan emberi betegséget, amely a gén mutációjának következménye. A *Crtl1* célzott inaktíválása viszont súlyos vázfejlődési rendellenességhez vezetett, törpességet és születés utáni halált okozva. Hogy mélyebb bepillantást nyerhessünk az LP szerepébe különböző szövetekben és fejlődési fázisokban, célzóvektort készítettünk, melynek segítségével a *lacZ* marker gént bevihetjük a gén irányítása alá, és feltételesen inaktíválhatjuk a *Crtl1* gént transzgenikus egerekben. Ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy X-gal festéssel kövessük a génkifejeződést, és bizonyos szövetekben és fejlődési állapotban inaktíváljuk a gént.

Rentsendorj, O., Deák, F., Kiss I.

Institute of Biochemistry, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-6701 Szeged, POB 521, Hungary

### Summary

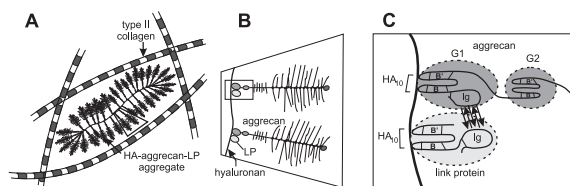
The link protein (LP) plays an essential role in the extracellular matrix by stabilizing the interaction of hyaluronan and the aggregating proteoglycans called hyalotans. In hyaline cartilage, the large swelling capacity of the hyaluronan-aggregan-LP aggregates enables the tissue to dissipate compressive load. However, LP seems to function in other tissues as well and its *N*-terminal peptide can also act as a growth factor. We isolated and characterized the chicken and mouse LP genes. Both are assembled from 5 exons and transcribed from two promoters. The mature protein consists of the *N*-terminal immunoglobulin-like domain, and the *C*-terminal, tandemly repeated modules, which interact with aggrecan and hyaluronan, respectively. The mouse LP gene (*Crtl1*) maps close to the *Dhfr* locus on chromosome 13. No human diseases associated to the gene have been described yet. However, recent inactivation of *Crtl1* showed similarities to spondyloepiphyseal dysplasias, causing dwarfism and postnatal lethality. To get further insight into the function and regulation of LP in various tissues and late developmental stages, we made a targeting vector to knock in the *lacZ* marker gene and perform conditional inactivation of *Crtl1* in transgenic mice. This strategy will allow us to monitor the *Crtl1* gene expression by X-gal staining and also to disrupt the gene in certain tissues or developmental stages.

Cartilage proteoglycan aggregates are one of the largest known macromolecular complexes with a molecular mass of  $10^8$  Da. They are formed by up to 100 aggrecan monomers linked to a central filament of hyaluronan (Figure 1). The third component of the aggregate is link protein (LP), which sta-

bilizes the complex by interacting with both hyaluronan and aggrecan. Hyaluronan and the 80–100 chondroitin sulfate and varying number of keratan sulfate side chains attached to the core protein of aggrecan are highly negatively charged. Therefore, the complex binds a vast amount of water. Within a



meshwork of type II collagen fibers, it works as a cushion and enables cartilage to withstand immense compressive load [reviewed in 1].



**Figure 1** The stabilizing role of link protein (LP) in the hyaluronan-aggregates. **A)** A single proteoglycan aggregate entrapped in collagen meshwork. **B)** Enlarged detail of the aggregate boxed in A. **C)** Further enlargement shows the interaction between hyaluronan decasaccharides and the immunoglobulin-like (Ig) and HA-binding modules (B, B') of LP and aggrecan. G1 and G2, globular domains.

### The role of link protein in the extracellular matrix

LP is a globular glycoprotein. The size varies between 40–48 kDa in different species. Direct protein sequencing and cDNA cloning revealed the structural basis of the function and size variation [2–4]. The three forms of LP are products of a single gene and differ in the degree of glycosylation and proteolytic cleavage of a short N-terminal peptide [5–7]. The precursor of chicken LP consists of 355 amino acids including the secretory signal peptide [3]. The mature protein is divided into three structural and functional domains, each stabilized by disulfide bonds. The N-terminal immunoglobulin-like domain interacts with aggrecan, while the C-terminal, tandemly repeated modules bind to 5 disaccharide units of hyaluronan [8, 9].

Early findings of LP in the aorta, chicken embryo eye and mesonephros already showed that expression of the gene is not restricted to cartilage [10–12]. Both the protein (*Figure 2*) and mRNA were identified by sensitive methods in many non-cartilaginous tissues, where LP may enhance interaction between hyaluronan and members of the aggregating proteoglycan (hyalectan) family [13]. This assumption was further verified by the hyaluronidase-sensitive accumulation of LP in mouse follicular development [14]. In brain, the aggregate-stabilizing function is provided by another, brain-specific link protein, discovered recently [15]. In addition to the stabilizing role, LP was shown to perform regulatory functions. Anchored to pericellular hyaluronan *via* the C-terminal modules, LP simultaneously binds urinary trypsin inhibitor *via* the N-terminal fragment [16]. In addition, the N-terminal 18 amino acids, which are removed from cartilage LP by stromelysin, can act as a growth factor [17].

**Figure 2** (on the front cover) Localization of link protein in a 14.5 mouse embryo by immunoperoxidase staining. All cartilage primordia of the skeleton are strongly stained. Accumulation of the protein can also be observed in the lung, glandular epithelium of the stomach and midgut.

### Structure and expression of the LP gene

We isolated and characterized genomic clones from chicken and 129/Sv mouse library. The structure of each LP gene studied to date correlates with the domain structure of the protein (*Figure 3*). The last 3 exons encode the interacting modules, the second exon codes for the secretion signal peptide and the first exon contains purely untranslated sequence [6,



**Otgonchimeg Rentsendorj** biológus, PhD-hallgató. Szakterülete a porcfehérje gének expressziója és regulációja.

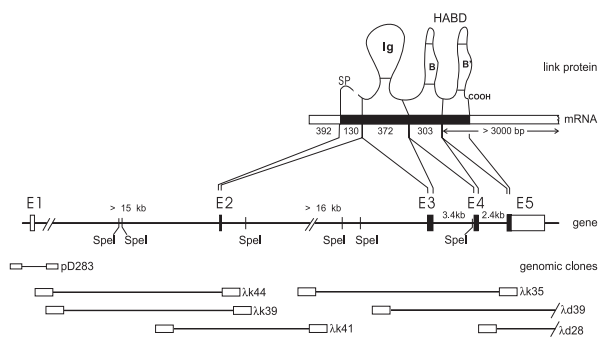
**Deák Ferenc** biológus, a biológiai tudomány kandidátusa. A MTA SZBK Biokémiai Intézet főmunkatársa. Munkaterülete a sejt közötti állomány makromolekuláinak szerkezete, funkciója, expressziója és evolúciója. Hosszabb időt töltött ösztöndíjjal Connecticutban, Chicagóban és Kölnben.



**Kiss Ibolya** biológus, a biológiai tudomány doktora. A MTA SZBK Biokémiai Intézet tudományos tanácsadója, egyetemi előadó és PhD-hallgatók témavezetője. Csoportjával több mint 15 éve a sejt közötti állomány fehérjéit kódoló gének klónozásával, szerkezetének, működésének és szabályozásának vizsgálatával foglalkozik. Ösztöndíjként több alkalommal Heidelbergben, valamint az USA-ban végzett kutatásokat.



18–22]. The exons are separated by long introns, increasing the size of the gene in chicken, mouse and man over 100 kb, 40 kb and 70 kb, respectively [6, 22]. The amino acid sequence of the interacting modules, especially in the hyaluronan-binding region, is highly conserved. In addition to this, the hyaluronan-binding domains of LP show high degree of similarity to the corresponding domains of aggrecan, versican, neurocan, brevican, CD44 and TSG-6 [23]. In the human genome sequence released to date, there are 13 genes that code for at least one hyaluronan-binding module [Barta, E., personal communication].



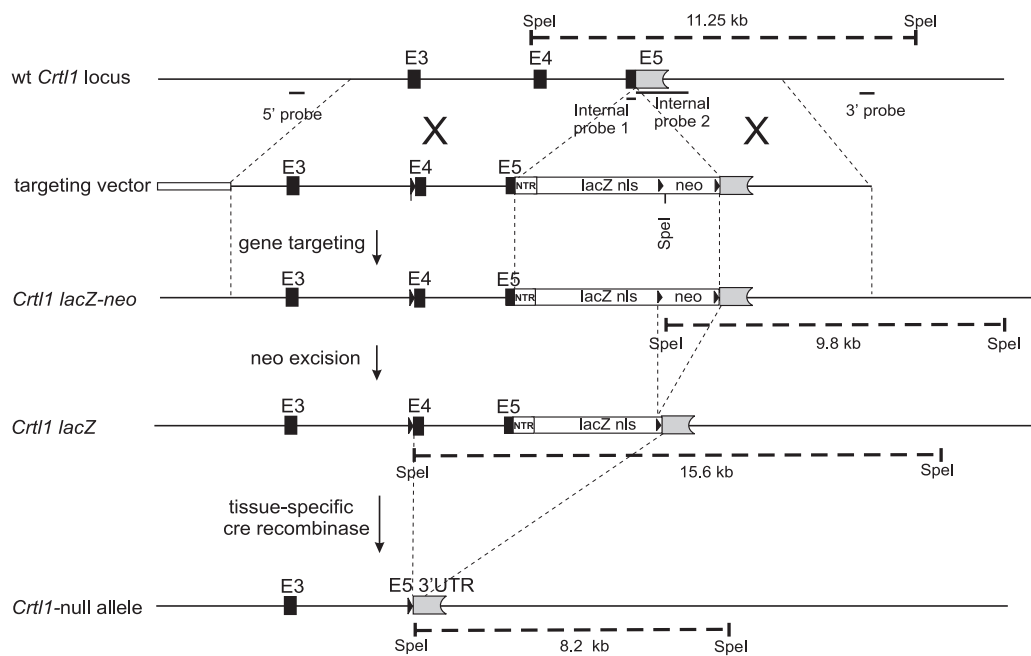
**Figure 3** Correlation between the protein modules, the structure of the mRNA and the gene for mouse link protein. Genomic clones are depicted below. Black boxes indicate the translated region. SP, signal peptide; HABD, hyaluronan-binding domain; E1-E5, exons.

Surprisingly enough, the length of the first exon and utilization of potential transcription regulatory motifs vary greatly between various LP genes. In Swarm rat chondrosarcoma [20] the first exon is 62 bp long only. In men, it is 289 bp [23]. We found in the mouse LP gene a strong promoter in the same position as in the rat, and a weaker one 332 bp more upstream [22]. The 5' untranslated region is rather complex in chicken [19]. Transcription from the preferred start site leads to formation of a 529 nt long 5'-untranslated region of high potential secondary structure. However, most of this region is removed by multiple, alternative splicing events. The second promoter, which is the stronger one in mouse, is of minor significance in chicken. We mapped the chromosomal position of *Crtl1* to mouse chromosome 13, tightly linked to *Dhfr* [22].

### Construction of a targeting vector for conditional inactivation of *Crtl1*.

The similarity between human and mice, in many aspects of mammalian anatomy and physiology, coupled with the close genome homology between these two species, makes mice an excellent model for illustrating the function of human genes. Gene targeting by homologous recombination in mouse ES (embryonic stem) cells is now a routine technique that is used to modify the mouse genome at any chosen locus. Recently, targeted inactivation of *Crtl1* by conventional techniques was published. Most of the newborn homozygotes died due to respiratory failure. The few survivors showed delayed endochondral bone formation and various skeletal abnormalities [24].

To get a further insight into the biological role and regulation of the gene in particular tissues and time points during development, we decided to follow a modified strategy and perform a conditional targeted inactivation of the gene. We determined a detailed restriction map of *Crtl1* and constructed a targeting vector, which carries the neo and *lacZ* cassettes between two homologous vector arms as well as loxP sites in silent positions (Figure 4). The neo gene, which is driven by the ubiquitous *Pgk* promoter and flanked by loxP sites for later removal, will be used to select for the presence of the transgene in ES-cell colonies. The vector was designed to facilitate screening of targeting events by Southern blots (Fig. 3) Homologous recombination in ES cells would lead to a size decrease of the fragment hybridizing with the 3' probe from 11.25 kb to 9.8 kb. Transcription from the neo cassette may affect the true LP gene expression pattern, therefore it will be removed, leading to generation of a 15.6 kb *SpeI* fragment. These ES-cell clones will be microinjected into blastocysts and the chimeras will be tested and bred further. Using this strategy, the promoterless gene, inserted into the 3'-untranslated region of *Crtl1* will be transcribed only in the LP-expressing cells. Translation from the *lacZ* cassette is aided by the upstream ribosome-binding site (NTR). Monitoring the *lacZ* expression in mice in the conditional k.o. mouse will elucidate the spatio-temporal expression pattern of the *Crtl1* gene in cartilaginous and non-cartilaginous tissues as well. Transgenic mice carry exons 4 and 5 between two loxP sites, allowing conditional gene inactivation. The loxP sites are targets for site specific recombina-



**Figure 4** Strategy for the targeted conditional inactivation of *Crt11*. Maps of the chromosomal locus, the targeting vector and the targeted allele before and after inactivation by Cre excision are shown. *SpeI* fragments, hybridizing with the 3' probe to verify the correct recombination steps, are also shown.

nation catalyzed by the Cre recombinase of the P1 bacteriophage. Gene segments flanked by two *loxP* sites of the same direction will be deleted in cells expressing the Cre recombinase, leaving behind only one copy of *loxP*. Therefore, crossing the homozygotes with any mouse strain expressing the Cre recombinase under the control of tissue- or developmental stage-specific promoters would lead to tissue- and time point-specific inactivation of the LP gene.

In conclusion, our research based on the conditional inactivation of the *Crt11* gene can contribute to the development of animal models of ECM diseases and can promote the identification of human genetic mutations in the locus. In addition to this, by monitoring the reporter gene expression by X-gal staining, we can get insight into the expression of the *Crt11* gene and the function of the protein in non-cartilaginous tissues as well.

## Acknowledgments

This work was supported by the U.S.-Hungarian Science and Technology Joint Fund under Project J.F.No.96/633 and Grant OTKA T034399.

## References

- [1] Neame, P. J., Barry, F. P. (1993) *Experientia*, **49**: 393-402.
- [2] Neame, P. J., Christner, J. E., Baker, J. R. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**: 3519-3535.

- [3] Deak, F., Kiss, I., Sparks, K. J., Argraves, W. S., Hampikian, G., Goetinck, P. F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **83**: 3766-3770
- [4] Doege, K., Hassell, J. R., Caterson, B., Yamada, Y. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **83**: 3761-3765.
- [5] LeGlédic, S., Périn, J. P., Bonnet, F., Jollés, P. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**: 14759-14761.
- [6] Kiss, I., Deák, F., Mestric, S., Delius, H., Soós, J., Dékány, K., Argraves, W. S., Sparks, K. J., Goetinck, P. F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **84**: 6399-6403.
- [7] Osborne-Lawrence, S. L., Sinclair, A. K., Hincks, R. C., Lacey, S. W., Eddy, R. L., Jr., Byers, M. G., Shows, T. B., Duby, A. D. (1990) *Genomics*, **8**: 562-567.
- [8] Bonnet, F., Perin, J., Lorenzo, F., Jollés, P. (1986) *Biochem. Biophys. Acta*, **873**: 152-155.
- [9] Perkins, S. J., Nealis, A. S., Dudhia, J., Hardingham, T. E. (1989) *J. Mol. Biol.*, **206**: 737-748.
- [10] Gardell, S., Baker, J., Caterson, B., Heinegard, D., Roden, L. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**: 1823-1831.
- [11] Tsonis, P. A., Goetinck, P. F. (1988) *Exp. Eye Res.*, **46**: 753-764.
- [12] Stirpe, N. S., Dickenson, K. T., Goetinck, P. F. (1990) *Dev. Biol.*, **137**: 419-424.
- [13] Binette, F., Cravens, J., Kahoussi, B., Haudenschild, D. R., Goetinck, P. F. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**: 19116-19122.
- [14] Sun, W. G., Kobayashi, H., Terao, T. (1999) *J. Histochem. Cytochem.*, **47**: 1433-1442.
- [15] Hirakawa, S., Oohashi, T., Su, W. D., Yoshioka, H., Murakami, T., Arata, J., Ninomiya, Y. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**: 982-989.
- [16] Kobayashi, H., Hirashima, Y., Sun, G. W., Fujie, M., Nishida, T., Takigawa, M., Terao T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**: 21185-21191.
- [17] McKenna, L. A., Liu, H., Sansom, P. A., Dean, M. F. (1998) *Arthritis Rheum.*, **41**: 157-162.
- [18] Rhodes, C., Doege, K. S., Sasaki, M., Yamada, Y. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**: 6063-6067.
- [19] Deák, F., Barta, E., Mestric, S., Biesold, M., Kiss, I. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **17**: 4983-4990.
- [20] Rhodes, C., Savagner, P., Line, S., Sasaki, M., Chirigos, M., Doege, K., Yamada, Y. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**: 1933-1939.
- [21] Dudhia, J., Bayliss, M. T., Hardingham, T. E. (1994) *Biochem. J.*, **303**: 329-333.
- [22] Deák, F., Mátés, L., Krysan, K., Liu, Z., Szabó, P. E., Mann, J. R., Beier, D. R., Kiss, I. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.*, **87**: 75-79.
- [23] Barta, E., Deák, F., Kiss, I. (1993) *Biochem. J.*, **292**: 947-949.
- [24] Watanabe, H., Yamada, Y. (1999) *Nature Genet.*, **21**: 225-229.

# **AKTIVIT**

# **hirdetés**

# A calretinin (kalciumkötő fehérje) NMR vizsgálata. Az első két domén.

## An NMR study of calretinin, a calcium binding protein. The first two domains.

Ambrus Attila<sup>1</sup>, Batta Gyula<sup>2</sup>, Kövér E. Katalin<sup>3</sup>, Patrick Groves<sup>#</sup>, Malgorzata Palczewska<sup>#</sup>, Jacek Kuznicki<sup>#</sup>

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem, Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet, 4012, Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

<sup>2</sup> Debreceni Egyetem, MTA Antibiotikum Kémia Kutatócsoport, 4010 Debrecen, Egyetem tér 1.

<sup>3</sup> Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 4010 Debrecen, Egyetem tér 1.

<sup>#</sup> Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw

Ambrus, A.<sup>1</sup>, Batta, Gy.<sup>2</sup>, Kövér, K.E.<sup>3</sup>, Patrick Groves<sup>#</sup>, Malgorzata Palczewska<sup>#</sup>, Jacek Kuznicki<sup>#</sup>

<sup>1</sup> University of Debrecen, Department of Biochemistry and Molecular Biology, H-4012, Debrecen, Nagyerdei krt. 98., Hungary

<sup>2</sup> University of Debrecen, H.A.Sc. Research Group of Antibiotic Chemistry, H-4010, Debrecen, Egyetem tér 1, Hungary

<sup>3</sup> University of Debrecen, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, H-4010, Debrecen, Egyetem tér 1, Hungary

<sup>#</sup> Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

### Summary

We prefer the modular approach to the structure of rat calretinin. As a first step, the CR I-II module, (residues 1-100 containing the first two EF-hand motifs of CR) has been expressed in *Pichia pastoris* and, <sup>15</sup>N and/or <sup>13</sup>C labelled protein was produced for NMR studies. Backbone assignment is

based on usual 3D triple-resonance experiments. For assigning the secondary structure elements chemical shifts, homonuclear couplings and NOEs were used. Relaxation and diffusion NMR corroborated that CR I-II is monomeric both in the apo and calcium loaded form in contrast to the 60% homologous rat calbindin D<sub>28k</sub> I-II module.

A calretinin (CR) elsősorban a neuronokban fordul elő és feltehetően Ca<sup>2+</sup>-puffer,- illetve Ca<sup>2+</sup>-szenzor-molekulaként fejt ki hatását, bár pontos biokémiai szerepe még nem tisztázott. Számos neurodegeneratív kórképben ún. „marker” molekulaként ismert, de a vonatkozó célfehérjék nem ismeretesek. A calretinin 271 egységből áll és 60% homológiát mutat a már széleskörűen vizsgált calbindinnel (CB). Mindkét fehérje három pár *EF-hand* típusú (hélix-hurok-hélix) Ca<sup>2+</sup>-kötő régióval rendelkezik. A calretinin biofizikai jellemzése sok hasonló tulajdonságot mutatott a calmodulinnal. Ca<sup>2+</sup>-ionok hatására jelentős szerkezeti változás jön létre a fehérje konformációjában, melynek során hidrofób felületek jelennek meg a molekulafelületen. A CR a szín-

tén *EF-hand* típusú S100 fehérjékhez hasonlóan Zn<sup>2+</sup>-kötő tulajdonsággal is rendelkezhet. Nemrégiben a calbindin első két doménjének szerkezetét meghatározták [1]. Lengyel szerzőtársaink először az első két domént fejezték ki *Pichia pastoris*-ban (nagy fehérjehozamú törzs) <sup>13</sup>C és/vagy <sup>15</sup>N izotópjelzett formában [2]. Az *EF-hand* fehérjék körében már sikerrel alkalmazott moduláris módszer [3] lényege az, hogy a modulok az egyesítést követően a natív fehérjéhez hasonló szerkezetet vesznek fel. Így az NMR eszközeinkkel (500 MHz <sup>1</sup>H frekvencia) még vizsgálható három kisebb (10–12 kDa) modul szerkezetét külön-külön, majd rekonstitúció után határozzuk meg. Jóllehet a CR I-II tömegspektrometriás (MALDI-ToF) vizsgálatai nem mutattak



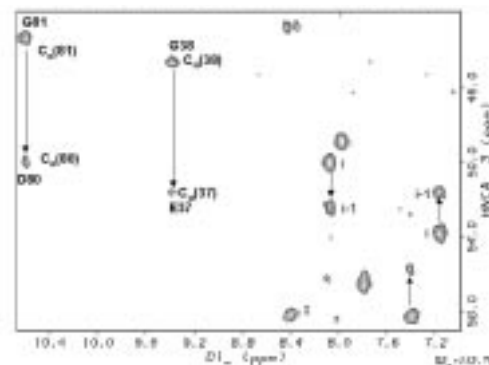
Természetesen az előbbi vizsgálatok is csak akkor értelmezhetők, ha az NMR jelhozzárendelés már ismert. Ez gyakran hosszadalmas, több lépésből álló folyamat [4,5]. Először a fehérje főláncában lévő  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}_\alpha$  kémiai eltolódásokat kell meghatározni, majd ennek ismeretében a megfelelő oldalláncjelek azonosítása következik. Ha az oldalláncok asszignációja ismert, akkor használhatók az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  távolságtól függő kísérletek. A  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  editált NOESY kísérletekből származó kényszerfeltételek felhasználásával molekuláris mechanikai módszerekkel lehet a térszerkezetet meghatározni. Munkánk jelen szakaszában a főlánc- és oldallánc-asszignáció van folyamatban. Az asszignációhoz felhasznált kísérletek a II. táblázatban láthatók a kémiai kötések keresztül nyerhető konnektivitási információ feltüntetésével. A háromdimenziós mérések időtartama néhány órától néhány napig terjedhet. A három frekvenciadimenzióban lehet például hidrogén, nitrogén és szén kémiai eltolódás.

**II. táblázat** Az asszignációhoz felhasznált NMR kísérletek és a megfelelő konnektivitások. A mintakészítés körülményei: 1 mM fehérje, 37 °C, 33 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaAc puffer, pH = 5,4, Shigemi NMR cső, Bruker DRX-500).

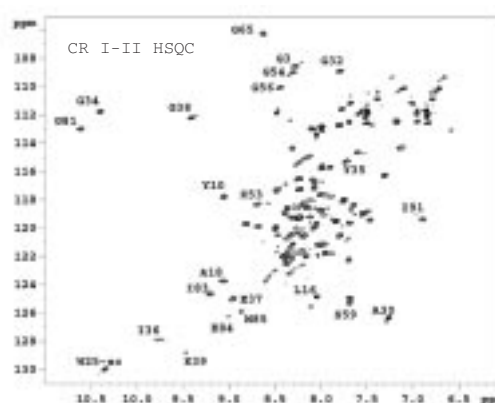
Kísérlés	Konnektivitás
HNCO	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C' <sub>i-1</sub>
HNCA	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C <sub>αi-1</sub> , C <sub>αi</sub>
HN(CO)CA	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C <sub>αi-1</sub>
CBCA(CO)NH	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C <sub>αi-1</sub> , C <sub>βi-1</sub>
CBCANH	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C <sub>αi-1</sub> , C <sub>βi-1</sub> , C <sub>αi</sub> , C <sub>βi</sub>
HBHA(CO)NH	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , H <sub>αi-1</sub> , H <sub>βi-1</sub>
(H)CC(CO)NH	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , C <sup>alif</sup> <sub>i-1</sub>
H(CC)(CO)NH	H <sub>i</sub> , N <sub>i</sub> , H <sup>alif</sup> <sub>i-1</sub>
HCCH	H <sup>alif</sup> , C <sup>alif</sup>
$^{15}\text{N}(^{13}\text{C})\text{NOE HSQC}$	NH – egyéb protonok
NOESY-HSQC	NH – egyéb protonok
TOCSY-HSQC	NH – egyéb protonok

Az asszignálást segítik a CB I-II ismert jelhozzárendelése, valamint a relaxációs mérések adatai is, amelyek azonosítják a terminálisokhoz közeli, lassabban relaxálódó egységeket. További segítség néhány aminosav sajátos spinrendszere és karakterisztikus C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> eltolódásaik (glicin, alanin, treonin, szerin, prolin). A szekvenciális asszignációt csak olyan kísérletekkel végezhetjük el, amelyek információt adnak a szekvenciában az i-edik aminosav valamely atomjáról és annak szomszédjairól is (általában a C-terminálistól az N-terminális felé haladva), amint a 2. ábrán látható. A felsorolt technikák felhasználásával rendelkezésünkre áll egy részleges főlánc- és oldallánc-asszignáció, amelynek biztos pontjait a 3. ábrán tüntettük fel.

HNCA 3D kísérlet metszete – CR I-II [ $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] 1mM, 309K



2. ábra Szekvenciális asszignáció a HNCA kísérlet alapján.



## Proteázok: az eredeti gyógyszerkutatás molekuláris célpontjai



A Magyar Biokémiai Egyesület Gyógyszerbiokémiai Szakosztályának XVI. Munkaértekezlete a hagyományos balatonőszödi helyszínen a címben jelzett témakörben zajlott 2001. május 21. és 23. között, 109 regisztrált résztvevő jelenlétében. A témaválasztás a nemzetközi (és ennek nyomán a hazai) eredeti gyógyszerkutatási trendek szemléleti megújulását tükrözi. Ma már egyértelmű, hogy a szűrővizsgálati rendszerek technikai fejlődése, automatizálása és a számítógépes adatfeldolgozás a nagyméretű vegyülettárak és a kombinatorikus kémiai módszerek széles körű alkalmazása akkor használható ki igazán, ha a kutatás középpontjában egy jól megválasztott molekuláris célpont (*target*) áll. Ezt a tendenciát erősíti a humán genom megismerése. A bevezető előadások (Arányi Péter, Falus András) a funkcionális genomika térhódítását mutatták be a gyógyszerkutatás célpontjainak kiválasztása és validálása területén.

A részletesen tárgyalt proteázok közül legnagyobb hangsúlyt a hemosztázisban szerepet játszó enzimek, különösen a trombin és a Xa-faktor kaptak.

Összesen négy előadás hangzott el ebben a témakörben (Blaskó György, Machovich Raymund, Szabó Gabriella, B. Kovács Attila). Blaskó György általános elméleti bevezetőjétől a jelenleg FDA-engedélyeztetés alatt álló Arixtra (Sanofi-Synthelabo/Organon) klinikai vizsgálati eredményeinek ismertetéséig terjedt a skála. A központi idegrendszer proteázairól három előadás szólt (Friedrich Péter, Penke Botond, Kovári Zoltán).

A renin-angiotenzin rendszer enzimeire ható (ma már sláger) gyógyszerek szerepeltek Fischer János és Bajusz Sándor előadásában. Elméleti kérdésekkel foglalkozott Keserű György és Dormán György. Új molekuláris célpontok kutatási alkalmazásai képezték Patthy László, Gráf László, Mikus Endre, Kapui Zoltán és Kánai Károly előadásainak a témáját.

A résztvevők vitakészsége tette a légkört különösen érdekessé. Szándékaink szerint a XVII. Munkaértekezletre 2002. május 27–29. között kerül majd sor.

*Arányi Péter*

A MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály elnöke





## IX. Fermentációs Kollokvium

Az 1992-es legutóbbi, Hajdúszoboszlón megtartott rendezvényt követően nyolc évet kellett várnunk a IX. Fermentációs Kollokvium megrendezésére, amelynek 2000. október 5. és 8. között Debrecen adott otthont. A Magyar Biokémiai Egyesület Biotechnológiai Szakosztálya, a MTA Biomérnöki Munkabizottsága, a MTA Debreceni Akadémiai Bizottságának Gyógyszer és Vegyipari Bizottsága, valamint a Magyar Mikrobiológiai Társaság Ipari Mikrobiológiai Szakosztálya a Debreceni Egyetem közreműködésével szervezte meg a négynaposra bővült rendezvényt a Debreceni Akadémiai Bizottság székházában. A Kollokvium mottójául a programbizottság a következő Pasteur-idézetet választotta:

*„Microbiologie industrielle?*

*Il ny a pas des sciences appliques...*

*Mais ily a des applications de la science.”*

amellyel tisztelettel adózott a mikrobiológia tudományos eredményeit hasznosító neves „biotechnológus” emlékének.

A rendezvény első két napján előadások hangzóttak el, a harmadik napra szakmai kirándulást szerveztek a résztvevők számára, míg a negyedik napon a biotechnológia oktatásáról folyt kerekasztalvita a meghívott debreceni, szegedi, pécsi és budapesti oktatók közreműködésével.

Szigorúan szakmai szempontok alapján a rendezvény legizgalmasabb része természetesen a sok-sok



érdekesítő előadás volt, amelyek mellett poszterbemutató is színesítette a palettát, valamint néhány biotechnológiai cég bemutatkozására is lehetőség nyílt. Az előadások (poszterek) a biotechnológia alkalmazásának tág kereteit fessegették: hallhattunk a géntechnológiáról éppúgy, mint borászati starter kultúrákról, növényi sejtfermentációról, élesztőkről és szilárd fázisú fermentációról, környezetvédelmi

(petrolkémiai szennyvíztisztítás), gyógyszeripari (Biogal, Richter) és energetikai (biogáz, bioetanol) alkalmazási területekről egyaránt. Talán mindannyiunk számára a legérdekesebb Olasz Katalin (Richter Gedeon Rt.) előadása volt, aki a mikroorganizmusok kommunikációjáról tartott (a szó szoros értelmében vett) hihetetlen előadást. Elképesztő tényeket, megtámadhatatlan kísérleti eredményeket tárt elénk arról, hogy a mikroorganizmusok bizony képesek kommunikálni egymással, ez bizonyítható, sőt – esetleg már a közeljövőben – az emberiség által felhasználható is lesz.

A szakmai programot remekül egészítette ki a Debrecen városán belüli két üzemlátogatás, valamint az október 7-ére szervezett kirándulás (Borsodi Sörgyár, Oremus pincészet), ahol „a történelem előtti időktől létező és ma is virágzó biotechnológiai eljárásokat” tekinthették (sőt kóstolhatták) meg a szerencsés (és előrelátó) résztvevők.

*Bélafiné, Bakó Katalin*



Felhívjuk tagtársaink figyelmét, hogy a *Federation of the European Biochemical Societies* (FEBS) weboldalán új levelezőlista indult, amely e-mail útján tájékoztat minden érdeklődőt a FEBS akcióiról, eseményeiről, Főtitkárságának, illetve tagintézményeinek híreiről.

Az érdeklődők a levelezőlistára a

[http://www.febs.unibe.ch/e-mail\\_registration.asp](http://www.febs.unibe.ch/e-mail_registration.asp)

internetcímen iratkozhatnak fel.

## Beszámoló a negyedik, ötödik és hatodik Hőgyes Délutánról

Az immár hagyománnyá váló Hőgyes Délutánok előadásorozata – a korábbi nagy érdeklődés mellett – tovább zajlik. Minthogy legutóbb a harmadik ilyen rendezvényről adtunk számot (*Biokémia, XXIV: 120–121, 2000. december*), az azóta megtartott három alkalomról együttes ismertetőt teszünk közzé.

### *A negyedik Hőgyes Délután*

A „Hőgyes délutánok” előadásorozat tavaly őszi szekciója 2000. szeptember 26-án kezdődött meg. Az első előadást Klebovich Imre (EGIS Rt.) „Farmakokinetikai és metabolizmusvizsgálatok szerepe és jelentősége a klinikai gyógyszerfejlesztésben” címmel tartotta. Az előadó elmondta, hogy az utóbbi években világméretben exponenciálisan felértékelődött a farmakokinetikai vizsgálatok jelentősége, mind az originális, mind a generikus vegyületek esetében, és ezzel párhuzamosan jelentős mértékben szigorodott a különböző típusú vizsgálatok hatósági szabályozottsága is. Az előadó átfogó képet mutatott be a – manapság az originális vegyületek törzskönyvezéséhez immár kötelező – humán farmakokinetikai és metabolizmusvizsgálatokról. A szükséges „need-to-know” és „nice-to-know” farmakokinetikai, *in vitro* metabolizmusvizsgálatokat új típusú csoportosításban, feladatorientáltan, és nem a klasszikus Fázis I–IV. vizsgálati osztályozásban mutatta be, kitérve az egészséges önkénteseken, illetve betegeken végzendő új vizsgálatokra. Külön bemutatta a humán „radioaktív farmakokinetikai csomagot”, amelynek szabályozottsága különösen nagy változásokon ment keresztül az elmúlt években (pl. a beadható maximális radioaktív dózis az egyhatodára csökkent). Részletes bemutatásban szerepeltek többek között a „vegyes farmakokinetikai vizsgálati kategóriába” tartozó populációs farmakokinetikai vizsgálatok, a különböző típusú gyógyszer–gyógyszer és gyógyszer–étel interakciók, különféle korszerű gyógyszertechnológiai formák (pl. retard készítmények) stb. új vizsgálati típusai és ezek hatósági szabályozása.

A generikus vegyületek és a „generikus plusz” készítmények bioekvivalencia és farmakokinetikai hatósági előírásai – leginkább az elmúlt időszakban – szigorodtak, s ez nemcsak a vizsgálati elrendezésre, a bioekvivalencia statisztikai értékelésére vonat-

kozó, hanem a bioanalitikai és a módszervalidálási előírásokat is érinti. A ma törzskönyvezett legfontosabb nagy hatékonyságú gyógyszervegyületek terápiás dózisa jelentősen csökkenő tendenciát mutat, így az igen alacsony pg/ml, alsó ng/ml tartományba eső plazmakoncentráció méréséhez igen nagy érzékenységű és hatékonyságú bioanalitikai módszerekre van szükség, így a módszertan jelenleg egyértelműen a HPLC-MS/MS technika irányába tolódik el.

Néhány, a saját gyakorlatból vett példa bemutatása után, az előadás végén, összefoglalásra került, hogy a korszerű gyógyszerkutatás és -fejlesztés keretén belül hogyan járulnak hozzá a farmakokinetikai és metabolizmusvizsgálatok a vegyületek törzskönyvezéséhez, alapvető egyedüli, illetve kiegészítő információkat szolgáltatva az alábbi vonatkozásokban:

- a gyógyszer sorsának nyomon követése a szervezetben;
- a dózis–hatás kapcsolat felderítése;
- a dózis kiválasztása;
- inter- és intraindividuális különbségek felderítése;
- gyógyszeres és étel interakciók hatása a terápiára;
- a mellékhatások farmakokinetikai aspektusai;
- farmakológiai aktív és inaktív metabolitok, valamint ezek szervezeten belüli sorsának felderítése;
- metabolitok sztereoizomériája.

Ezután Furka Árpád „Kombinatorikus kémia” című előadása következett. Az előadásból megtudtuk, hogy az új vegyületek és új anyagok kutatása és gyakorlati felhasználása meghatározó módon befolyásolja mindnyájunk mindennapi életét. A műanyagok, félvezetők, lumineszcens anyagok, új gyógyszerek és egyéb fontos anyagok nélkül már el sem tudnánk képzelni az életünket. Annak ellenére, hogy az ipar számos területén teret hódított az automatizálás, az új anyagok kutatásában a közelmúltig a hagyományos módszereket alkalmazták. Az új anyagokat egyenként állították elő, és sajátágaikat is egyenként vizsgálták. A kilencvenes években ezt a helyzetet gyökeresen megváltoztatta a kombinatorikus módszerek megjelenése,

amely legelőször a gyógyszerkutatásban idézett elő forradalmi változást. A kombinatorikus kémiában kétféle módszert használnak: valódi kombinatorikus szintézismódszereket és a parallel módszert. Az előbbieket példázza az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén kidolgozott ún. megosztásos-keveréses (*split-pool*) módszer, amelyet sokkomponensű peptidok szintézisére dolgoztak ki, és amelyet ma a világon mindenütt használnak mindenféle szerves vegyülettárak előállítására. A módszer az ún. szilárd fázisú eljárás alapul. A peptidszintézis egy kapcsolási ciklusát a következő három, egyszerű művelettel helyettesíti: (1) a hordozó gyantát egyenlő adagokra osztja, (2) mindegyik adaghoz más-más aminosavat kapcsol és (3) a kapcsolás végén az adagokat alaposan összekeveri. Ezeket a műveleteket kell folytatni mindaddig, amíg a peptidok eléri a kívánt tagszámot. A módszer elterjedését igen előnyös sajátosságai magyarázzák. Így például felhasználóját képessé tette arra, hogy egy hét alatt több vegyületet állítson elő, mint amennyit az addig élt összes vegyész gyártott a kémia teljes történelme folyamán. A ciklusok végrehajtása révén minden olyan vegyület képződik, közelítőleg 1:1 mólarányban, amely a szintézis során felhasznált építőelemek (pl. aminosavak) kombinációjával elméletileg levezethető. Innen a kombinatorikus szintézis elnevezés. Ráadásul a hordozó minden szemcséjén csak egyfajta vegyület képződik, és keverékhez csak akkor jutunk, ha a vegyületeket lehasítjuk a hordozóról. Ma már ismertek olyan stratégiák, amelyek révén azonosítani lehet vegyülettár azon komponensét, amely a számunkra előnyös tulajdonságot mutatja. További előrehaladást jelent az előadó és amerikai munkatársai által kidolgozott ún. „string” szintézis, amely lehetővé teszi, hogy makroszkopikus hordozóegységeket felhasználva nagyszámú ismert vegyületet az előzőeknél nagyobb, egyenként mintegy 10–50 milligrammos tételben lehessen előállítani. A kombinatorikus kémiában alkalmazott másik megközelítés, az ún. parallel szintézismódszer, nagymértékben támaszkodik az automatizálásra. Egy automatikus csúcskészülékkel közel 400 vegyületet lehet egyetlen menetben készíteni.

A kombinatorikus kémiát ma már elterjedten alkalmazzák a katalizátorok kutatásában és többek között az anyagtudományokban, sőt újabban a biológiában is. A megosztásos-keveréses módszerrel előállított vegyületek katalitikus hatását például úgy vizsgálják, hogy a képződött vegyületeket tar-

talmazó hordozószemcséket a szubsztrátoldatába helyezik. A katalizátort tartalmazó szemcséket a reakcióhő kicsit felmelegíti, és azok az infravörös érzékelőben fényes foltokként jelennek meg. Az új lumineszcens anyagokat pedig egymástól eltérő összetételű, vékony filmdarabkák alakjában viszik fel egy felületre, majd vizuálisan megállapítják azok fényességét. A foltok kialakításánál a felület egy részét – a chipgyártáshoz hasonlóan – maszkokkal takarják el. Bár a kombinatorikus kémia mindössze egy évtizedes múltra tekinthet vissza, ma már elfogadott tudományággá vált. A Magyar Kémikusok Egyesületében működik egy kombinatorikus kémiai szakcsoport, és megalakult a kombinatorikus tudományok európai szervezete is. Eddig mintegy 5000 szakcikket és 60 könyvet publikáltak ebben a témakörben. Várható, hogy a kombinatorikus módszerek alkalmazása újabb területekre terjed ki és hozzájárul mindnyájunk életminőségének javításához.

#### *Az ötödik Hőgyes Délután*

A 2000. év záróeseményét Mátyus Péter nyitotta meg november 14-én, amikor ismét két nemzetközileg is elismert szerző kiváló előadását hallgathatta meg a nagyszámú hallgatóság. Elsőként Mandl József (Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem) „*Transzkripció faktorok szerepe a biotranszformáció szabályozásában*” című előadása volt hallható. Az biotranszformáció meghatározásában korábban alapvető kitétel volt, hogy olyan folyamatokról van szó, amelyek nem irányulnak ATP-termelésre. Az elmúlt évtizedek során számos bizonyíték halmozódott fel annak a hipotézisnek az alátámasztására, hogy e folyamatrendszer eredeti funkciója azon endogén metabolitok átalakítása, amelyek nem szubsztrátjai az intermediér anyagcsere enzimeinek, s zömükben kémiai jelként viselkedő molekulák (pl. hormonok). Ezért a drog metabolizmus/biotranszformáció biológiai jelentősége a detoxikáció mellett a szignálmolekulák metabolizmusában is megnyilvánul. Ez azt is jelenti, hogy a drogmobilizmus enzimeinek állapota és indukáltsági foka jelentősen meghatározza a jelátadást. A drogmobilizmus nem külső anyagok átalakítására alakult enzimrendszer, hanem endogén anyagokat alakít át széles, átfedő szubsztrátspecifitású enzimek segítségével. Ezért képes számos xenogén molekula átalakítására is, amelyek zömükben endogén molekulákra „hasonlítanak”. A drogmobil-

tabolizmus enzimeinek (DME) függése a szubsztát-ellátástól régóta ismert kapcsolat az intermedier anyagcserével (NADPH – a pentóz-foszfát-ciklus ellátása, UDP glukuronsavigény – glikogénlebon-tás, glutationképzés – aminosav-anyagcsere, acetyl CoA-képződés stb.) Az is jól ismert, hogy a biotranszformáció első, előkészítő fázisa során reaktív oxigénszarmazékok (ROS) keletkezhetnek, amelyek ily módon befolyásolják a sejt redox állapotát, antioxidáns státuszát. A biotranszformáció, az intermedier-anyagcsere és a redox állapot egymással többszörös kölcsönhatásban állnak, mely kapcsolat azonban nem csak a metabolitok szintjén érvényesül.

Azok a kémia jelek, amelyek a jelátadási folyamatok szignálmolekulái, nemcsak a szignálmolekulák, hanem az esetek jelentős százalékában transzkripció faktorok ligandumai is. Más fogalmazásban a drogok receptorokon keresztül hatnak. A farmakológiai hatás sokszor transzkripció faktorokon keresztül érvényesül. A drogmatabolizmus ebben az értelemben effektor/ligandum metabolizmus. A DME szubsztátjai – mind xenogén, mind endogén szubsztátok esetén – számos esetben befolyásolják a DME-t kódoló gén expresszióját is. Több szubsztát (fenobarbitál, klofibrát, több szteroid stb.) ismert induktor. A DME koordinált indukciója régóta ismert jelenség, s a drogmatabolizmus szabályozásában is több transzkripció faktor szerepel. Ezen transzkripció faktorok szerepe azonban igen sokrétű: szerepelhetnek a fentiekén kívül az intermedier-anyagcsere és a redox homeostasis szabályozásában is.

A szteroid-thyroid-retinoid receptorok szupercsaládjába több olyan transzkripció faktor sorolható, amelyek több DME szabályozásában részt vesznek. Így a CYP2, CYP3, CYP4 géncsaláddhoz tartozó egyes citokróm P450 izoenzimek induktorai hathatnak ily módon is. Mindeközben ismertek e receptorok az intermedier-anyagcsere meghatározó különböző hatásai. Például a PPAR $\alpha$  a CYP4 géncsaládba tartozó enzimek mellett a zsírsav-anyagcsere egyes enzimeinek expressziójára hat. Az is ismeretessé vált, hogy a PPAR $\alpha$  liganduma, a klofibrát hatással van az intracelluláris redox státuszban fontos szerepet játszó aszkorbát/dehidroaszkorbát metabolizmus kulcsenzime, a gulonolaktón oxidáz szintézisének szabályozására. Így a PPAR $\alpha$  is azon transzkripció faktorok közé sorolható, amelyek részesei az intermedier-anyagcsere,

a biotranszformáció és a redox homeostasis koordinált szabályozásának.

Másik példaként az aril szénhidrogén- (Ah-) receptor szolgálhat. Az Ah-receptor a PAS-bHLH fehérjék közé tartozik. Ezen géncsalád tagjai szintén komplex szerepet játszanak, főként az egyedfejlődésben, valamint a korábbi gondolatmenetet némileg megkérdőjelező módon a környezeti stimulusok jelátvitelében. Az AhR-ARNT, illetve a HIF1-ARNT dimerek szerepéről számos adat van a policiklusos aromás szénhidrogének, mint súlyos környezetkárosító anyagok (dioxin stb.) hatásainak közvetítésében, valamint a hypoxia jelpályában. A kísérletek alapján a munkacsoport leírta az Ah-receptor szerepét a gulonolaktón oxidáz expressziójának szabályozásában, amely része az Ah-receptor redox homeostasis befolyásoló génekészletének.

A diabetes mellitus komplex példája az intermedier-anyagcsere, a redox homeostasis és a drogmatabolizmus együttes zavarának. Az *in vivo* vizsgálatok az ismert CYP2E1-indukció mellett a GLUT1A1-indukciót is kimutatták májban, az oxigénszenzitív géntermék VEGF indukciójával egyetemben, amelyben – az EMSA kísérletek alapján – a HIF1 $\alpha$ -ARNT dimer mellett a CREB transzkripció faktor is részt vesz. A komplex rendelkezés több transzkripció faktor kapcsolatán keresztül érvényesül.

A következő előadásban Nicholas Bodor (Gyógyszerkutató Intézet/Ivax Corporation/ University Florida) „A retrometabolikus gyógyszertervezés újabb eredményei” című előadását hallhattuk. Az előadásból megtudtuk, hogy a modern gyógyszerkutatás és -tervezés egyik fontos szempontja a gyógyszer-molekula (és metabolitjai) toxicitásának csökkentése, vagyis a terápiás index növelése kell legyen. A Bodor professzor által alkalmazott retrometabolikus megközelítések új módszereket kínálnak a cél elérésére. Lehetővé teszik – a szerkezet-hatás összefüggések, a szerkezet-metabolizmus összefüggések és a fizikai-kémiai megfontolások figyelembevételével – a szerkezet kívánt helyén ható, biztonságos gyógyszerek létrehozását. Az ún. retrometabolikus hurok magába foglalja a kémiai gyógyszerirányító rendszerek (*chemical delivery system*, CDS) és a ún. lágy gyógyszerek (*soft drug*, SD) tervezését. A CDS a gyógyszer valamely szervhez (agy, retina) történő célra irányítását és „bezárását” valósítja meg, míg az SD a terápiás hatás kifejtése után megtervezett és irányított módon elveszti hatását. A CDS önmagában hatástalan és a helyszínen metabolikusan

aktiválódik, az SD viszont hatékony vegyület, amely metabolizmusa során veszélytelen anyagokká alakul. Számítógép alkalmazásával ma már egy új vegyület fizikai-kémiai paramétereit és metabolizmusa is modellezhető. Lényegesen csökkenthető a kipróbálással járó munkaidő- és anyagigények és így előzetesen megtervezhető a potenciális gyógyszerjelöltek. Az előre megtervezett és irányított metabolizmus pedig jelentősen javítja a leendő gyógyszer terápiás indexét. A nem kívánt mellékhatások, a toxikus közbelső termékek kiküszöbölése révén jelentősen csökkennek, leegyszerűsödik a hatás- és eloszlásprofil, a gyógyszerkölcsönhatások pedig – a túlterhelt enzimrendszerekért versengő metabolizmus elkerülésével – kiküszöbölhetők.

Az előadó a fenti megközelítés gyakorlati alkalmazásait példákkal illusztrálta. Többek között ismertette a lágy béta-blokkolók terápiás felhasználhatóságát, valamint a „molekuláris becsomagolás” módszerét, melynek segítségével például neuropeptidok átjuttathatók a vér-agy gáton. A retinális transzport megvalósítása a természetes gyógyszerek kutatása szempontjából jelentős. Bodor professzor és kutatócsoportja egyedülálló módon oldotta meg a kortikoszteroidok mellékhatásainak eliminálását. A lágy szteroidok köréből a közelmúltban két új természetes készítmény (Lotemax és Alrex) került forgalomba. A vegyületcsoport vizsgálata és fejlesztése számos más hatásterületen (indikációban) is folyamatban van.

#### *A hatodik Hőgyes Délután*

A „Hőgyes délutánok” előadássorozat keretében Falus András, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet igazgatója „*A hisztamin szerepe az immunregulációban; mire tanít egy knock-out egér*” címmel 2001 februárjában tartott nagy sikerű előadást. Szakirodalmi adatok, többek között az előadó eredményei alapján egyre több, többé-kevésbé indirekt bizonyíték szól amellett, hogy a testszerte viszonylag nagy mennyiségben jelen lévő hisztamin – túlmenően az eddig is jól ismert élettani hatásokon (vasodilatáció, simaizomkontrakció, gyomorsav-elválasztás, neurotransmisszió) – jelentős mértékben befolyásolja az immun- és gyulladásos válaszreakciókat. Jelen van gyakorlatilag minden benignus (pl. embrionális szövetek, csontvelő, regenerálódó szövetek) és malignus (tumoros szövetek és sejtvonalak) módon osztódó sejtben és szövetben. Kiderült az is, hogy a

hisztamin autokrin és parakrin módon szabályozza a sejtosztódást.

Egyre több bizonyíték támasztja alá azt is, hogy az immunregulációban döntő jelentőségű T-sejt polarizáció során a hisztamin lokálisan a Th1/Th2 egyensúlyt Th2 irányába tolja el, azaz a hisztamin termelődése helyileg a sejtközvetített immunválasz gyöngülésével és a humorális immunreakció fokozódásával jár. Mindkettőnek markáns következményei lehetnek, ami például látványosan módosítja a szervezet helyi immunválaszát bizonyos fertőzéses és gyulladásos, illetve daganatos kórfolyamatok esetén. E lehetőséget valójában csak *in vivo* modellrendszerben lehet igazolni. Az előadó és munkacsoportja részt vett abban a nemzetközi munkában, amely elsőként hozott létre genetikailag módosított hisztaminmentes egeret. Ennek megvalósítása során a hisztamin termeléséért felelős hisztidin dekarboxiláz (HDC) gént tették működésképtelenné azáltal, hogy az enzimfunkcióban nélkülözhetetlen fehérjerészt kódoló három exont eltávolították. A HDC<sup>ko</sup> egér fertilis, és különleges jellegzetessége, hogy a kiütött HDC miatti endogén hisztaminhiány, külső forrásból (pl. táplálék) pótolható. Ez lehetővé teszi, hogy – az előadásban ismertetett – különféle fenotípusokat hisztamintartalmú táp elvonásával és hisztaminmentes diéta adásával létrehozzák. Az előadás bemutatta a HDC *knock-out* (HDC<sup>ko</sup>) egér meglepően színes fenotípusát. A HDC<sup>ko</sup> egerek fenotípusát mindig az ugyanolyan háttérű vad (normális HDC-vel rendelkező) egerekhez hasonlították.

A HDC<sup>ko</sup> egér génexpressziós mintázatában mutatózó eltéréseket microarray (génchip) technikával is analizálták, sok szervből cDNS könyvtárakat és immortalizált sejtvonalakat hoztak létre. Az előadás nagyszerűen igazolta, hogy a humán genom programhoz kapcsolódó kutatások a modern tudomány legizgalmasabb kérdéseit érintik. Az előadó e tudományág egyik legfontosabb alkalmazásának lehetséges útját illusztrálta: a géntérképből származó ismeretek gyógyszerkutatásban való felhasználásának lehetőségei és jelentősége új távlatokat nyitnak a gyógyszeripar számára.

A Hőgyes Délutánok előadásait minden esetben számos kérdés, hozzászólás, izgalmas vita követte, ami a gyógyszerkutatás e területeinek aktualitását jelzi. A fokozott érdeklődéstől bátorítva az előadássorozat 2001-ben is tovább folytatódik.

*Beke Gyula és Nagy Tamás*

Semmelweis Egyetem, Szerves Vegytani Intézet

## Fehérjéink tekergetői: a dajkafehérjék

### Csermely Péter: Stresszfehérjék

(Könyvismertetés)

Vince Kiadó, Budapest, 2001

Megszokhattuk mára, hogy a Vince Kiadó *Világ-Egyetem* és *Tudomány-Egyetem* sorozatai a tudományos kutatás különböző szakágainak magas szintű összefoglalását adják; előbbi a nemzetközi, utóbbi a hazai kutatás élenjáró képviselőinek tollából. A szakterületek között a biokémia különféle ágazatai is rendre ott szerepelnek: Venetianer Pál (ld. *Biokémia*, XXIII: 51–52, 1999) és Falus András (ld. *Biokémia*, XXIII: 111–112, 1999) kiváló munkái után a könyvsorozatban most Csermely Péter rukkolt elő a maga farbájával, a dajkafehérjékkal, méghozzá a sorozatbéli elődeitől megszokott nagyfokú igényességgel. (S egyben példás szerénységgel is: a dicsőség jó részét hangsúlyosan átengedve a könyv szaklektorának, Vigh Lászlónak. Mit is mond a vonatkozó *yuppie*-zsargon? Korrekt.)

A könyv átfogóan kitér a dajkafehérjék valamennyi releváns aspektusára: szerepükre, sejtbiokémiai, evolúciós és az öregedési folyamatokban megnyilvánuló vonatkozásaikra, tényleges és lehetséges orvosi alkalmazásaikra. Mindez érdem, de mondhatni, elvárható érdem. Ami viszont a könyv különleges erénye (legalábbis az én szememben), az az általános biokémiai „tálalás”: ahhoz, hogy szemléletesen bemutathassa, mit is csinálnak a stresszfehérjék a sejt molekuláris forgatagában, visszanyúl az alapvető (és néha nem is olyan alapvető) sejtbiokémiai folyamatokig, a fehérjék szerkezetének, fizikokémiai tulajdonságainak, feltekeredésének igényes, korszerű és könnyen vizualizálható leírását adva. A kép tág léptékét mutatja az is, hogy magukról a stresszfehérjékről – a bevezető kivételével – csak a 27. oldalon hallunk először, s még ezután is sokáig általános fehérjebiokémiáról esik szó, hogy aztán a 41. oldaltól ténylegesen a dajkafehérjék kerüljenek terítékre. A láttatás hasonló erőssége, hogy találó képeket villant fel a még akár a szakemberekben is megbúvó téves képzeletről az egyes sejtalkotókat (az RNS-t, a sejtmagot, a citoplazmát) illetően. Az ismertetésben a szerző nemcsak a legalapvetőbb fehérjebiokémiai folyamatokat, de az összetett sejtalkotó komponensek,



fehérjék (lizoszómák, proteaszómák, transzkripciósfaktorok, hisztonok, centroszómák stb.) működését is szemléletesen írja le és tekint át. Kiváló és jól láttató képen mutatja be a hidrogénhidkötések és a hidrofób kölcsönhatások jellegét, igen szép bemutatót ad a molekuláris zsúfoltsá-

ságban (*macromolecular crowding*) bekövetkező eseményekről, találóan foglalja össze a hidegsokk során bekövetkező eseménysort, leírása az apoptózis és a sejtnekrózis összehasonlításáról szintén igen szép és képletes, mint ahogy a prionok és a prionbetegségek problémakörét is igen szemléletesen láttatja.

S teszi ezt úgy, hogy közben korántsem vádolható azzal, hogy tájékozottsága okán nagyképű lenne: nagy ívben kerül az akadémikus komolyságot, miközben komolytalannak sem nevezhető – nyelvezte messzemenően olvasható és közérthető. Csermely láttatásában a molekuláris kép rendkívül mozgalmas és mulatságos: a fehérjemolekulák mocoognak, hidrofób közegben kiköpi a belüket, hősokk alkalmával szétcincálódnak, a vízmolekulák macerálják a fehérjét, az  $\alpha$ -hélixek beadják a derekukat és kénytelen-kelletlen kitekerednek, a kólibaktérium rotamáza (a trigger faktor) becserkészi a frissen polimerizált fehérjét, az enzimkaszádok tagjai beleköpi terméküket a következő reakciót katalizáló enzim aktív centrumába. Az olvasó lépten-nyomon, szinte minden második-harmadik oldalon efféle és hasonló „hangzatos mondatokba” botlik (szerepeljen itt csupán néhány ízelítő): „valamirevaló ATP-hasító enzim világgá bujdosna szégyenében, ha ilyen cammogó sebességű ATP-hidrolízissel rendelkezne” (61. o.), „az Anfinzen-masszázsszalonnak vannak törzsvendégei” (62. o.), „a sejt citoplazmáját nagyon sokan egyfajta sűrű húslevesnek képzelik el ..., amelyben

úgy kószálnak az egyedi fehérjék, mint a kóristalányok a karácsonyi forgatagban” (72. o.) (n.b. hogyan kószálnak a kóristalányok a karácsonyi forgatagban?!), „a stresszfehérjék ... olyanok a fehérjekinázok számára, mint versenylónak az indítóketrec: mindaddig, amíg jelen vannak, a kináz inaktív, de toporzékolva várja, hogy aktiválódhasson” (79. o.), „... a Clp-családban a stresszfehérjék képviselik az észet, és a ClpP az a szegény rokon, akinek csak a balta jutott” (86. o.), „felépítése alapján, megítélésem szerint, a proteaszóma borbélynak elég pancser lehet” (91. o.), „puff neki” (96. o.), „a fehérjék tehát kicsomagolás, szuszakolás és becsomagolás nélkül jutnak át a magpóruson” (97. o.), „ha a stresszfehérjék mennyisége túl kevés, ... a sejtes bakó szép lassan az akasztófa alá ballag” (100. o.).

S hogy tovább záporozzanak a könyv erényeit soroló dicséretet: Csermely kiválóan ismeri – és hivatkozza! – a kortárs magyar szakirodalmat, hivatkozásai dicséretesen frissek a nemzetközi szakirodalomból, s nemcsak frissek, de pontosak is: ugyan kerestem (ha nem is célzott buzgalommal), egyetlen félrehivatkozást sem találtam. A könyv, közérthetősége és a friss irodalmak miatt nemcsak az érdeklődő – átlagosan művelt – olvasó, de egyetemista hallgatók vagy akár a fehérjebiokémia nem minden zugában jártas szakember számára is hasznos.

Bár elő-előfordulnak néha talán kissé tekervényes megfogalmazások is, melyeknél némi agymunkát igényel kibogarászni, mi is az alapüzenet, a könyv szakmai nyelvezete rendkívül igényes, a nyelvi összeállítás és szerkesztés láthatóan gondos (elvéve egy-egy sajtóhiba vagy következtelenül használt szinonima). S hogy mindjárt ellenpéldát is említsek: időnként (számomra) túlságosan is törekszik a magyarításra, például a „detergens hatás” esetében, melyet „mosószerhatásnak” fordít (ami ugyan magyarul van, de nem jól adja vissza az eredeti jelentést), míg az aggregációt idegen szóval említi, holott van magyar megfelelője, az összecsapzódás. S még egy nyelvi megjegyzés: előszeretettel alkalmazza a „sejtes” jelzőt, melyet szerencsésebb lett volna előtagként használni (sejtes folyamat helyett sejtfolyamat, sejtes fehérje helyett sejtf fehérje).

Messzire nyúló fejtegetései közül különösen érdekes, hogy éppen a stresszfehérjék lehetnek azok az összetevők, melyek alapján kiderül, hogy az Archaeobaktériumok (Cs.P.-nél nagyon helyesen

ősbaktériumok – de akkor az eubaktériumok miért eubaktériumok, miért nem újbaktériumok?) nem is olyan archaikusak, mint hittük. Szintén elgondolkodtató, amit abban a vonatkozásban említ, miféle molekuláris mechanizmus is lehet a „sejt hőmérője”. Ennek kapcsán (és a szakirodalom alapján) háromféle mechanizmust vet fel, melyeknek egy része evidensnek látszik, más része kérdésesebb. Az, hogy a termikus folyamatokban károsodott fehérje maga is részt vesz a hősokkválasz beindításában, az általános biokémiai mechanizmusok ismeretében (és a könyv korábbi megállapításai alapján is) nyilvánvaló. Ugyanakkor az, hogy a sejt önnön hőmérsékletét mRNS-szinten érzékelje – legalábbis a könyvben nyújtott magyarázat alapján (108. o.) – kevésbé meggyőző. Az pedig, hogy a membrán lipidösszetétele lenne a sejtszintű hőmérő, szintén logikusan hangzik, s patrióta kutatóként csak remélni tudom. A magam részéről a „ködösítő” állaponttal szimpatizálok: sejthőmérő (egyetlen szenzor), mint olyan, minden bizonynyal nem létezik, mint ahogy – ha tetszik – hőmérséklet sincs, csak a részecskék kinetikai energiájának, mozgásának változása, csupán a megváltozott hőmérséklet (lám, mégis!) hatására bekövetkező megváltozott folyamatok.

Néhány további elgondolkodtató kérdés, megjegyzés: ha a stresszfehérje hidrofób összetevőinek egy részét a felszínén tartalmazza (Csermely szellemében: a belének egy részét kint hordja), hogyan menekülhet meg más stresszfehérjék jó szándékú javító hatásaitól? (Hasonló kérdést a szerző is feltesz a 44. oldalon.) Kémiai értelemben nem tartom szerencsésnek azt mondani, hogy az amidkötés egy karbonilcsoportból és egy szekunder amincsoportból áll (19. o.): papíron ez így néz ki ugyan, de kémiai értelemben ugyanolyan téves képzetet keltet az olvasóban, mint azok a téves képek (pl. a DNS és az RNS összevetéséről), amelyekről Csermely oly találóan rántja le a leplet. Fájlottam, hogy az oxidatív stressz kapcsán (65. old.) – főként az állatvilágra, s azon belül is csupán gerincesekre (pontosabban hemoglobinnal rendelkezőkre) összpontosít, pedig az oxidatív stresszről sokat tudni növényekben is. Más helyütt, a szteroidreceptorokról szólva a szerző ugyan magától értetődő általános következtetésként említi (74. o.), hogy a receptorfehérje nem lehet aktív addig, amíg szubsztrátja be nem kötődik, ez az olvasó számára (legalábbis számomra) nem világos: ezzel az erővel dajkafe-

hérje kellene minden enzim, minden antitest mellé is... (Félreértés ne essék, nem azt firtatom, hogy a szteroidreceptorok működésében stresszfehérjék játszanak közre (ezt a hivatkozott irodalom bemutatja), hanem azt, hogy mindez oly nyilvánvalóan szükséges lenne a receptorműködéshez.) De ezek a megjegyzések akár pusztán jó szándékú köztöködésnek is tekinthetők: fikarcnyit sem csökkentenek a könyv értékén. Csermely Péter könyve tudományos ismeretterjesztő munka a szó legnemesebb értelmében: magas szintű *tudományos ismereteket* terjeszt, még hozzá az olvasó számára érthető, sőt élvezhető módon. Ajánlom nemcsak az érdeklődő laikusok vagy a biokémia szakos egyetemi hallgatók kezébe, de azon gyakorló biokémikusokéba is, akik hajlandók szakterületükre Csermely igényes, mégis könnyed pillantásával tekinteni.

A Vince Kiadó új könyvéről szólva elkerülhetetlen és gyászos kötelesség szót ejteni egy szomorú tényről: 49 éves korában elhunyt Vince Gábor, a Vince (korábban Kulturtrade) Kiadó megalapítója, s azon belül az említett *Világ-Egyetem* és *Tudomány-Egyetem* sorozatok megindítója. Munkásságával bizonyította, lehet egyszerre küldetés és – a híresztelésekkel ellentétben – nyereséges üzlet is magas szintű népszerű tudományos könyveket kiadni (csak érteni kell hozzá), s ez nem csupán a külföldi, de a hazai tudósok, műhelyek munkájára is vonatkozik. Halála törés a kiadó tevékenységében, de abban remélhetőleg nem, hogy a tudományos sorozatok továbbéljenek, és újabb, a korábbiakhoz hasonló sikereket hozzanak.

Székács András

**Aba-Novák Vilmos** a két háború közötti korszak kiemelkedő művésze az 1937-es párizsi Világkiállítás magyar pavilonjába festette meg „A francia–magyar kapcsolatok” című nagyméretű táblaképeit, és nyerte el a Picasso vezette zsűri Grand Prix-jét. A két sorban kialakított, 2 m széles és 7 m magas táblákból 2x7-es elrendezésben kiállított pannók a két nép történelmi és kulturális kapcsolatait ábrázolják Aba-Nováktól megszokott dinamikával. Megjelenik a képeken Berlioz, amint éppen a Rákóczi-indulót komponálja, látható egy szobrász, aki Liszt Ferenc portréját faragja, a harangláb tövében Kapisztrán János vezeti a keresztény csapatokat. A francia tanítórendek képviselői, a kultúra és a közösen megélt történelem egy-egy epizódja látható még a képeken. A mű díjakkal övezett sikereit méltatlan utóélet követte, a magyar állam tulajdonában lévő műveket a székesfehérvári múzeumban tárolják, műtárgyhoz nem illő körülmények között, aminek hatására a képek megrongálódtak, gombás fertőzést kaptak. Sok tízmillió forintos restaurálás után 2001. augusztus 20-án Székesfehérvárott ismét láthatóvá válnak e nagyméretű és hányatott sorsú faliképek.



Aba-Novák Vilmos (1894–1941), *A francia–magyar kapcsolatok*

