

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. 4. SZÁM

2001. DECEMBER

A tartalomról:

- ◇ Ligandum- és aktívhely-függő P–O vagy C–O kötéshasadás szerves foszforvegyületekkel gátolt szerin hidroláz enzimekben – *Ildikó M. Kovách*
- ◇ A molekuláris biológia alkalmazása a mikrobiológiában – *Maráz Anna*
- ◇ Beszélgetés az emberi genomról – *Hollósi Miklós, Nyitrai László és Szilágyi László*
- ◇ Újabb Hőgyes délután a gyógyszerkutatásról – *Hideg Kálmán és Arányi Péter*
- ◇ Tudósítás a 2001/2002. évad első Bruckner-termi előadásáról – *Ligeti Melinda és Tugyi Regina*
- ◇ EUROCOMBI-1 – *Dibó Gábor*
- ◇ Ismeretek az egyedfejlődésről: a csírasejtektől a programozott sejthalálig (könyvismertetés, Hoffmann Gyula, Csoknya Mária: Fejlődésbiológia II.) – *Novák Gabriella*

Címlapkép:

A C α atomváz a Torpedo californica AChE enzim kristályszerkezetében (Brookhaven Data Bank 1EA5) (balra fent) és a dezalkileződési folyamatot elősegítő aminosavak elhelyezkedése (jobbra lent) (ld. a vonatkozó közleményt a 74–80. oldalakon).



Contents:

- ◇ Ligand- and active-site-dependence of P–O or C–O bond cleavage in organophosphorous adducts of serine hydrolases – *Ildikó M. Kovách*
- ◇ Application of molecular biology in microbiology – *Anna Maráz*
- ◇ Discussion on the human genome – *Miklós Hollósi, László Nyitrai and László Szilágyi*
- ◇ A newer Hőgyes afternoon on drug discovery – *Kálmán Hideg and Péter Arányi*
- ◇ Account of the first Bruckner-hall lecture of the 2001/2002 season – *Melinda Ligeti and Regina Tugyi*
- ◇ EUROCOMBI-1 – *Gábor Dibó*
- ◇ Current knowledge on ontogenesis: from germ-cells to apoptosis (book review) – *Gabriella Novák*



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

e-mail: biokemia@nki.hu www.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

PARTNERE AZ ÉLETTUDOMÁNYOKBAN

Út a jövőbe

MERCK

oncogene
RESEARCH PRODUCTS



Biochrom KG



STRATAGENE®

MWGAG
BIOTECH

www.merck.hu
megújult
tartalommal

Novagen®

CALBIOCHEM®

UNI EQUIP

novabiochem

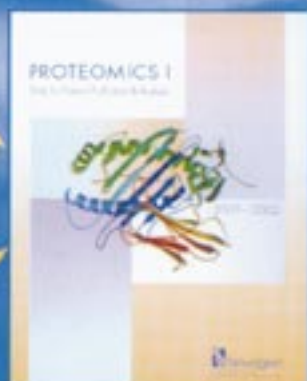


QIAGEN



BRAND

SYNGENE



Új PROTEOMICS katalógus!

Újdonságok

SYNGENE
DigiGenius:

Kedvező árú
géldokumentációs
rendszer
nagy felbontású
digitális
kamerával
és kiértékelő
programmal!



BIOCHROM

Szérumok, táptalajok, szövetbontó enzimek,
antibiotikumok sejt kultúrákhoz.

Keresse fel honlapunkat! - www.merck.hu

Merck Kft.

1116 Budapest, Talpas u. 3.

Tel.: 463-8100

Fax: 463-8101

E-mail: biokemia@merck.hu

Honlap: www.merck.hu

Ligandum- és aktívhely-függő P–O vagy C–O kötés- hasadás szerves foszforvegyületekkel gátolt szerin hidroláz enzimekben

Ligand- and active-site-dependence of P–O or C–O bond cleavage in organophosphorous adducts of serin hydrolases

Ildikó M. Kovách

Department of Chemistry, The Catholic University
of America, Washington, DC 20064.

Összefoglalás

Az, hogy a POR'P(O)X szerkezetű vegyületek mennyire hatékonyan gátolják a szerin hidroláz enzimeket, a molekula X-csoportjának elektronikus tulajdonságaitól és az RO-csoport méretétől függ. A foszforatomhoz kapcsolódó ligandumok elektronikus tulajdonsága döntő jellegű abban, vajon a C–O vagy a P–O kötés hasadása várható-e a keletkezett szerin hidroláz foszfonátdiészterekben. Kimotripszin vagy kolinészteráz aromás foszfonátdiészterekkel való kölcsönhatásában P–O kötéshasadással járó fenoxidion-távozás várható. Alkildiészterek esetében a kovalens foszfonilcsoport ligandumainak további sorsát meghatározó két fő tényező az aktív hely elektrosztatikus jellege és felépítése. Jelentős negatív elektrosztatikus és hidrofób erők a C–O kötés – esetenkénti metilcsoport-vándorlással járó – hasadásának kedveznek, míg ez a lehetőség a szerin proteázoknál nem áll fenn.

Ildikó M. Kovách

Department of Chemistry, The Catholic
University of America, Washington, DC 20064.

Summary

The stereoselectivity of phosphorylation of serine hydrolases by the POR'P(O)X group of compounds is governed by the electronic properties of X and the size of RO groups. The electronic properties of ligands attached to P are decisive in whether C–O or P–O bond cleavage occurs in phosphonate diesters of serine hydrolases. Phenoxide ions leave readily with P–O cleavage from chymotrypsin and the cholinesterases. The architecture and electrostatic character of the active site governs the fate of a covalently attached phosphonyl fragment. Strong negative electrostatic and hydrophobic forces in the cholinesterases preferentially promote C–O bond cleavage with occasional methyl migration whereas this route of dealkylation is nearly absent in phosphonate esters of serine proteases.

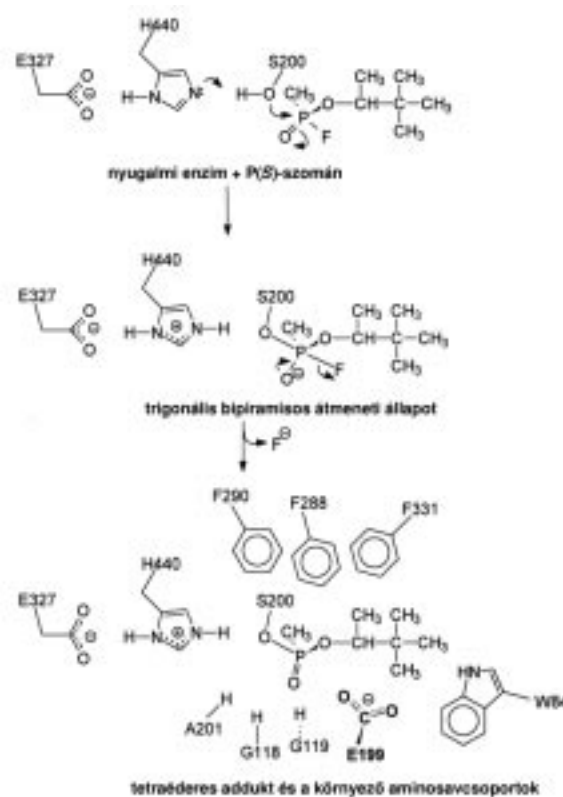
A szerves foszforvegyületek kolinészteráz enzimekre gyakorolt gátló hatása a tudományos érdeklődés régi tárgya, főként azért, mert ezek a nem természetes, mégis enzimkatalizált reakciók – más szerin hidroláz enzimek gátlásával ellentétben – nagyon gyorsan zajlanak le, s ez igen súlyos élet-tani és biológiai következményekkel jár. A gátlás folyamatát három fázisban célszerű tárgyalni: (1) foszfonilálás, (2) defoszfonilálás és (3) másodlagos reakciók, mint dezalkilezés vagy dezarilezés [1].

A szerves foszforvegyületek szerin hidrolázokra gyakorolt hatásának legekleatásabb példája a kolinészteráz enzimek irreverzibilis gátlása 2-(3,3-dimetil-butil)-metil-foszfonofluoridáttal, azaz szománnal. A folyamat fő jellegzetessége az, hogy a

pinakolilcsoport gyors lehasadása a lehetséges defoszfonileződést megelőzően következik be [1–19]. Úgy az enzim inaktiválása, mint a pinakolilcsoport ezt követő távozása, általános sav-bázis katalízissal történik [1–10,12,13,19]. Figyelemre méltó tény, hogy az acetilkolinészteráz (AChE) katalizálta dezalkilezés legalább tíz nagyságrenddel gyorsabb, mint a megfelelő nem katalizált reakció [8–9]. A kémiai átalakulások és a szervezetben való gyors felszívódás miatt a szomán az egyik legveszedelmesebb ismert idegmeleg. A fő indítékot arra, hogy a gátlás minden fázisát az atomi szerkezet szintjén értelmezzük, éppen a szomán katonai, harci gázként – akár katonai állomány, akár pedig a civil lakosság ellen – történő használata szolgáltatja.

A szerin hidroláz enzimek acilezése és foszfonilezése közötti hasonlóságok

Az aktív csoport szerinjének foszfonilezése gyors és hatékony, ha az inhibitorból távozó csoport savas jellegű. A keletkezett adduktum az enzim és a természetes szubsztrát közötti acilezési reakció átmeneti állapotának szerkezeti hasonmása. A töltésszétválás és a polarizálódás azonban erősebb a foszfonilezett adduktumban, mint az acilezés átmeneti állapotában, aminek következtében az aktív enzim csoportjai és a foszfonilcsoport között irreverzibilis gátlást eredményező kölcsönhatások lépnek fel. A kolinészterázok szománnal való gátlási folyamatában az első fázis mechanizmusát korábbi vizsgálatainkban feltártuk [20–25], s egy összefoglaló cikkünkben [1] azt a következtetést vontuk le, hogy az irreverzibilis gátlást az enzim és a természetes szubsztrát közti reakció átmeneti állapota, valamint a szerves foszforvegyülettel képzett adduktum közti szerkezeti-kémiai különbségek okozzák (1. ábra). A trigonális bipiramidális foszfonil átmeneti állapot és a katalitikus triád (az elektromos rájából (*Torpedo californica*, *T. c.*) származó AChE enzim S200, H440 és E327 aminosavjai) hisztidinje közötti kémiai kapcsolat akadályozza meg azt a protonátadási folyamatsort, ami a a szerin hidrolázok katalitikus szerincsoportjának acileződése és dezacileződése során a katalízis egyik fontos eleme [26]. Ennek következtében a proton a katalizáló hisztidincsoporton marad, míg a jó távozó csoport leválik (különben a reakció elhanyagolható mértékű), s így a sav-bázis katalitikus apparátus megbénul: a folyamat tehát mechanizmusalapú gátlásnak tekinthető.



1. ábra Az acetilkolinészteráz (AChE) enzim irreverzibilis gátlása P(S)-szománnal. Kölcsönhatások a *Torpedo californica* AChE katalitikus triádjának közelében

A mechanizmus pontosan megjósolja az általános báziskatalízis hiányát a foszfonilezett enzim hidrolízisében, ami teljes összhangban áll a tapasztalati ténnyel, hogy defoszfonileződés nem lép fel. Az emberi butirilkolinészteráz (BChE) G117(119)H mutánsával végzett kísérletek bizonyították, hogy az enzimben egy célszerűen elhelyezett hisztidin-



Ildikó M. Kovách gyógyszerészi diplomáját 1964-ben szerezte a Budapesti Szeemmelweis Orvostudományi Egyetemen, ahol mentora Szabó László professzor volt. A Kansasi Egyetem (*University of Kansas*) gyógyszerkémiai karán doktorált (PhD) 1974-ben Prof. Takeru Higuchi intézetében, majd az egyetem vegyi karán Prof. Richard L. Schowen mellett folytatott posztdoktori tanulmányokat az izotóphatások és számos enzimatis mechanizmus vizsgálati módszereinek alkalmazása terén. Ezt követően az egyetem Orvosbiológiai Kutatóközpontjának (*Center for Biomedical Research*) szenior kutatójává nevezték ki, majd szerves kémiát tanított a Baker Egyetemen (*Baker University, Kansas*). 1989-től a

Catholic University of America vegyi karán tanít (*Associate Professor*), 1995 óta egyetemi tanár (*Ordinary Professor*). Kutatási érdeklődése az enzimkatalizálta acil-, foszforil- és aminocsoportok átadási folyamataira, valamint a vonatkozó szerves kémiai reakciókra irányul. Vizsgálati módszerei közé tartoznak klasszikus fiziko- és szerves kémiai enzimológiai és kémia számítási technikák, s kutatási programjai az utóbbi időben a szerin hidrolázok szerves foszfonát típusú, reverzibilis gátlószereinek gyógyászati alkalmazását is célozzák. Prof. Kovách a Londonban székelő *Biochemical Journal* társszerkesztője, több tudományos kitüntetés részese (*NSF, NIH, American Heart Association, DOD*), két szabadalom és mintegy hetven tudományos cikk szerzője vagy társszerzője.

csoport visszaállítja az enzim általános bázikus katalizáló jellegét, és így bizonyos adduktumokban gyorsítja a defoszfonileződést [27]. Korábbi közleményünkben [1] szintén megjósoltuk, hogy a mechanizmus bekövetkeztéhez a katalitikus triádban egy karboxilcsoport, valamint a kötődés helyén egy W-csoport szükséges, s ezek az elemek az enzim kristályszerkezetében valóban jelen is vannak [28]. Amint a *T. c.* AChE kristályszerkezet ismeretessé vált (2. ábra, balra fent), kémiai számításokat végeztünk abból a célból, hogy azonosítsuk az aktív csoport azon komponenseit, amelyek a gátlás folyamatának különböző fázisait segítik elő.

2. ábra (lásd a címlapon) *A C α atomváz a Torpedo californica AChE enzim kristályszerkezetében (Brookhaven Data Bank 1EA5) (balra fent) és a dezalkileződési folyamatot elősegítő aminosavak elhelyezkedése (jobbra lent)*

Enantioszelektivitás a szerin hidrolázok foszfonileződése során

A kolinészterázok foszfonileződése a ROR'P(O)X szerkezetű vegyületek P(S) enantiomerére nézve szelektív folyamat. Az enantioszelektivitás akkor a legnagyobb, ha X=F (az F, Cl, és 4-nitro-fenil szubsztituensek közül). Az R-csoport hatása is akkor a legerősebb, ha X=F, az R-csoport pedig a kolincsoporthoz hasonló: ennek legjobb példája a szomán. Az R-csoport méretének növekedtével a kötődés módja és az enantioszelektivitás változhat [29]. Összehasonlításképpen: a kimotripszin e vegyületek közül szintén a P(S) enantioimereke nézve aktívabb, de enantioszelektivitása sokkal kisebb, mint a kolinészterázoké. Ezzel szemben a tripszin és a szubtilizin gyorsabban reagálnak a P(R) enantioimerekkel, különösen ha az R-csoport nagyobb méretű. Az enzim aktív helyének elektrosztatikus jellege és felépítése természetesen döntő tényezők az enantioszelektivitás mértékében.

Kolinészteráz enzimek inaktíválása szomán diasztereomerekkel

A királis P és C α jelenlétének következménye, hogy racém szomán négy diasztereomer keveréke. Míg a kolinészterázok sztereoselektivitása a P(S) konfigurációra nézve 10⁴ [13], a P(S)C(R)-szomán csak kissé hatékonyabb, mint a P(S)C(S)-diasztereomer. Például marha erythrocytából származó AChE hat-

szoros különbséget mutat a két P(S)-diasztereomer közötti gátlási sebességi állandók tekintetében, míg az elektromos angolna AChE esetében ez a különbség csupán 1,6-szoros [13,30]. A sztereoselektivitás natív egér AChE [16] és emberi BChE esetében jelentéktelen mértékű, de némely mutáns esetén nagyobb értéket mutat. Emberi BChE esetében az E197(199) D és Q helyettesítés a P(S)C(S)-szománal történő foszfonileződés sebességében 4,5-szörös, illetve 11,8-szoros csökkenést okoz, míg a P(S)C(R)-szománal történő folyamatban a csökkenés 6,5-szörös, illetve 47-szeres [19]. Ezen eredmények jelentőségét az adja, hogy a E197 karboxilcsoport negatív töltésének hiánya csökkenti a mutáns BChE affinitását, de növeli a sztereoselektivitást a P(S)-szomán diasztereomerek közt. Ugyanez a mutáció az egér AChE esetében kisebb hatással jár [16]. A W82(84)A BChE mutáns esetében a foszfonileződés lényegesen lelassul (0,15–0,38 százalékra), ami az indolgyűrű kulcsszerepét bizonyítja a szomán pinakolilcsoportjának kötésénél.

A kovalensen kötött foszfonilcsoport sorsa szerin hidroláz enzimekben [31]

A C–O vagy P–O kötéshasadással bekövetkező másodlagos reakciók átmeneti állapotának tulajdonságait a reakciók pH-függésének, az izotóphatásoknak [8,9,19,33] és egyes termodinamikai paramétereknek [8] a kimérésével, valamint kémiai számításokkal [2–7] jellemeztük. Azonosítottuk az enzim katalitikus csoportjait, melyek kolinészterázokban C–O kötéshasadást idéznek elő [8,9,19,32,33]. Azok a molekuláris elemek, amelyek kovalens 4-nitro-fenil-, metil- és propil-foszfonilezett kimotripszin adduktumokban P–O kötéshasadást okoznak, szintén alapos mechanizmusvizsgálatok tárgyai voltak [32], ezekre azonban jelen közleményünk nem terjed ki.

Az első szerkezeti modellünk a szomán gátolta kolinészterázokban a dezalkileződést az ún. „push-pull” mechanizmussal magyarázta, a H440H⁺, E199 és W84 aktív csoportok résztvételével [2,3] (2. ábra). A H440 kationként megtartja a protont, amit a tripszin monoizopropil-foszfát-anionnal végzett neutroindiffrakciós mérések [34] és NMR vizsgálatok [35] is alátámasztanak. A molekuláris modell szerint a pinakolilcsoport egyik metilcsoportja kölcsönhatásban áll a W84 indolgyűrűjével, míg a C α az E199 karboxiljához esik közel. Az átmeneti

állapot analóg, *m*-(*N,N,N*-trimetil-amino)-trifluoracetofenon és a *T. c.* AChE adduktumának később feltárt kristályszerkezetében nagyon hasonló kölcsönhatási mód volt észlelhető az inhibitor metilcsoportjai, valamint a W84 és az E199 között [36].

A dezalkileződések pH-függése szomán gátolt kolinészterázokban

A reakció leírásában elsőként a pH-függést írtuk le [8,9,19,31,33]: elektromos angolnából, marha főtusz szérumból származó, valamint rekombináns egér (rMo) AChE és rekombináns emberi (rHu) BChE és mutánsaik esetében a P(S)-szomán diasztereomerekkel gátolt komplexben a dezalkileződés sebességi állandója a pH függvényében haranggörbét ír le, ami a „push-pull” mechanizmust támasztja alá. Natív egér AChE adduktumok esetén a dezalkileződés sebessége a pH 3,5 és 5,0 közötti növekedtével hirtelen emelkedik (3A ábra). A haranggörbe alapján a számított p*K*-értékek, p*K*₁ = p*K*₂ = 4,0-4,9 és p*K*₃ = 5,2-6,6. A kolinészteráz enzimekre vonatkozó sebességi állandók felső határértékeit és az oldószeres izotóphatásokat az I. táblázat ismerteti. A p*K*-értékek két karboxilcsoportnak, az E199/202 és/vagy az E327/334, valamint az E443/450 és a H440/447H⁺ csoportoknak a dezalkileződésben való részvételét tanúsítják. A szomán diasztereomerekkel gátolt E202(199)Q egér AChE mutáns dezalkileződése esetén a p*K*₃ = 5,5-5,8. A szomán gátolt natív és E197(199)D emberi BChE dezalkileződésére vonatkozó szimmetrikus pH-profilból számított adatok (3B ábra): p*K*₂ = 3,7-4,6 és p*K*₃ = 7,3-8,0, míg az E197(199)Q mutáns esetében a p*K*₃ csak 5,0 körüli értéket mutatott. Az adatok arra vallanak hogy a dezalkileződés a szomán gátolt BChE adduktumokban egy karboxilcsoport és a H438(440)H⁺ részvételével történik. A sebességi állandók maximuma 25 °C-on AChE esetében 1–6 1/min, BChE esetében pedig 2 1/min.

Szomán gátolt AChE és BChE mutánsok csökkent mértékű dezalkileződése a pH függvényében

A dezalkileződés maximális sebességi állandója a P(S)C(S)-szomán gátolt és a P(S)C(R)-szomán gátolt egér E202(199)Q AChE mutánsban rendre 18-ad részére, illetve 47-ed részére történő csökkenést mutat a natív értékekhez viszonyítva (pH=5). Ugyanakkor 5 és 9 pH-értékek között a diasztereomerekben a csökkenés egyenlő mértékű (a kont-

roll 15-öd részére). Hasonló tendencia észlelhető a racém szomán gátolt emberi AChE esetén is: pH=6 értéken a mutánsokban a dezalkileződés 260-ad részre, míg pH=8-nál 137-ed részre lassul [15]. A megfelelő összevetés a *T. c.* AChE esetében ellentétes irányú változást jelez: a dezalkileződés sebessége pH=6 esetében 17-ed részre, míg pH=8-nál 600-ad részre csökken [14].

A II. táblázat összehasonlítási adatokat szolgáltat a dezalkileződési sebességi állandó maximumának csökkenésére a rekombináns emberi BChE és mutánsait illetően pH=5, 6 és 8 értékeken (3B ábra). A mutáció hatása meglepően pH-függő. A BChE E197(199)D mutáció hatása csökken pH 5 és 8 közt, amint ez a rekombináns egér és emberi AChE-nél tapasztalható. Ugyanakkor, a BChE E197(199)Q mutációnak a dezalkileződés sebességét csökkentő hatása pH 5 és 8 közt erősödik, amint az a *T. c.* AChE-nél is tapasztalható, de ellentétes a többi kolinészteráznál észlelt eredménnyel.

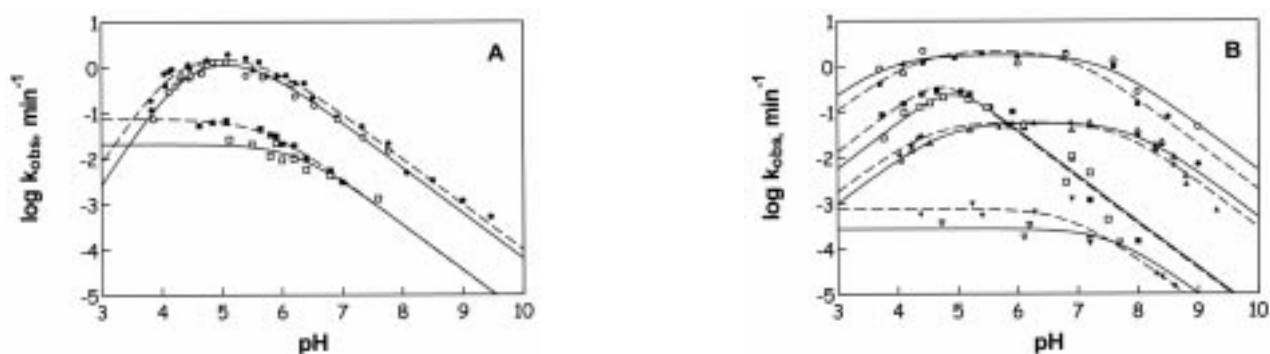
A dezalkileződés sebessége a szomán gátolt W82(84)A emberi BChE mutánsban pH=6-nál 2500-ad részére csökken ha az izomer a P(S)C(S), és 6000-ed részére csökken, ha az izomer a P(S)C(R), míg a pH-profil alakja változatlan, mivel a mutáció nem ionizáló aminosavval történt. Hasonló nagyságrendű csökkenést közöltek az emberi AChE W86(84)A mutációra is [17].

Oldószeres izotóphatás

A sav-bázis katalízis klasszikus próbaköve az oldószeres izotóphatás mértéke. A dezalkileződés sebességi állandójának maximumán a deutérium oldószeres izotóphatása 1,3-1,4, ami mind a preprotonálódást, mind pedig a protonátadást valószínűtlené teszi a reakció átmeneti állapotaiban.

A szomán gátolt kolinészterázok kis molekulatömegű reakciótermékei [37]

Az elektromos angolnából származó AChE esetében a P(S)C(S)-szomán gátolt enzimben a dezalkileződés reakciótermékeit gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel (szelektív ionmonitorozási mód mellett) tanulmányoztuk. A műszert analitikai minőségű 2,3-dimetil-1-butin és 2,3-dimetil-2-butin sztenderddel kalibráltuk a gáz fázisban, míg a reakció vizes oldatának analíziséhez a műszer kalibrálására 2,3-dimetil-2-butanol és 3,3-dimetil-2-butanol vizes oldatának diklórometános



3. ábra A dezalkileződés pH-profilja. (A) rMo AChE-P(S)C(R) szomán (○) és P(S)C(S) szomán (●); Mo AChE E202Q mutáns-P(S)C(R) szomán (□) és P(S)C(S) szomán (■). (B) rHu BChE-P(S)C(R) szomán (○) és P(S)C(S) szomán (●); Hu BChE E197Q mutáns-P(S)C(R) szomán (□) és P(S)C(S) szomán (■); Hu BChE E197D mutáns-P(S)C(R) szomán (△) és P(S)C(S) szomán (▲); Hu BChE W86A mutáns-P(S)C(R) szomán (▽) és P(S)C(S) szomán (▼).

I. táblázat A dezalkileződési reakció maximális sebességi állandói (k_{max}) és pK -értékei szomán diaszteromerekkel gátolt kolinészterázokban^a

Adduktum, szomán konfiguráció	k_{max} [1/min]	pK_1 (és pK_2)	pK_3	$k(H_2O)/k(D_2O)$
Mo AChE, P(S)C(S)	2,4±0,5	4,5±0,1	5,2±0,2	1,3±0,1
Mo AChE, P(S)C(R)	1,0±0,1	4,1±0,1	5,8±0,1	
Mo AChE, E202Q P(S)C(S)	0,071±0,008	—	5,8±0,2	1,4±0,2
Mo AChE, E202Q P(S)C(R)	0,021±0,003	—	6,2±0,2	
Hu BChE, P(S)C(S) ^b	2,0±0,2	4,2±0,1	7,5±0,1	1,3
Hu BChE, P(S)C(R) ^b	1,8±0,4	3,7±0,4	7,8±0,4	
Hu BChE E197D, P(S)C(S)	0,056±0,003	4,4±0,1	8,0±0,1	
Hu BChE E197D, P(S)C(R)	0,056±0,003	4,7±0,0	8,1±0,1	
Hu BChE E197Q, P(S)C(S)	0,31±0,03	4,6±0,1	5,0±0,1	
Hu BChE E197Q, P(S)C(R)	0,22±0,03	4,9±0,2	4,9±0,2	
Hu BChE W82A, P(S)C(S)	0,0008±0,0002	—	7,5±0,6	
Hu BChE W82A, P(S)C(R)	0,0003±0,0001	—	7,3±0,4	
Ee AChE, P(S)C(S) ^b	6,3±0,6	4,3±0,1	6,0±0,1	
Ee AChE, P(S)C(R) ^b	5,1±0,4	4,3±0,1	6,6±0,2	
FBS AChE, P(S)C(S) ^b	3,1±0,4	4,8±0,1	5,0±0,1	
FBS AChE, P(S)C(R) ^b	3,1±0,4	4,8±0,1	5,3±0,1	

^a A számított értékek $\mu = 0,1$ M (NaCl) és 25,0±0,1 °C-ra vonatkoznak. Az AChE esetében három pK modellt ($pK_1=pK_2$), a BChE esetében két pK modellt alkalmaztunk. Rövidítések: Mo: egér, Hu: human; Ee: elektromos angolna, FBS: marha főtusz szérum.

^b 4,0±0,1 °C-on mért adatokból és entalpiából számított értékek [8,9].

II. táblázat A dezalkileződési reakció sebességcsökkenése, k_0/k , szomán gátolta rekombináns emberi BChE enzimekben és mutánsaiban.

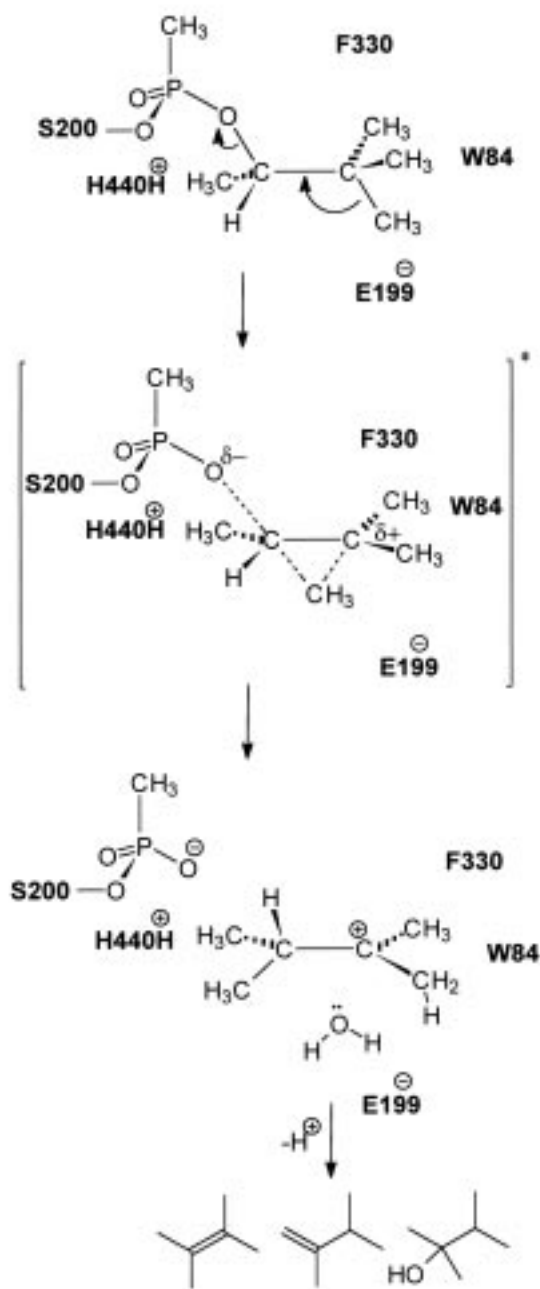
Szomán diasztereomer	pH	k_0 [1/min]			
		natív	E197D	E197Q	W82A
P(S)C(S)	5/6	2±0,2	36±5	6±0,5	2500±700
P(S)C(S)	8	0,18±0,02	8±2	450±100	3200±600
P(S)C(R)	5/6	1,8±0,2	32±5	8±0,7	6000±1000
P(S)C(R)	8	0,4±0,05	14±2	900±100	6000±1000

kivonatát alkalmaztuk. Az elektromos angolnából származó, P(S)C(S)-szomán gátolta AChE esetében a dezalkileződés pH=5,0-nél és 25 °C-on, ~40% alként és 50–60% 2,3-dimetil-2-butanolt eredményez. Nyoma sincs a 3,3-dimetil-2-butanol terméknek, ami közvetlen bizonyítékul szolgálhatna a szekunder karbéniumion keletkezésére a reakció során. Az új eredményt Michel és *mtsai* korábbi eredményei [10] teljes mértékben alátámasztják.

A dezalkileződés ellentmondásmentes mechanizmusa szomán gátolta kolinészterázokban

A kiterjedt pH-profil, az oldószeres izotóphatás és a termékek azonosítása a szomán gátolta kolinészterázokban egyértelműen a dezalkileződés „push-pull” mechanizmusát bizonyítják [8,9,19,31,33,37] (2. ábra, jobbra lent és 4. ábra). A mechanizmus lényege, hogy a C β -tól a C α -hoz történő metilvándorlást, az alapállapotban lévő anion kötőhelyéről, az E199 és a W84 által kifejtett elektrosztatikus és szterikus hatások okozzák.

A C–O kötéshasadás közel egyidejű a metilcsoport vándorlásával, és így az átmeneti állapotban



4. ábra A dezalkileződés „push-pull” mechanizmusa szomán gátolta kolinészterázokban

nem következik be az éles töltéspolarizálás, így az enzimatis katalízisre jellemző gyenge kölcsönhatások érvényesülnek. A H440H⁺ és az elektropozitív oxianion-üreg biztosítja a C–O kötéshasadáshoz, majd a foszfonátmonoészter anionon kialakuló negatív töltés létrejöttéhez szükséges „húzó” hatást. Az enzim „stratégiája” a dezalkileződés átmeneti állapotának stabilizálására

mintegy 14 kcal/mol energiacsökkenéssel jár [8] (a megfelelő nem enzimkatalizált reakcióhoz viszonyítva), és elkerüli egy intermedier képződését. A karbéniumion pozitív töltésének központja a C β a molekula alkilsorozatján van, ami viszont a W84 indolgyűrű nitrogénatomjától és az E199 karboxilcsoportjától ~4 Å, a C α atomtól pedig ~6 Å távolságra helyezkedik el [7]. Így az aromás π elektronok stabilizáló hatása erősebb a C β atomon, mint a C α atomon. Az első intermedier a harmadlagos karbéniumion, amely aztán gyorsan semleges termékeké alakul. Az E199 karboxilcsoport katalitikus szerepe kettős: a harmadlagos karbéniumion pozitív töltését stabilizálja az átmeneti állapotban és általános báziskatalizátor az intermedier végső terméké történő átalakulásában. A másodlagos karbéniumionból származó termékek teljes hiánya és az oldószeres izotóphatás eredményei ellentmondanak a korábbi és gyakran idézett oxóniumion mechanizmusnak [10,15,17]. A gyors preprotonálás (amit a sebességmeghatározó másodlagos karbéniumion-képződés követ) < 1 oldószeres izotóphatással járna, ellentétben az észlelt 1,3-1,4 értékkel. A reakciónak az oldat pH-jától való függése és az ebből számított pK a foszfonátdiészter adduktumban összhangban áll a katalitikus H440 szerepével a dezalkileződés mechanizmusában. A dezalkileződött, szomán gátolta emberi BChE enzimvel végzett differenciálkolorimetriai mérések [38], valamint a szerin proteázok korábbi szerkezettanulmányai szintén bizonyítják a Ser metilfoszfonát-anion-hisztidínium ionpár keletkezését 8-9-es pH-értékek alatt. Bár e közlemény nem tért ki a szerin proteázok másodlagos reakcióinak tárgyalására, meg kell jegyezni, hogy ezek lényegesen eltérnek az itt ismertetettektől [32].

Köszönetnyilvánítás

A kutatás anyagi fedezetét DAAH04-96-C-0086 és NSF MCB9205927 nyújtotta. Külön elismerést érdemel Dr. Virágh Károly munkája. Ezúton is hálás köszönetemet fejezem ki a [2–9], [19–25] és [37] hivatkozásokban megnevezett munkatársaimnak.

Irodalomjegyzék

- [1] Kovach, I.M. (1988) *J. Enzyme Inhib.*, 2: 199–208.
- [2] Qian, N.F. and Kovach, I.M. (1993) *Medical Defence Bioscience Review*, 3: 1005–1014.
- [3] Qian, N. and Kovach, I.M. (1993) *FEBS Lett.*, 336: 263–266.
- [4] Bencsura, A., Enyedy, I., Kovach, I.M. (1995) *Biochemistry*, 34: 8989–8999.
- [5] Bencsura, A., Enyedy, I., Kovach, I.M. (1996) *J. Am.Chem. Soc.*, 118: 8531–8541.

- [6] Enyedy, I. J., Bencsura, A., Kovach, I.M. (1996) *Phosphorus, Sulfur Silicon*, **109-110**: 249–252.
- [7] Enyedy, I.J., Kovach, I. M. and Bencsura, A. (2001) *Biochem. J.*, **353**: 645–653.
- [8] Viragh, C., Akhmetshin, R., Kovach, I.M., Broomfield, C. (1997) *Biochemistry*, **36**: 8243–8252.
- [9] Kovach, I.M., Akhmetshin, R., Enyedy, I.J., Viragh, C. (1997) *Biochem J.*, **324**: 995–996.
- [10] Michel, H.O., Hackley, B.E., Berkowitz, L., List, G., Gillian, W., Pankau, M. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**: 29–34.
- [11] Keijer, J.H. and Wolring, G.Z. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **185**: 465–468.
- [12] Schoene, K., Steinhanses, J., Wertman, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **616**: 384–388.
- [13] Benschop, H.P., Konings, C.A., VanGenderen, J., DeJong, L.P. (1984) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**: 61–74.
- [14] Saxena, A., Doctor, B.P., Maxwell, D.M., Lenz, D.E., Radic, Z., Taylor, P. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**: 343–349.
- [15] Ordentlich, A., Kronman, C., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., Marcus, D., Velan, B., Shafferman, A. (1993) *FEBS Lett.*, **334**: 215–220.
- [16] Saxena, A., Maxwell, D.M., Quinn, D.M., Radic, Z., Taylor, P., Doctor, B.P. (1997) *Biochem. Pharmacol.*, **54**: 269–274.
- [17] Barak, D., Ordentlich, A., Segall, Y., Velan, B., Benschop, H.P., DeJong, L.P., Shafferman, A. (1997) *J. Am.Chem.Soc.*, **119**: 3157–3158.
- [18] Masson, P., Fortier, P.L., Albaret, C., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1997) *Biochem. J.*, **327**: 601–607.
- [19] Saxena, A., Viragh, C., Frazier, D.S., Kovach, I.M., Maxwell, D.M., Lockridge, O., Doctor, B.P. (1998) *Biochemistry*, **37**: 15086–15096.
- [20] Kovach, I.M. and Huhta, D. (1991) *THEOCHEM*, **79**: 335–342.
- [21] Kovach, I.M. (1991) *J. Enzyme Inhib.*, **4**: 201–212
- [22] Kovach, I.M., Huber-Ashley, H., Schowen, R.L. (1988) *J. Am. Chem.Soc.*, **110**: 590–593.
- [23] Bennet, A., Kovach, I.M., Schowen, R.L. (1988) *J. Am.Chem.Soc.*, **110**: 7892–7893.
- [24] Bennet, A.J., Kovach, I.M., Bibbs, J.A. (1989) *J. Am.Chem.Soc.*, **111**: 6424–6427.
- [25] Kovach, I.M. and Bennet, A.J. (1990) *Phosphorus, Sulfur Silicon*, **51/52**: 51–56.
- [26] Alvarez, F.J. and Schowen, R.L., (1987). Mechanistic Deductions from Solvent Isotope Effects. In: *Isotopes in Organic Chemistry*. (Buncel, E. and Lee, C. C., Ed.), (Elsevier, Amsterdam) pp. 1–60.
- [27] Lockridge, O., Blong, R.M., Masson, P., Froment, M.T., Millard, C.B., Broomfield, C.A. (1997) *Biochemistry*, **36**: 786–795.
- [28] Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991) *Science*, **253**: 872–879.
- [29] Taylor, P. and Radic, Z. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.*, **34**: 281–320.
- [30] De Jong, L.P. and Wolring, G.Z. (1984) *Biochem. Pharmacol.*, **33**: 1119–1125.
- [31] Kovach, I.M. (1999) *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, **144-146**: 537–540.
- [32] Kovach, I.M. and Enyedy, E.J. (1998) *J. Am.Chem.Soc.*, **120**: 258–263.
- [33] Kovach, I.M., (1998). In: *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*. (Doctor, B. P., Taylor, P., Quinn, D. M., Rotundo, R. L., and Gentry, M. K., Ed.), (Plenum Press, New York and London) pp. 339–344.
- [34] Kossiakoff, A.A. and Spencer, S.A. (1981) *Biochemistry*, **20**: 6462–6474.
- [35] Cassidy, C.S., Lin, J., Frey, P.A. (1997) *Biochemistry*, **36**: 4576–4584.
- [36] Harel, M., Quinn, D.M., Nair, H.K., Silman, I., Sussman, J.L. (1996) *J. Am.Chem.Soc.*, **118**: 2340–2346.
- [37] Viragh, C., Kovach, I.M., Pannell, L. (1999) *Biochemistry*, **38**: 9557–9561 and unpublished results.
- [38] Masson, P. (1999) *Biochem.J.*, **343**: 361–369.



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 agoltudással 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.

*Minden megvalósítható...
...a megfelelő eszközzel*

 **PIERCE**

ENDOGEN



HyClone[®]

Kérje katalógusainkat!

 **NEW ENGLAND
BioLabs**[®]
GmbH

 **Cell Signaling
TECHNOLOGY**[™]

[a new company from New England Biolabs]

 **Finnzymes Oy**

MβP[®]
MOLECULAR BIO-PRODUCTS, inc.

 **DYNAL**[®]

 **EPICENTRE**[®]
...when you need to be sure of the quality

KÉPVISELET:

kvalitex

Tudományos, Technológiai, Kereskedelmi Kft.

Kvalitex Kft. 1136 Budapest, Pannónia u. 7. Tel.: 340-4700, Fax: 339-8274, email: kvalitex@matav.hu

A molekuláris biológia alkalmazása a mikrobiológiában

Beszámoló a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszékének a Szent István Egyetemi Napok keretében 2001. szeptember 4. és 7. között tartott szemináriumáról



A molekuláris biológia módszertana és kutatási eredményei alapvetően megváltoztatták a mikroorganizmusok világáról korábban kialakult képünket, és soha nem látott mértékben felgyorsították a mikrobiológia valameny-

nyi területének fejlődését. Ez sarkallta a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Karának munkatársait arra, hogy egy négynapos szeminárium keretében átfogják a baktériumok és gombák genomikájának molekuláris vonatkozásait, megismertessék a résztvevőket a molekuláris biológiai módszerek széles tárházával. A szervező tanszék hosszú évek óta fejleszti eszközparkját és tudását, hogy e módszereket bevehesse a genomkutatásban, molekuláris diagnosztikában és génklónozásban, s a metodika alkalmazást nyerjen a kutatásban és nem utolsósorban az oktatásban is.

A molekuláris biológia eredményeit meg lehet tanulni könyvekből, cikkekből – a módszereket azonban nem. Valószínűleg ez is hozzájárult a komoly érdeklődéshez s ahhoz, hogy a nyár derekán szervezett szeminárium tervezett létszámkerete hamar betelt, de a túljelentkezőknek is sikerült helyet szorítani. Így mintegy 24 fős „hallgatósággal” indult a szeminárium, akik között a valóban egyetemi hallgatói korosztálytól kezdve a pályán több évtizede dolgozó mikrobiológusig minden korosztály képviselve volt. Volt, aki a mikrobiológiai diagnosztikai tudását szerette volna kiszélesíteni, hajtotta a tudásvágy, az új tudományos eredmények megismerése iránti igény. A résztvevők megoszlása: 6 fő a gyógyszeripar vagy gyógyszerkutatás területéről, 4 fő a humán- és állategészségügyből, 7 fő a mezőgazdaság, 1 fő a környezettudomány, 6 fő az élelmiszer-kutatás és technológiafejlesztés területéről vett részt; a résztvevők közül kilencen PhD-hallgatók voltak. A tanfolyam előadásokból és gyakorlatokból állt, amelynek programját a túloldali táblázatban mutatjuk be (I. táblázat). A gyakorlatok nagy részében a résztvevők maguk is manuálisan dolgoztak, míg a foglalkozások kisebb része gyakorlati demonstráció volt. A program előadói közé sikerült az ország számos jó nevű egyetem és kutatóintézet nagy rutinnal rendelkező oktatóját és ku-

tatóját megnyerni, akik nem szűkölködtek tudásuk átadásában. A résztvevők beleláthattak annak molekuláris mélységeibe, hogy az egyre félelmetesebbé váló *Escherichia coli* törzsek virulenciájának hátterében milyen plazmidok állnak, a nemzetközi genomkutatási projektekből milyen új eredmények születtek, és merrefelé tartanak ezek a kutatási trendek. Kiderült, hogy a mitokondriális genom még a gombákon belül is erősen heterogén (szakszóval élve polimorfikus), és hogy mennyire beépültek a vírus eredetű szekvenciák a gombák genomjába. A molekuláris taxonómiai, filogenetikai kutatási eredmények sok esetben „átrendezték” a mikrobák evolúciójáról és biodiverzitásáról kialakult képünket, amely azonban még korántsem nevezhető letisztultnak. Minél több molekuláris módszert vetnek be, minél több közös gént analizálnak, annál inkább kitűnik, hogy a hasonló fenotípusú csoportok filogenetikai szempontból ugyancsak heterogének. Kiemelt hangsúlyt kaptak a génklónozással egyre hatékonyabbá váló expressziós rendszerek, amelyek lehetővé teszik a mikrobák biotechnológiai alkalmazásának rohamos fejlődését.

A szervezők odaadó munkáján túl nem felejtkezhetünk el mindazon cégek, szervezetek szerepéről sem, akik támogatást nyújtottak a szeminárium megrendezéséhez: a Bio-Rad, a Becton Dickinson, a Bioscience és a Kvalitex cégekről, valamint a Szent István Egyetem támogatásáról sem. Kiemelkedő segítséget nyújtott a Bio-Rad Kft., akik nemcsak anyagilag járultak hozzá a szeminárium megszervezéséhez, de a vonatkozó kvantitatív PCR technikájukat (lásd 84–85. old.) is rendelkezésre bocsájtották, illetve előadásban ismertették.

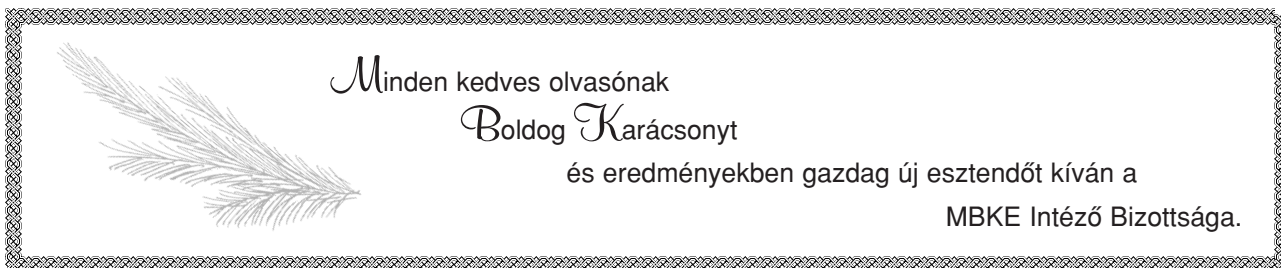
Pénteken késő délután, a program végére érve a résztvevők megkapták az okleveleket, a PhD-hallgatók ezenkívül még a két kreditet is, s egyvalamiben biztosan egyetértettek a résztvevők: a molekuláris biológia nemcsak szép, de nehéz is, és alkalmazása, szemléletformáló hatása kikerülhetetlen a mikrobiológiában. Valószínűleg ez hozta elő egyik kollégánkból azt a záróviccet, amely stílszerűen álljon itt e beszámoló zárszavaként is: Mi van a pap fejfájára írva? A válasz: Befejezte tanulmányait.

Mi még nem. Folyt. köv. (!?) Az igény: még több metodikát, még több gyakorlatot!

Maráz Anna

I. táblázat „A molekuláris biológia alkalmazása a mikrobiológiában” szeminárium programja

CÍM	TÍPUS	ELŐADÓ
<i>2001. szeptember 4. (kedd)</i>		
A molekuláris biológia alapjai: A nukleinsavak általános jellemzése, nukleinsavakra ható enzimek. Plazmidok	Előadás	Dr. Balla Éva ^a
Plazmid izolálás baktériumból. Elválasztás agaróz gélelektroforézissel	Gyakorlat	Dr. Balla Éva ^a
Intestinalis és extraintestinalis megbetegedéseket okozó <i>Escherichia coli</i> virulencia plazmidjai	Előadás	Dr. Tóth István ^e
Molekuláris módszerek mikroorganizmusok identifikálására és tipizálására – általános áttekintés	Előadás	Dr. Maráz Anna ^a
<i>2001. szeptember 5. (szerda)</i>		
Virulencia gén amplifikálása PCR technikával <i>E. coli</i> plazmidról	Gyakorlat	Dr. Tóth István ^e
Prokarióta mikroorganizmusok genomszerkezetének molekuláris jellemzői	Előadás	Dr. Márialigeti Károly ^d
Az eukarióta mikroorganizmusok (elsősorban gombák) nukleáris genomjának molekuláris jellemzése, kariotipizálás	Előadás	Dr. Vágvölgyi Csaba ^b
Az eukarióta mikroorganizmusok (elsősorban gombák) mitokondriális genomjának molekuláris jellemzése	Előadás	Dr. Kevei Ferenc ^b
Mitokondriális DNS polimorfizmus vizsgálata RFLP technikával	Gyakorlat	Dr. Hamari Zsuzsanna ^b
<i>2001. szeptember 6. (csütörtök)</i>		
rDNS analízisen alapuló identifikálás és tipizálás baktériumoknál	Gyakorlat	Kovács Gábor ^d
A DGGE (Denaturáló Grádiens GélElektroforézis) alkalmazása baktériumok faji diverzitásának jellemzésére környezeti mintákban		
RFLP technikák, PCR alapú módszerek és a DNS <i>microarray</i> technika alkalmazása gombák genomanalízisére	Előadás	Dr. Varga János ^b
Molekuláris módszerek alkalmazása a taxonómiában és filogenezisben	Előadás	Dr. Deák Tibor ^a
Génklónozás prokariótákban – klónozó vektorok, gazdasejtek. A génexpresszió feltételei	Előadás	Dr. Rákhely Gábor ^c
Kariotipizálás pulzáló gélelektroforézissel	Gyakorlat	Dr. Maráz Anna ^a
rDNS RFLP analízis és RAPD alkalmazása gombák identifikálására és tipizálására	Gyakorlat	Dr. Balla Éva ^a
<i>2001. szeptember 7. (péntek)</i>		
A kvantitatív PCR alapjai és alkalmazási lehetőségei	Előadás	Paulik József ^g
Mikotoxinok, mikotoxin termeléssel kapcsolatos gének, mikotoxinogén gombák detektálása molekuláris módszerekkel	Előadás	Dr. Téren József ^f
Génklónozás eukarióta mikrobákban – klónozó vektorok, gazdasejtek. A génexpresszió feltételei	Előadás	Dr. Maráz Anna ^a
<i>Escherichia coli</i> transzformálása rekombináns plazmiddal	Gyakorlat	Dr. Balla Éva ^a

^a Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, Budapest^b Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Mikrobiológia Tanszék, Szeged^c Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biotechnológia Tanszék, Szeged^d Eötvös Lóránt Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Mikrobiológia Tanszék, Budapest^e MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest^f Csongrád Megyei Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás, Szeged^g Bio-Rad Magyarország Kereskedelmi Képviselő, Budapest

A Real Time PCR és a Bio-Rad iCycler iQ™ alkalmazási lehetőségei

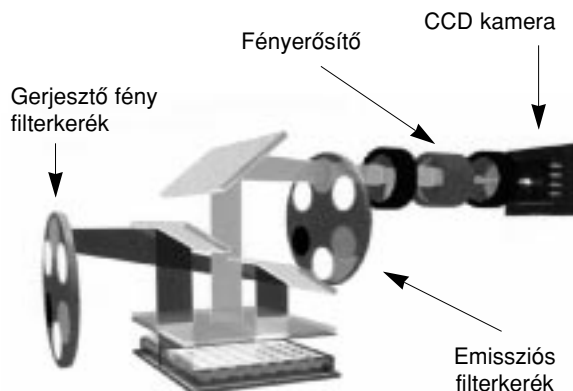
Bevezetés

A Szent István Egyetemi Napok 2001 keretében rendezett „A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása a mikrobiológiában” című szemináriumon szó esett egy viszonylag új technika, a *Real Time PCR* alkalmazási lehetőségeiről is. A „*Real Time PCR* technika” egyre elterjedtebb a molekuláris biológiai eljárások között. A módszer jelentősége nemcsak az, hogy folyamatosan nyomon követhető a PCR reakció, hanem hogy lehetőség van a kiindulási *mennyiség* meghatározására és különböző minták kvantitatív összehasonlítására. Emellett ma már több készülék alkalmas arra is (így a Bio-Rad iCycler iQ is), hogy a keletkezett termék(ek) olvadási hőmérsékletét összevetve pontmutációkat azonosítsunk vele.

A fluoreszcens jelek detektálása az iCycler iQ™-val (hardver)

Felépítését tekintve az iCycler iQ egy *thermocycler* és egy fluoriméter ötvözete, némi csúcstechnológiával vegyítve (1. ábra). Maga a detektor egy CCD kamera, ami előtt a jel egy erősítő rendszeren halad keresztül. A gerjesztő fényt egy halogén izzó bocsájtja ki. A legmegfelelőbb hullámhossz beállítása automatizáltan (csak a használt festéket kell megadni a szoftvernek), egy öt helyes filterkerékbe ágyazott optikai szűrő segítségével történik. A gerjesztő fénysugár az áttetsző fűthető tetőn keresztül jut el a mintákhoz. A kibocsájtott fényt ismét az emissziós maximum hullámhosszú fényt átengedő szűrőn keresztül jut el a jelerősítőbe, majd a CCD kamerához. A Bio-Rad által más készülékekben (pl. konfokális mikroszkópok) is sikerrel alkalmazott erősítőnek köszönhetően a készülék igen érzékeny, megfelelő reagensek alkalmazásával a keresett szekvencia néhány kópiáját is kimutatja.

A szoftveren keresztül vezérelt többszűrős, filterkerékes megoldás lehetőséget biztosít arra is, hogy egy mintán belül a műszer több fluoreszcens festéket is nyomon kövessen. Könnyen elvégezhető akár négy fluoreszcens festék detektálása



1. ábra A Bio-Rad iCycler iQ felépítése

is egyidőben [1]. A multiplex vizsgálatok jelentősége főleg a génexpressziós vizsgálatoknál nagy, ahol sokszor igen kis mintamennyiségből kiindulva kell pontos eredményeket elérni.

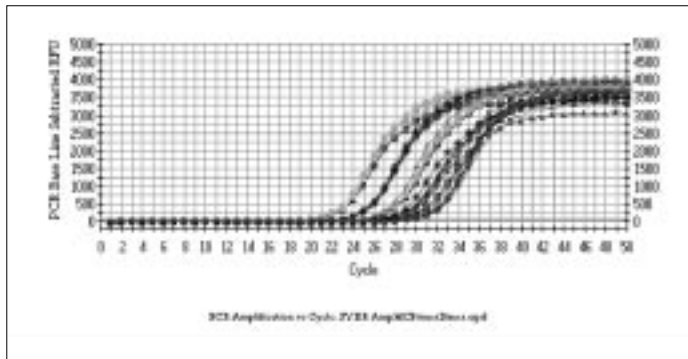
A jelfeldolgozás (szoftver)

A szoftver grafikus formában megjeleníti a fluoreszcencia mért változását (2. ábra). A standard görbe segítségével lehetővé válik az ismeretlen minták mennyiségének meghatározása. A program alkalmas a kapott termékek olvadáspontjának megállapítására is (*Melt Curve Option*). Ez specifikus egy adott termékre ugyanúgy, mint a fehérjékre a pI értéke. Az olvadási görbe nagy jelentőséggel bír a pontmutációk kimutatásánál és összevetésénél, ami egyben a leggyakoribb alkalmazási területe (3. ábra).

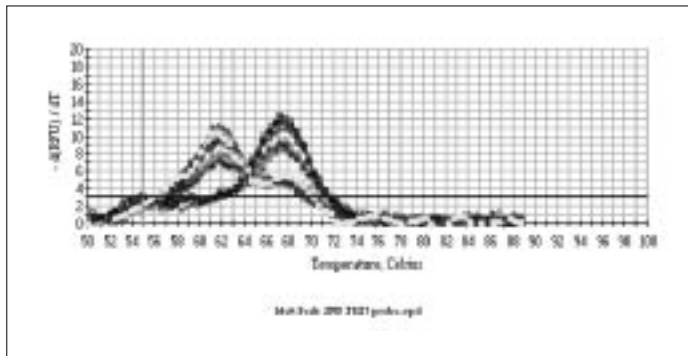
Alkalmazási lehetőségek

A *Real Time PCR*-t és az iCycler iQ-t eddig a következő alkalmazásoknál használták fel sikeresen [2–6]:

- Génexpressziós vizsgálatok
- Ún. „*viral load*”, vírusfertőzöttség mértékének meghatározása



2. ábra Az iCycler iQ „Real Time adatainak” grafikus megjelenítése



3. ábra Az olvadáspont görbe (Melt Curve) deriváltja: olvadáspont grafikus megjelenítése



Az iCycler iQ rendszer

- GMO teszt: a genetikailag módosított összetevők százalékos arányának megállapítása élelmiszer-mintákban
- Pontmutációk meghatározása (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Összefoglalás: a jó *Real Time* PCR rendszer ismérvei

A fentiek alapján a következő tulajdonságokat emelhetjük ki, melyek egy jó *Real Time thermocycler*-re jellemzők:

- Érzékenység: nagyon alacsony kópiaszám (1–10) kimutatása.
- Széles dinamikus tartomány: pontos (lineáris) mérés tág koncentrációhatárok között
- Többféle kémiai háttér alkalmazási lehetősége (*TaqMan*, *Molecular Beacon*, *FRET* próbák, *Sybr Green I* stb.).
- Multiplex lehetőség: egyszerre több szekvencia detektálása ugyanabból a mintából.
- Könnyen kezelhető szoftverháttér.

A Bio-Rad iCycler iQ™ a piacon fellelhető egyik legrugalmasabb *Real Time thermocycler*. A világszerte eladott több mint 2000 műszer és a több mint húsz irodalmi hivatkozás azt bizonyítja, hogy kedvelt a kutatók között, és jól használható a fenti alkalmazásokra.

Hivatkozások

- [1] Boekman, F., Tan, L., Brisson, M., Park, R., Harnby, K. (2001) Real-Time multiplex PCR using the iCycler iQ detection system. *BioRadiations*, **106**: 24–27.
- [2] Allen-Jennings, A. E., Hartman, M. G., Kociba, G. J., Hai, T. (2001) The roles of ATF3 in glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **276**: 29507–29514.
- [3] Beresford, G. W., Boss, J.M. (2001) CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. *Nat. Immunol.*, **2**: 652–657.
- [4] Helps, C., Reeves, N., Tasker, S. Harbour, D. (2001) Use of real time quantitative PCR to detect *Chlamidophila felis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 2675–2676.
- [5] Moir, S., Malaspina, A., Ogwaro, K. M., Donoghue, E. T., Hallahan, C. W., Ehler, L. A., Liu, S., Adelsberger, J., Lapointe, R., Hwu, P., Baseler, M., Orenstein, J. M., Chun, T. W., Mican, J. A., Fauci, A. S. (2001) HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 10362–10367.
- [6] Schneider, D., Shahabuddin, M. (2000) Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science*, **288**: 2376–2379.



AKTIVIT

TERMÉKAJÁNLAT:



BIOANALITIKAI TERMÉKEK:

Készletek nukleinsav-tisztításhoz

NUCLEOBOND® oszlopok és készletek
anioncserélő technika alkalmazásával

Nucleotrap® és **Nucleotrap®CR** kiték DNS tisztításhoz
szilikagól mátrix technika alkalmazásával

NucleoSpin® termékcsalád nukleinsav-tisztításhoz
szilikagól membrántechnika alkalmazásával

- NucleoSpin® Plus
- NucleoSpin® Multi 8 Plasmid és Multi 8 Plus Plasmid
- NucleoSpin® Extract
- NucleoSpin® Blood és Blood L
- NucleoSpin® Multi 8 Extract
- NucleoSpin® C + T
- NucleoSpin® Plant
- NucleoSpin® RNS
- NucleoSpin® Virus és Virus L

Speciális HPLC kolonnák bioszeparációhoz

- Ioncserélő kolonnák
- Fordított fázisú kolonnák
- Gél töltésű kolonnák

Transzfer közegek és szűrő rendszerek

- CHROMAFIL® membránszűrők
- porablot® transzfer membránok
- Blotting papírok
- BIO-LAB-TOP

Mikrobiológiai gyorsesztek

- BioFix® tesztsíkok mikrobiológiai vizsgálatokhoz
- Mikrobiológiai gyorsesztek higiénias vizsgálatokhoz

ALTALÁNOS LABORATORIUMI ESZKÖZÖK ÉS GÉPEK:

analitikai és gyorsmérlegek, súlysorozatok, ♦ pH papírok, tesztpapírok, ♦ pH és vezk. mérő műszerek, ♦ szűrőpapírok, membránszűrők, extrakciós hüvelyek, ♦ kémcsőkeverők, rázógépek, víz- és olajfürdők, termosztátok, ♦ malmok, ultrahangos keverők, labor reaktorok ♦ Mágneses és pálcás keverők, ♦ diszpergálók és homogenizálók, labor szivattyúk, roncsolók, desztillálók



SZERVES KÉMIAI ANALITIKA:

♦ HPLC oszlopok, cartridge rendszerrel is, GC kapillárisok, polimer kolonnák ♦ TLC hordozók, szorbensek és kész VRK-lapok Al, műanyag és üveg hordozón ♦ C-H-H-O-S és összes N automata elemösszetétel analízátorok ♦ BIO-ANALITIKAI TERMÉKEK széles VÁLASZTÉKA

AKTIVIT Kft. 1145 Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel.: 47-00-125, 221-7865, 221-7866

FAX:
252-9940

Gyártók: AUTOMESS GmbH., BEHR GmbH., ELEMENTAR GmbH.,
GRÖGER & OBST GmbH., HYDROLAB Co., IKA WERKE GmbH.,
KERN GmbH., MACHEREY-NAGEL GmbH., SKALAR BV., WTW GmbH.

Beszélgetés az emberi genomról

Beszámoló a „Hőgyes délutánok” keretében 2001. június 19-én elhangzott „Kerekasztal a génekről” című előadás-sorozatról

Molekuláris biológiai vegyész szemmel

Az előadó-délután nyitóelőadását tartó Hollósi Miklós kémikusként arra vállalkozott, hogy röviden vázolja a nukleinsavkémia és molekuláris biológia kialakulását. A történet 1869-ben kezdődött, amikor Miescher gennysejtek magvából izolált egy savanyú jellegű, híg lúgban oldódó, foszfortartalmú anyagot, amelyet *nuclein*-nek nevezett el. Ahogy a fehérjék szerkezetvizsgálata során, itt is kezdetből fogva szükség volt a kémikusok és biológusok együttműködésére, hiszen a természetes eredetű minták kezelése biológiai ismereteket igényelt. Hamar megjelentek az enzimek is (foszfatázok stb.), ezekből a későbbiek során a nukleinsavkutatás igazi sztárjai lettek. A szerkezetvizsgálat és szintézis területén Emil Fischer, a szerves kémia egyik legnagyobb egyénisége végzett úttörő munkát. Helferich társaságában ő dolgozta ki az első nukleozid szintézist (1917). Őket Levene, Chargaff, Todd, Carter, Cohn és Khorana követték. Todd és munkatársai írták le a természetes ribonukleozidok, valamint a nukleozid-foszfátok (nukleotidok) első szintézisét (1947). A Chargaff-szabályokra, valamint Franklin és Wilkins DNS rostokon végzett röntgenkristallográfiai vizsgálataira támaszkodva Watson és Crick levezették a DNS kettős hélix szerkezetét, feltárva ezzel a replikáció mechanizmusát is. A *genetika* Nágeli munkásságával kezdődött, aki elsőként írta le a kromoszómákat (1842). Húsz évvel később Mendel megfogalmazta az *öröklődés szabályát*. A kromoszómákat és Mendel munkásságát közel 40 évig figyelemre sem méltatták. A kromoszómaelmélet kidolgozása Sutton nevéhez fűződik (1902), a kromoszómák öröklésben betöltött alapvető szerepének felismeréséért Morgan 1933-ban részesült Nobel-díjban. De több mint tíz évnél kellett eltelnie addig, amíg általánosan elfogadottá vált, hogy a genetikai információt nem a fehérje, hanem a DNS hordozza. Végül a baktérium- és fággenetika megnyitotta az utat a *molekuláris genetika* kialakulása előtt.

Az előadó röviden összefoglalta a DNS szerkezeti szintjeit a kettős hélixről egészen a kromoszómáig. Kitért a molekuláris genetika többnyire angol eredetű szakkifejezéseire is – ezek magyar megfelelői vagy nem léteznek, vagy nem terjedtek még el. [A részletek iránt érdeklődőknek a szerzők ajánlják

Bálint Miklós: *Molekuláris Biológia* (I–II. kötet, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 2000) című könyvét és Nyitray László: *Géntechnológia* című elektronikus jegyzetét (<http://cerberus.elte.hu/biokemia/rekdns.htm>)]. Vázolta a genomkutatás elválasztástechnika és enzimológiai módszereit. A nukleinsavszekvenálás és a géntechnológia legfontosabb eszközei azonban a *restrikciós enzimek*, amelyek specifikus, úgynevezett *palindrom* szekvenciákat hasítanak. (A palindroma azt jelenti, hogy egy szó vagy mondat előlről és hátulról olvasva azonos. A restrikciós enzimeket elsősorban prokarióták „használják” idegen eredetű DNS lebontására. Az ismert képviselők száma több mint száz. A restrikciós enzimek úgy hasítják az óriási DNS-molekulákat, hogy a restrikciós fragmensek jellegzetes ujjlenyomatot alkotnak. Különböző restrikciós enzimeket alkalmazva, az átfedő fragmensek lehetővé teszik a hosszú DNS-láncok egyértelmű felépítését. A restrikciós enzimek felfedezéséért Arker, Smith és Nathans részesült Nobel-díjban (1978). Ami talán még fontosabb: a hasadási helyeken elvágott láncok a *DNS ligázok* segítségével újra egyesíthetők. Így a két enzim együttes alkalmazása lehetőséget teremt a gének „szabására-varrására”, sőt mi több, új, tetszőleges DNS-szakaszok beépítésére is. Berg (Nobel-díj, 1980), Boyer és Cohen úttörő munkássága a hetvenes évek elején a *rekombináns DNS technika* kifejlesztéséhez vezetett. Ennek lényege az, hogy új génszakaszok és gének állíthatók elő laboratóriumi körülmények között. Az új génkombinációk klónozhatók – vagyis megsokszorozhatók – megfelelő sejtekben a gazdasejt saját DNS-szintetizáló mechanizmusa révén. Sőt mi több, az új gének átírhatók és a transzlációt követően új fehérjék állíthatók elő. Vagyis, a gazdasejt genetikai anyaga szinte tetszés szerint változtatható.

A másik csodálatos, az ember szolgálatába állított enzim a *Taq DNS polimeráz*. Ez az enzim a hőforrásokban élő baktériumból, a *Thermus aquaticus*-ból származik, az optimális működési hőmérséklete 72 °C, de kibírja a 95 °C-ot is. A Taq polimeráz a *polimeráz láncreakció* (PCR) kulcsenzime. Ezzel a módszerrel egyetlen DNS molekulából 10⁹ másolat készíthető el kevesebb mint egy óra alatt. A PCR módszer kifejlesztőjét Mullis-t is Nobel-díjjal tüntették ki (1993).

A géntechnológiában kezdettől fogva fontos szerep jutott a kémiának. Van azonban két terület, ahol a kémikusok látványos eredményeket értek el, döntő mértékben felgyorsítva a kutatásokat. Az egyik a DNS bázissorrendjének meghatározása (szekvenálás). Számos hatékony eljárás ismeretes, a legszellemebb közülük a Sanger által kifejlesztett didezoxi módszer. Érdekessége az, hogy nem lépésenkénti lebontáson, hanem az enzimkatalizált DNS szintézis irányított megszakításán alapul. Nem véletlen, hogy *didezoxi módszer* felfedezéséért Sanger 1980-ban megkapta a második kémiai Nobel-díját is (az elsőt a fehérjék, elsősorban az inzulin szerkezetvizsgálataért ítélték oda neki 1958-ban).

A kémia másik nélkülözhetetlen hozzájárulása a szilárdfázisú oligonukleotid szintézis. Az alapok már adva voltak, hiszen a szilárd fázisú peptidszintézis megvalósításáért Merrifield már Nobel-díjban részesült (1984). Az oligonukleotidok peptidektől különböző kémiai tulajdonságai miatt természetesen más hordozót és védőcsoportokat kellett választani. Egy ciklus 10 percig tart és 98%-os hozammal hosszabbítja meg az oligonukleotid láncot.

A tudomány „használlatai” az *Escherichia coli* baktérium és az élesztő gomba voltak. *Vektornak* nevezük az adott szervezet esetében azt a DNS-t, ami autonóm sokszorozódásra képes. Az *E. coli* esetében használható vektorok a plazmidok és a λ fág nevű vírus. A restrikciós enzimek segítségével úgynevezett *tapadóvégek* alakíthatók ki, amelyek megengedik az új DNS-szakasz vagy gén beékelését. A lényeg az, hogy mind a plazmid, mind pedig az új DNS-szakasz hasítható legyen a választott restrikciós enzim segítségével. Az antibiotikumrezisztencia elvesztése indikátorként szolgálhat, jelezve, hogy sikerült az új DNS-t beépíteni, elrontva a rezisztenciagént. Ha a vektor nem tartalmaz megfelelő hasítási helyet, úgy oligonukleotidszintézissel elő lehet azt állítani és hozzá lehet kapcsolni a vektorhoz. Ily módon *kiméra* DNS-molekulák állíthatók elő, amelyek egymással kapcsolatban nem álló génekből épülnek fel. Általánosabban alkalmazható vektorok a *bakteriofágok*.

A nyitóelőadást a humán genom vizsgálatának felvázolása zárta. Az előadó kitért a genomkutatás gyakorlati vonatkozásaira és hasznára is. Foglalkozott a *rekombináns DNS-technika* (géntechnológia) orvosdiagnosztikai, régészeti, őslénytani alkalmazási területeivel, valamint a felmerült számos új kérdéssel és problémával. Hangsúlyozta, hogy a humán genom meghódítása csak az első lépés, ami most következik, az a *proteómakutatás* és a *funkcio-*

nális genomika, az élettudományok területén ezektől remélhető az igazi áttörés.

A humán genom meghódítása

Nyitray László (ELTE, Biokémiai Tanszék) – a rekombináns DNS technikák aktív felhasználója – bevezette a hallgatóságot a genomkutatás műhelytitkaiba. A videoprojektor alkalmazásával segített, jól felépített és színes előadásból megismerkedtünk a genomkutatás személyi, szervezeti és technikai előzményeivel. Mint ismeretes, a *Human Genom Project* (HGP) 1990-ben indult be J. Watson irányításával, akitől a vezetést később F. Collins vette át. 1998-ban „szállt ringbe” a *Celera Genomics*, J.C. Venter vállalkozása, amely mögött hihetetlenül erős műszer- és számítógép-ipari háttér állt. A munka sikerét a Sanger-féle didezoxi módszerrel alapuló *automata fluoreszcens szekvenátorok* megjelenése biztosította. A kapilláris elektroforézisen alapuló legmodernebb szekvenátorok teljesítőképessége már >1 Mb/nap és a szekvenálás költsége mindössze 0,5 \$/bp (Gb=gigabázis, Mb=megabázis, kb=kilobázis, bp=bázispár). Az adatok kiértékeléséhez nagy teljesítményű számítógépekre és a feldolgozást elősegítő új tudományág, a *bioinformatika* kialakulására is szükség volt. A könnyen kezelhető *genomkönyvtárak* létrehozása céljából egyre hosszabb klónokat kellett előállítani. Jelenleg a *mesterséges kromoszómáknál* tartunk, ilyen a YAC és a BAC (utóbbi 150 kb méretű szekvenciák klónozására is alkalmas).

Az emberi genom óriási méretű, legújabb adatok szerint $3,2 \cdot 10^9$ bázispárból (3,2 Gb) épül fel. Célszerű volt kisebb genomú élőlények – prokarióták majd eukarióták – genomjának felderítésével kezdeni a munkát. A HGP konzorcium klónról klónra haladt, eredményeit folyamatosan közzétette. A Celera a „*shutgun*” módszert alkalmazta: nem törődve a kromoszómákkal, a teljes genomot apró darabokra tördelték és az információk „összeillesztését” a számítógépekre bízta.

Örvendetes, hogy a munka sikerét a HGP és a Celera 2000. június 26-án közösen jelentették be, hangsúlyozva, hogy a humán genom („*The Book of Life*”) az emberiség közkinccse. Ez a könyv izgalmas és egyben hátborzongató olvasmány. Megdöbbenő, hogy a 3,2 Gb méretű, 23 kromoszómára elkülönülő humán genom szekvenciájának csupán néhány százaléka gén. A *fehérjéjének* számát jelenleg 35000-re becsülik (átlagos hosszúságuk 30 kb), ismeretes ~740 *RNS-gén* is. Az átírt DNS kb. 30%, de csak kb. 1,5% az információhordozó *exon*, az *intronok* az átszabás (*splicing*) során kihalnak. Az átírást szabályozó (pl. promóter és más szabályozó

elemek) DNS-láncszakaszok hosszát 20 százalékra becsülik. Azonosítottak a genomban kb. 200 bakteriális eredetű gént is, de a legmegdöbbentőbb az, hogy a genom mintegy 50 százaléka – jelenlegi ismereteink szerint funkcióval nem rendelkező – ismétlődő (szemét vagy „önző”) DNS.

A DNS által kódolt fehérjék teljes mennyisége a *proteom*. A fehérjének száma ugyan csak ~35000, de az emberi fehérjék számát több mint 100000-re becsülik. Ez azt jelenti, hogy különböző mechanizmusok révén (pl. alternatív *splicing*, poszttranszlációs módosulások) egy adott DNS-szakaszból végeredményben több fehérje is lehet. A genom és proteom információtartalmát adatbázisokba helyezik. Ezek alapján megkezdődhet a félelmetes mennyiségű adathalmaz feldolgozása, mely bőven ellátja munkával a molekuláris biológusokat a következő évtizedre. (Jelenleg több mint ötven prokarióta és öt eukarióta élőlény teljes genomját ismerjük.)

Kezünkben van tehát életünk könyve, de még messze vagyunk annak teljes megértésétől. A DNS kis töredékének ismerjük csak a szerepét, a fehérjék nagyobb részének biológiai funkciója nem ismert. A nagyszámú nyitott kérdésre a *funkcionális genomika* és *funkcionális proteomika* adja meg majd a választ. A következő szint a DNS és a fehérjék szerkezetének atomi felbontású megismerése (*szerkezeti genomika*) lehet. A *fehérje-térszerkezeti adatbankok* több mint 15000 fehérje röntgenkristallográfiai vagy NMR módszerrel meghatározott atomi koordinátáit őrzik; a térszerkezetek feltárása segít a fehérjék biológiai funkciójának megismerésében is. Ez után következik a fehérjékből és nukleinsavakból felépülő *szupramolekuláris komplexek* vizsgálata és a makromolekulák közötti interakciók és funkcionális hálózatok felderítése. Az előadó kitért saját géntechnológiai munkájára is (a miozin nehéz lánc génjének azonosítása).

Humán tripszinek vizsgálata

Szilágyi László (ELTE Biokémiai Tanszék) elsősorban tanszéki kutatásokról számolt be. A humán genom feltérképezése során került sor a 7. kromoszóma egy kb. 0,7 Mb-nyi szegmensének szekvenálására. Ezen a szakaszon a T-sejt receptor (TCR) β -láncának a génje található. A variábilis génszegmensek két oldalán tandem duplikációra utaló elrendeződésben nyolc tripszinogén gént is találtak. E szakaszok többsége inaktív, általában pszeudogén. A cDNS szekvenciák alapján azonosították a T4 gént a humán kationos tripszinogénnel (humán tripszinogén 1) és a T8 gént a humán anionos tripszinogénnel (humán tripszinogén 2). Ez a két trip-

szinogén elsősorban a pankréaszban expresszálódik, nyomokban azonban számos más szövetben is kimutatták. A humán tripszinogén 1 (T4) számos tumorban intenzíven kifejeződik.

További vizsgálatok során kiderült, hogy a 7. kromoszóma egy rövid szakasza, három V β génszakasz egy tripszinogén génnel együtt (T9) transzlokálódott a 9. kromoszómára. Jelenlegi tudásunk szerint ez a genomátrendezés csak az emberre jellemző. A T9 gén aktív terméke azonosnak bizonyult a mezotripszinnel, a pankréaszban kis mennyiségben expresszálódó inhibitorrezisztens tripszinnel és az agyban expresszálódó tripszin 4-gyel. Szilágyi László és munkatársai klónozták a humán tripszinogén IV génjét és kidolgoztak egy hatékony bakteriális expressziós rendszert a fehérje nagy mennyiségben történő előállítására. A humán tripszin 4 enzimaktivitása szintetikus amid- és észterszubsztrátokon mérve megegyezik a szarvasmarha, illetve a patkány tripszinével, ugyanakkor a polipeptid jellegű inihibitorok az előbbieknél 4–6 nagyságrenddel gyengébben gátolják. A tripszinek szekvenciáját összehasonlítva felmerült az a gyanú, hogy a humán tripszin 4-nek e különleges tulajdonsága egyetlen mutáció eredménye. Az adatbázisokban található valamennyi tripszinszekvenciában, néhány kígyóméreg tripszintől eltekintve, a 193-as pozíciót glicin foglalja el, míg a humán tripszin 4-ben (és az említett kígyóméreg tripszinekben is) ebben a pozícióban arginin található. Irányított mutagenézis kísérletekkel sikerült igazolni, hogy az inhibitorrezisztenciát valóban az Arg193 okozza. Röntgenkristallográfiás úton meghatározták a humán tripszin 4 térszerkezetét, és megállapították, hogy az arginin oldallánca a tripszinmolekula felszínén az S2' szubsztrátkötő helyen helyezkedik el, és ily módon sztérikus és elektrosztatikusan gátolja az inhibitor-molekulák kapcsolódását. Az eredmények világosan mutatják, hogy egy ilyen, alapvetően biokémiai jellegű munkában is milyen nagy segítséget nyújt a DNS adatbázisokból nyerhető információ.

Az előadásokhoz többen is hozzászóltak (Tomasz Jenő, Gráf László, Hermecz István). E beszámoló szerzői úgy gondolják, hogy az előadóülés érdekes és hasznos volt. Rohanó korunkban mindenki tud – elsősorban a televízió, számítógép stb. jóvoltából – az informatika forradalmáról. Kevesen vannak azok, akikben tudatosodott az, hogy a humán genom megismerése talán minden idők legjelentősebb és legnagyobb haszonnal járó felfedezése.

Hollósi Miklós, Nyitrai László és Szilágyi László

Újabb Hőgyes délután a gyógyszerkutatásról

2001. második félévének első Hőgyes délutánjára október 9-én került sor a gyönyörűen felújított Hőgyes-teremben. Az első előadó Prof. Hideg Kálmán (PTE, Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet) volt, aki „*Szabad gyökök szerepe a bioaktív vegyületek kutatásában*” címmel adott áttekintést a terület gyógyszerkémiai és biológiai vonatkozásairól. Előadásának rövid összefoglalójából is kitűnik, hogy a gyógyszerkutatás számára nemcsak új hatóanyagok, hanem akár diagnosztikumok és farmakológiai „eszközök” is kifejleszthetők az elmondott ismeretek alapján.

A földi élet az oxigén jelenlétéhez alkalmazkodott, amely maga is biradikális vegyület – vagyis szabad gyök nélkül nincs élet. Ugyanakkor az enzimek és az antioxidánsok által nem kontrollált oxidációs folyamatok során képződő gyökös és nem gyökös reaktív oxigén- és nitrogénintermedierek (ROI, RNI) okozta károsodás, az oxidatív stressz, számos patológiás folyamat velejárója. Az oxidatív szabad gyökök rövid (10^{-1} – 10^{-9} s) élettartamúak, így kimutatásuk csak hosszabb élettartamú gyökké alakítással lehetséges. A leggyakoribb spincsapda vegyületek a nyílt láncú és aliciklusos nitronok (PBN, POBN, DMPO). Az előadó csoportja új, adamantán típusú spincsapda reagenseket és szingulett oxigén csapdázására alkalmas ún. kettősen jelölő (spin és fluoreszcens) reagenseket állított elő. Az oxidatív stressz okozta károsodást csak olyan specifikus enzimekkel, antioxidáns molekulákkal lehet eredményesen csökkenteni, kiküszöbölni melyek a keletkezés helyén és pillanatában azokat kevésbé toxikus molekulákká képesek metabolizálni. Az előadó munkacsoportja hazai és külföldi iskolákkal együttműködve úgy találták, hogy a stabilis nitroxid szabad gyökök diamágneses aminprekursoraihoz kapcsolt – egyébként antioxidáns hatással nem rendelkező vegyületek – antioxidáns hatást is mutatnak, így terápiás értékük megnő, illetve a piperolin- vagy piperidényűrű szinergizálja az antioxidáns molekula (pl. Ebselen) hatását.

Az előadás harmadik tématerülete a spinjelölés volt. Az előadó a hely- és funkcióspecifikus spinjelző reagensek kifejlesztését és azok biofizikai, biokémiai alkalmazását ismertette. A pironin, pironidin, illetve piperidin szabad gyökök megfelelő származékai alkalmasak arra, hogy a stabilis paramágneses vegyületeket lipidek, gyógyszerek, aminosavak vázába beépítsük, így esély van rá, hogy a spinjelzést még szelektívebbé és érzékenyebbé tegyük a biomolekula alakjának és funkció csoportjainak a lehető legkisebb mértékű változtatásával.

A következő előadó Prof. Arányi Péter (Sanofi-Chinoin) volt, aki „*Originális gyógyszerkutatás: alkalmazott funkcionális genomika?*” címmel tartott előadásában bemutatta a mai gyógyszerkutatás új lehetőségeit, különösen amelyek a genomika eredményeiből adódnak [az előadó e témakörben folyóiratunk hasábjain is beszámolt, ld. Arányi, P. (2001) Gyógyszerkutatás molekuláris célpontok felhasználásával. *Biokémia*, XXV: 50–52. – A Szerk.]. A humán genom szerkezetének 2001 februárjában történt első vázlatos publikálása nagy reményeket keltett a gyógyszergyártók körében éppúgy, mint a betegek és az orvostársadalom képviselői között. A tudományos közélet vezető személyiségei megvannak győződve arról, hogy ezen új ismertek birtokában a gyógyszerkutatás hozzáférhető molekuláris célpontjainak a száma egy csapásra megsokszorozódott, és ez nagy lendületet adhat az innovatív originális gyógyszerek felfedezésének. A közelmúltban – már a humán genom vázlat közzététele előtt – egyre nagyobb számban váltak ismertté új gének szerkezetei, melyek közül az érdekeseknek tűnő célpontok validálása nagy intenzitással kezdődött meg. Ezt példázza, hogy a mindössze három éve felfedezett orexinreceptorok fiziológiás szerepének tisztázásával szinte egyidőben, 2000-ben látott napvilágot a SmithKline Beecham orexin antagonistá fejlesztési jelöltje, mely az obezitás, esetleg az alvászavarok gyógyításában nyerhet felhasználást.

A jelenleg létező gyógyszerkincshez tartozó molekulák kb. 700 molekuláris célpont segítségével fejtik ki hatásukat, míg a lehetséges célpontok számát 5 és 10 ezer közöttire becsülik. A molekuláris célpont kiválasztása és validálása a hatásmechanizmus ismerete révén lehetővé teszi a terápiás terület meghatározásán kívül bizonyos várható mellékhatások predikcióját és az első szűrővizsgálati rendszerek hatékony kidolgozását is. A molekuláris célpont validálása példaként az előadó a PDE4 enzim mutatta be, melynek gátlása a gyulladáshoz vezető betegségek kezelésében lehet előnyös. A gyógyszerfejlesztés folyamatának áttekintése során hangsúlyozta, hogy a molekuláris célpontok kiválasztásában kivételes esélyeket teremtő funkcionális genomikai ismeretek egyre nagyobb mértékben járulnak hozzá az új gyógyszerek azonosításához. Ugyanakkor a gyógyszerfejlesztés komplex folyamatában továbbra sem tekinthetünk el a klasszikus szakterületek komplex alkalmazásától.

Hideg Kálmán és Arányi Péter

Tudósítás a 2001/2002. évad első Bruckner-termi előadásáról

Az Eötvös Loránd Tudományegyetemen 2001. szeptember 28-án, a „Bruckner-termi előadások” sorozat keretében két tudományos beszámoló hangzott el. Elsőként dr. Zarándi Márta, egyetemi docens (Szegedi Orvostudományi Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet) ismertette a rákos megbetegedések, illetve az Alzheimer-kór kezelésére alkalmas peptidekkel és származékaikkal kapcsolatos eredményeiket, majd dr. Györgydeák Zoltán, egyetemi docens (Debreceni Egyetem, Szerves Kémiai Tanszék) vette át a szót, megismertette a hallgatóságot a különböző glikozil-amidok, -imidek és karbodiimidek előállításának új és hatékony módszerével.

Zarándi Márta bevezetőjében felhívta a figyelmet arra, hogy az átlagéletkor kitolódásával párhuzamosan növekszik egyes – különösen az időskorra jellemző – megbetegedések gyakorisága. Ide sorolhatók egyes daganatos betegségek és az Alzheimer-kór, melyek kialakulásában és kezelésében is központi szerepe van különböző peptideknek, peptid-származékoknak. Az első részben a rákos sejtek fejlődését gátló ún. növekedési hormont felszabadító hormon-(GH-RH) antagonisták szintézisét és biológiai hatását ismertette az előadó. A másodikban az Alzheimer-kór kapcsán célba vett, a neurotoxicitás kivédésére alkalmas, illetve az aggregációt gátló „beta sheet breaker” (BSB) peptidek tervezéséről, előállításáról és szerkezet-hatás vizsgálatáról számolt be. Megfelelő GH-RH-antagonisták alkalmazásával van lehetőség e hormonok termelődésének visszaszorítására, s a kutatócsoport ezt a szabályozási lehetőséget kihasználva tűzte ki célul az irodalomban már ismert antagonistáknál hatásosabb vegyület szintézisét. Többlépcsős szisztematikus változtatásokkal számos új peptidet állítottak elő, melyeknek *in vitro* és *in vivo* vizsgálataiban az eredmény kecsegtető. Néhány peptidszármazék jóval hosszabb ideig volt kimutatható, ami előnyös lehet a gyógyszerként való alkalmazás szempontjából.

Az előadás második felében egy tipikus időskori betegségről, az Alzheimer-kórról és kezelési lehetőségeiről esett szó. A betegség kialakulásában döntő jelentőségű az ún. amiloid prekursor protein (APP), melyből az enzim hasítással képződő β -amiloid peptidek (β A) neurotoxikus hatása ma már bizonyított, és aggregációjuk amiloid plakkok kialaku-

lásához vezet. Több kísérlet irányult a neurotoxicitás, illetve a plakk-képződés kivédésére alkalmas (ún. funkcionális antagonisták; BSB) peptidek szintézisére. A β A más és más szekvenciáit alapul véve szisztematikus módosításokat hajtottak végre, számos rövidebb peptidet állítottak elő, melyek közül több származék az irodalomban leírt BSB peptidnél nagyobb mértékben gátolta a β A aggregációját. Sikerült előállítani olyan származékot is, mely mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben kivédte a β A neurotoxikus hatását. Reménykeltő, hogy ezek a származékok alapul szolgálhatnak új, az Alzheimer-kór progresszióját gátló gyógyszerek kifejlesztéséhez.

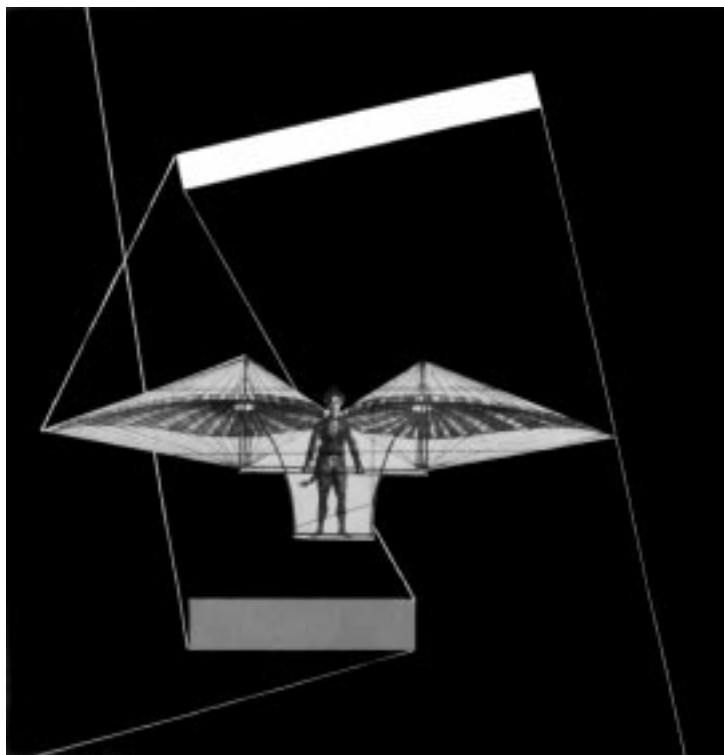
A másik előadásban Györgydeák Zoltán a különböző glikozilszármazékok (amidok, imidek, karbodiimidek) trimetil-foszfin felhasználásával, optimalizált reakciókörülmények között történő előállításáról számolt be. Az élő szervezeteket vizsgálva számos esetben találkozhatunk a fehérje-szénhidrát kapcsolódás különböző típusaival. Erre példa a β -N-acetil-D-glükózamin és az aszparaginsav között, vagy az α -D-ribofuranozil-glicinamidban megvalósuló amidkötés. Az előadás első részében a szerző áttekintette a glikozil-amidok szintézisére korábban már publikált módszereket – például glikozil-aminok acilezése vagy szililezett savamidok glikozilezése révén, de az amidkötés kialakítható glikozil-izotiocianátok és a kívánt savak között lejátszódó reakcióval, illetve glikozil-tioamidok higanyos katalizálta átalakításával is. Az előadásban bemutatásra kerültek a Staudinger-reakció módosításai, illetve az így előállított vegyületek. A kísérletek során a szerző és munkatársai reagensként többféle alkil-, illetve aril-foszfin próbáltak ki, valamint vizsgálták különböző oldószerek és a hőmérséklet hatását a reakciókra. A termékeket (glikozil-amidok, -imidek és -karbodiimidek) sokoldalúan jellemezték (NMR, MS, optikai tisztaság) és vizsgálták kémiai reaktivitásukat is. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a legjobb kitermelést trimetil-foszfin alkalmazásával lehet elérni, s emellett szól a reakcióelegy viszonylag egyszerű feldolgozhatósága, valamint az a tapasztalat is, hogy az így előállított foszfiniminek kiválóan használhatók további átalakításokhoz.

Ligeti Melinda és Tugyi Regina

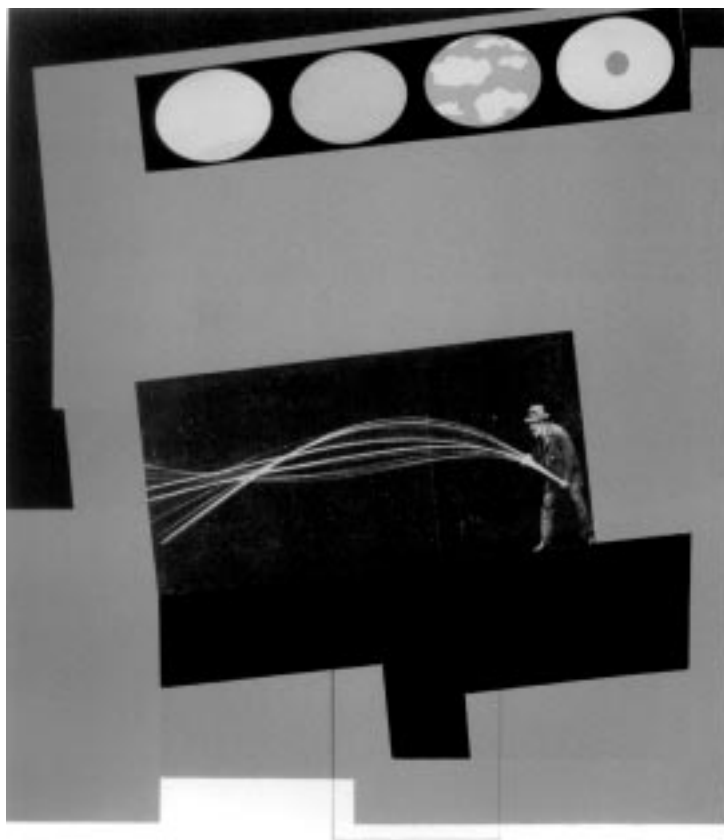
Konok Tamás 1930-ban született Budapesten. 1953-ban végzett a Képzőművészeti Főiskolán, s emellett felsőfokú zenei tanulmányokat is folytatott a győri Zene-művészeti Konzervatóriumban. 1959-ben Franciaországba költözik, 1970-ben a francia állampolgárságot is felveszi. Kiállításai, ösztöndíjai, megbízásai kapcsán világszerte sok helyütt dolgozik – 1960 és 1980 között külföldön állítja ki munkáit (önálló kiállítások: Párizs, New York, Washington D.C., Los Angeles, Hamburg, Köln, München, Rotterdam, Zürich, Genf, Bazel, Stockholm stb.), 1980 óta hazai kiállításai is újfent gyakoriak. 1985 óta a Budapesti Műszaki Egyetem vendég-professzora, 1998 óta a Magyar Képzőművészeti Egyetem Társadalmi Tanácsának tagja. 1997 óta a francia *l'Ordre du Mérite* lovagja. Fontosabb hazai kitüntetései, díjai: Derkovits-ösztöndíj (1958), Kossuth-díj (1998).

Ábrázolásvilágát – melyben elemzői gyakran felfedezik zenészi háttér és a metafizika nyomait is – a mérnöki pontos, mégis egyszerű szerkesztettség, a szigorú vonalvezetés, a geometrikus jelek, ívek, vonalak, síkidomok és formák megtervezett illeszkedése vagy kontrasztja jellemzi. Az így kialakított geometrikus térhatás mintegy folytatása a *Kassák*, *Moholy-Nagy*, *Malevics*-féle konstruktivista vonulatnak, azonban az üres terek és formák váltakozása révén kialakított dinamizmus, a különböző anyagok, színek, formák illeszkedése, egymásba ágyazódása vagy éppen ellentéte, a szabályos és a szabálytalan ismétlődések ritmikája révén jellegzetesen egyéni láttatás. A „hagyományos” olajfestmények (akril, vászon) mellett kollázstechnikát is alkalmaz, vásznon, kartonon, merített papíron egyaránt. Amint Lucia Moholy írja róla: „Az „anyag” fogalmát nála úgy kell érteni, hogy az „organikus” természetű alapterek a belőlük kinövő alakzatok élő hordozóivá válnak: képletek, amelyeknek segítségével az ember és a művész Konok érzéseit és gondolatait közvetíti. Kiegészítő a „forma”, ez nélkülözhetetlen a tér megnyitására, amelyből az alakzat az előre elképzelt képtérből felénk lép anélkül, hogy az alaptérből való távolságot megtagadná. Ennek az eredetileg síkban fogalmazott alakzatnak festői funkcióját rendező vonalakcentusok tisztázzák és támasztják alá. Ugyanakkor a mű összhatását is növekvő és egyre tisztább egyértelműséggel határozzák meg. A festői eljárásnak ezen a módon létrehozott zárt egysége, amely mind a három fokon egy specifikus képmisszióban lép fel, összességében egy Konokra jellemző képarchitektúrában található, és lehetőséget nyújt filozófikus gondolatok kiváltására is. Konok művészetének elemzése nem lenne teljes, ha nem utalnánk műveinek filozófiai háttérére is.”

Az itt látható képek a 2001. augusztus 11 – szeptember 16. között a székesfehérvári Szent István Király Múzeumban tartott, „*Kivonatok erkölcsi bizonyítványomból*” című kiállításának anyagából származnak, és ismert munkáival párhuzamosan a nyolcvanas évek elején készültek. A tárlat darabjai éppenséggel nem tipikus Konokképek: a kollázstechnikát – tőle szokatlan módon – kifejezetten figurális elemek beépítésére használja, s *homo ludens*ként játszik a tér-forma-szín összhangjával.



Konok Tamás, *Isten ésszel, angyal értelemmel* (1985), karton, kollázs



Konok Tamás, *Szemrevétel* (1985), karton, kollázs

Beszámoló az Európai Kombinatorikus Tudományok Társaságának első kongresszusáról



A kombinatorikus kémiai tudományok európai művelői – mintegy kétéves előkészítő munka után – hivatalosan is megalapították önálló szervezetüket, amelyet 2001-ben *European Society for Combinatorial Science* néven jegyeztettek be. A kombinatorikus kémia

hazai művelőit az a megtiszteltetés érte, hogy az új társaság első hivatalos kongresszusának megszervezésére Furka Árpádot, az ELTE Szerves Kémiai Tanszék professzorát kérték fel. Így kerülhetett megrendezésére 2001. július 1–5. között az EUROCOMBI-1 (*First Symposium of the European Society for Combinatorial Sciences*), amelynek az ELTE TTK új Konferencia Központja adott otthont. A Szervező Bizottság munkájában az egyetemi (ELTE), az akadémiai (MTA Kémiai Kutatóközpont) és az ipari (Chinoin, ComGenex, Richter) kutatóintézetek vezető kombinatorikus szakemberei vettek részt, az ő példamutató összefogásuk tette lehetővé a szimpózium sikeres lebonyolítását.

A kilencvenes évek közepétől – különösen a tengeren túlon – számos konferenciát rendeztek „*combinatorial chemistry, high-throughput screening, molecular diversity, drug discovery*” témakörökben és a rokon területeken, amelyek elsősorban a gomba módra szaporodó kisebb magáncégek és a „*big pharma*” közép- és felsőszintű vezető rétegét célozták meg. Az első jelentősebb európai rendezvényen (a 240 résztvevős CombiChem 2000 konferencián Londonban) is elsősorban a gyógyszeripar képviselői voltak többségben. Bár az ilyen jellegű konferenciáknak nagyon fontos szerepük van, de hiányosságait is látnunk kell. Érthető módon – üzleti, szabadalmi okokból – kevesebb szó esik az alap kutatások legújabb eredményeiről, az új szintetikus, analitikai, biológiai stb. módszerek fejlesztéséről, és az sem mellékes, hogy az igen magas részvételi költségek sok potenciális érdeklődőt

(doktorandusz, posztdoktor, fejlődő országok kutatói stb.) távol tartanak ezektől a rendezvényektől.

A kombinatorikus kémia művelése ma már nem csak a gyógyszeripar kiváltsága. A kombinatorikus módszert, szemléletet sikerrel alkalmazzák számos vegyületcsalád, pl. a növényvédő szerek, szupravezetők, termokróm vegyületek, polimerek vagy katalizátorok kifejlesztésére. A kombinatorikus kémia anyagtudományokra (*materials science*) gyakorolt hatását az amerikai *Science* magazin azzal díjazta, hogy ez a terület felkerült a *Breakthrough of the Year* 1998 tízes listájára.

Mindezeket figyelembe véve az Eurocombi-1 Szervező Bizottsága az alábbi szempontokat igyekezett érvényesíteni. A részvételi díjak megállapításakor arra törekedtünk, hogy minden kategóriában az eddigi hasonló konferenciákhoz képest is a legalacsonyabb árakat tudjuk biztosítani. A hazai résztvevőket még ennél is kedvezőbb elbírálásban részesítettük. Néhány kivételt leszámítva az „egy cég, egy előadás” elvét is sikerrel alkalmaztuk. Elsőként valósítottuk meg, hogy a kombinatorikus kémia két legaktívabb területének (gyógyszerkutatás és anyagtudományok) képviselői egyazon konferencián találkozzanak, lehetőséget kínálva a közvetlen információcserére és a szakma legjobbainak személyes találkozására is.

Az Eurocombi-1 konferenciát kb. 25 országból összesen 343 résztvevő kereste fel. A tudományos előadások mellett a rendezvényhez számos kiállítás is csatlakozott. Az Országos Műszaki Múzeum támogatásával a Harmónia-terem előterében került megrendezésre a „Magyarok a Tudományért” kiállítás, amiért Vámos Erzsébet igazgató asszonyt illeti külön köszönet. Ugyanitt lett kiállítva az első szintézisblokk Furka Árpád laboratóriumából és az eredeti Takátsy Gyula által kifejlesztett 96 lyukú értékelő lemez (*96-well plate*). A Gömbaulában rendezett szakmai kiállításon 10 országból 37 cég állított ki, a résztvevők megtekinthették a legújabb manuális és automata laboratóriumi szintetizátorokat, a kombinált analitikai rendszereket, a vegyülettárak és adatbázisok kezelésére kifejlesztett szoftvereket, a biológiai tesztelésre alkalmas HTS-

készülékeket, hogy csak néhányat említsünk a széles választékból.

A tudományos program összeállítása a Nemzetközi Tudományos Bizottság szakavatott előkészítő munkáját dicséri. Az előadások egy szekcióban a 340 fős színházteremben zajlottak. A rendelkezésre álló korszerű technikára nagy szükség volt, hiszen a 61 előadó nagy része a komputeres kivetítést részesítette előnyben, és az ábrákat igen változatos formában (laptop, CD, ZIP, floppy) hozták magukkal. Az ELTE Oktatástechnikai Csoport és a hallgatókból, doktoranduszokból álló csapat lelkes munkájának köszönhetően az előadások gördülékenyen követték egymást, még a legújabb generációs Macintosh laptop csatlakoztatása sem jelentett akadályt.

Az 5 negyvenperces plenáris előadás (*keynote lecture*) megtartására Furka professzor az adott szakterület reprezentatív képviselőit kérte fel. A neves előadók közül Ivar Ugi (*Technical University of Munich*) a multikomponensű reakciókról tartott előadást; Günther Jung (*University of Tübingen*) új polimer reagensekről és a Fourier-transzformációs tömegspektrometria alkalmazási lehetőségeiről beszélt; Ian Maxwell (*Avantium Technologies BV*) az integrált, nagy hatékonyságú technológiák fejlesztési folyamatokba való beillesztéséről számolt be; Takashi Takahashi (*Tokyo Institute of Technology*) a természetes és mesterséges könyvtárak szintézismódszereit tekintette át; Manfred T. Reetz (*Max-Planck-Institut*) pedig az enantioszelektív enzimek irányított evolúciós átalakíthatóságára mutatott be példákat. További 11 felkért előadó (*invited lecture*) színesítette a palettát: szó esett a szilárd hordozók továbbfejlesztéséről, a Bayer-féle szintonkonceptióról, dinamikus könyvtárakról, kombinatorikus kvantumkémiáról, új polimerek előállításáról, a peptodomimetikum gyógyszerjelöltekről, sőt az újdonságok kereskedelmi értékesítésének lehetőségeiről is. A programot még további 45 húszperces orális előadás, valamint 80 poszter tette teljessé.

A konferencia zárónapján került sor a szponzorok által alapított díjak kiosztására. A Tudományos Bizottság helyzete nem volt irigylésre méltó, mert sok remek előadásból és művészien tervezett poszterekből kellett kiválasztani a néhány szerencsést. A *Chemical Computing Group AG* (Németország) által kiírt *Young Investigator Award* első díját Guido Kirsten (*Max-Planck-Institut*, Németország) a komputeres könyvtártervezés céljaira kifejlesztett

evolúciós algoritmus kidolgozásáért kapta, míg a második díjat Menno Monnee (*Utrecht University*, Hollandia) vehette át szintetikus receptormolekulák split-mix módszerrel történő előállításáért. A *Polymer Laboratories Ltd.* (U.K.) felajánlását, a legjobb poszternek szóló kitüntetését Miriam Royo (*University of Barcelona*, Spanyolország) részére ítélték, akit a guanidinrésztet tartalmazó farmakofor csoportok vizsgálatáért jutalmaztak. A Sigma-Aldrich Kft. különdíjat alapított (elsősorban 35 év alatti) magyar kutatók külföldi tudományos kongresszuson való részvételének támogatására. A három díjból kettővel a tudományos és szervező bizottságok munkában is részt vevő ComGenex Rt. két vezetőjét, Darvas Ferencet és Ürge Lászlót jutalmazták a metaboloma kombinatorikus módszerekkel való kutatása, illetve a reakcióparaméterek predikciója terén elért eredményeikért, a harmadik díjat Kéri György (Simmelweis Egyetem) nyerte el a jelátviteli mechanizmusok fókuszált könyvtárak segítségével végzett tanulmányozására irányuló vizsgálataiért.

Ma már szinte elképzelhetetlen konferenciát rendezni szponzori támogatás nélkül, s az Eurocombi-1 sem kivétel. A szervezők külön köszönik a következő szponzorok nagylelkű támogatását: Accelrys Inc. (U.K.), Asinex Ltd. (Oroszország), BASF (Németország), Bayer (Németország), Bentham Science Publishers (Hollandia), ChemDiv, Inc. (USA), Chemical Computing Group AG (Németország), Chemspeed Ltd. (Svájc), CHIMICAoggi (Olaszország), CombiChemNet (U.K.), ComGenex (Magyarország), Gedeon Richter (Magyarország), Henkel AG (Németország), Morphochem (Németország), Pharmacore Inc. (USA), Polymer Laboratories Ltd. (U.K.), Sigma-Aldrich (Magyarország).

Nem lehet megfedkezni partnerünkről, a Coop-congress Kongresszusszervező Iroda lelkiismeretes munkájáról sem, külön kiemelve a felelős szervező Uttry Borbálát és az irodavezető Vadkerty Editet.

A konferencia programja a nagyszámú előadás miatt igen feszes volt, de így is volt lehetőség élményt adó szociális programokra. A megnyitó ünnepség utáni fogadás a Harmónia-teremben alkalmas adott külföldi vendégeinknek – akik közül számosan először jártak magyar földön – a magyar konyhával és a kiváló minőségű magyar borokkal való bensőséges ismerkedésre. Ezt az élményt erősítette a lajosmizsei záróbankett, amelynek fénypontja a „Puszta ötös” bravúros lovasbemutatója volt.

A *European Society for Combinatorial Sciences* a konferencia alatt tartott ülésén határozott az Eurocombi rendezvények folytatásáról. A 2003-ban sorra kerülő Eurocombi-2 rendezési jogát Koppenhágának ítélték oda. Ezen az ülésen Furka Árpádot, a kombinatorikus kémiában elért eredményeit elismerve, öt

évre a Társaság tiszteletbeli elnökévé választották. Az Eurocombi-1 konferencia információs anyaga részletesen olvasható az alábbi két honlapon:

<http://www.eurocombi.com>

<http://szerves.chem.elte.hu/combchem2001/>

Dibó Gábor

Ismeretek az egyedfejlődésről: a csírasejtektől a programozott sejthalálig

Hoffmann Gyula, Csoknya Mária: FEJLŐDÉSBIOLÓGIA II.

(Könyvismertetés)

Pro Pannonia Kiadó Alapítvány, Pécs, 2000

A biológiai alapismeretek egyre nagyobb szerepet kapnak, nemcsak azokon a területeken, ahol a biológia mint eszköz szerepel, hanem a hétköznapi életben is. Meg kell küzdenünk azokért az ismeretekért, melyek lehetővé teszik, hogy a média által is oly közkedvelt kifejezéseket (klónozás, transzgenikus élőlények) megértsük.

Amikor az ötvenes évek elején Francis Crick, tudós társával James Wattsonnal Cambridge-ben megalakította a már legendás – és azóta is időtálló – kettős spirál elméletét a DNS-ről, senki sem gondolta, milyen nagy távlatok nyílnak meg a biokémiában, a biológiában. Ezt a felfedezést követően a munka természetesen tovább folytatódott (folytatódik), és a mai kor embere már képes arra is, hogy a DNS-molekulán olyan módosításokat vigyen véghez, amelyeket a természet csak évek milliárdjai során tudott végrehajtani.

A Fejlődésbiológia I. című könyv (amely 1997-ben jelent meg a Felsőoktatási Tankönyv- és Könyvtámogatási Pályázatok Kuratóriuma támogatásával, Pro Pannonia Kiadó Alapítvány kiadásában) részletesen leírta a kételtűek, rovarok és az emlősök egyedfejlődését [1], mintegy bemelegítésül szolgálva a II. kötethez (Fejlődésbiológia II., mely az Oktatási Minisztérium és a Felsőoktatási Pályázatok Irodája által nyújtott felsőoktatási tankönyvtámogatással és szintén a Pro Pannonia Kiadó Alapít-



vány kiadásában jelent meg), amely a fejlődésbiológia tudományterületének forradalmát mutatja be. Az igen terjedelmes (702 oldal) könyvet szerzői elsősorban egyetemi tankönyvnek szánták. Megfelelő szakmai előtanulmányokat igénylő nyelvezete miatt én sem ajánlanám azoknak, akik

most szeretnének megismerkedni a sejtbiológiával, illetve a genetikával. Igaz ugyan, hogy a könyv végén találunk egy szöszedetet, amely részletesen kiterjed a fejlődésbiológia tudomány területére eső fogalmak tág körére, s amely nagy segítséget nyújt a könyv megértéséhez, de valószínű, hogy a könyvet olvasva, a laikusnak sokszor hátra kell majd lapoznia. Az olvasó (diák) először megismerkedhet a különböző technikákkal, melyek a gének izolálására, analízisére alkalmasak, majd fokozatosan elmélyülhet a transzgenikus élőlény, a klón, a genom, az epigenetika, a génszabályozás fogalmaiban, míg végül eljut a fejlődési mintaképzésekhez, mely fejezetek során a szerzők, az alapfogalmak részletes ismertetése után különböző törzseken (puhatestűek, rovarok, emlősök) mutatják be a fejlődés során végbemenő biológiai folyamatokat. Itt egyaránt szóba kerül a *Drosophilákra* jellemző különböző tulajdonságok kialakulása, megtudhatjuk például, hogy az

anyai hatású géneknek milyen fontos szerepe van az elülső-hátulsó (antero-poszteriorális) polaritás kialakításában, de arról is szó esik, hogy a „csupahát” és a „csupahas” embriók létrejötténél szintén szerepet játszanak bizonyos anyai gének, hiszen ha ezek bármelyike mutáns, abban az esetben már olyan embriók jönnek létre, amelyeknek D/V aszimmetriája nem alakul ki. A későbbiekben részletesen olvashatunk például az emlősök idegrendszerének fejlődéséről, melynél megtudhatjuk, hogy milyen fontos szerepe van a *slug* génnek, amely szabályozza azt a folyamatot, melyben a nem mozgó epiteliális sejtek vándorló sejtekké válnak. Ezeknél a kicsit nehezebben tanulható fejezeteknél szerencsére sok esetben találkozhatunk olyan magyarázatokkal, amelyek a különböző törzsek bizonyos szerveinek kifejlődését összehasonlítva mutatják be, ezzel felhívva a figyelmet a fejlődésbeli különbségekre is. A szerzők a könyvet stílusosan az öregedés és a halál témakörével zárják, mely fejezetben leírják az öregedés genetikai hátterét, külön kitérve a telomerek szerepére, valamint tárgyalják az emlősök testmérete és maximális életideje közötti összefüggést.

A könyv népszerűségét valószínűleg az is növelni fogja, hogy részletesen beszámol a mára már oly híressé, sőt lassan legendássá váló Dolly birkának, a klónozási kísérlet „végtermékének” létrejöttéről. A könyv nehézségének enyhítéséül a szerzők szerencsére minden fejezetben kitérnek az oda kapco-

lódó és a tanulmányozás során felhasznált kísérleti módszerekre, eredményekre. További könnyítésül szolgál a szorgalmas tanulók számára a sok, viszonylag jól értelmezhető ábra, valamint a jól használható tárgy- és névmutató.

Befejezésül, nemcsak ehhez az igen alapos, a modern kor tudományát részletesen ismertető könyvhöz, hanem inkább a hétköznapi életben manapság oly gyakran felröppenő vitákhoz fűznék egy „apró” tény. Miközben Nagy-Britannia Parlamentje éppen ratifikált egy, az emberi sejtek orvosi célokra történő klónozásáról szóló törvényt [2], az Egyesült Államok képviselőháza az idén elfogadta azt a törvényjavaslatot (The Human Cloning Prohibition Act 2001), amely szövetségi szinten büntetendővé teszi az emberi embriók klónozását [3]. A törvénytervezet az emberi embriók sejtanyag-átültetéssel való előállítását sem új egyedek létrehozása, sem tudományos kutatások céljából nem engedélyezi. A Fehér Ház közleménye szerint [4]: „az emberi klónozás által felvetett súlyos erkölcsi kérdéseket nem lehet figyelmen kívül hagyni a tudományos felfedezések érdekében”.

Irodalomjegyzék

- [1] Hegedűs, Gy. (1999) Az új élet. *Biokémia*, XXIII: 45–46.
- [2] <http://www.globalchange.com/clonenews.htm>
- [3] http://news.bbc.co.uk/1/hi/english/sci/tech/newsid_1298000/1298390.stm
- [4] Anonym. (2001) Az embrióklónozás tilalma. *Élet és Tudomány*, 32: 1019.

Novák Gabriella



X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok

Siófok, 2002. március 27–29.

Kedves Sejtbiológusok és Szimpatizánsok!

A „..... hogy tudjunk egymásról és mások is rólunk” gondolat jegyében rendezzük meg – immáron tizedik alkalommal – a Sejt- és Fejlődésbiológiai Napokat Siófokon, a Magistern Szállodában (8600 Siófok, Beszédes sétány 72.).

Azt szeretnénk, ha a korábbiakhoz hasonlóan mutatnánk be tudományunkat: mely' műhelyekben, milyen témákat, kik és milyen eredménnyel művelnek. A szervezők azt várják, hogy a résztvevők sokan és sok érdekes/értékes „portékát” hoznak a sejtbiológia és a határtudományok rejtelseiből.

Jelentkezési határidő: 2002. január 18.

Részvételi díjak:

- részvételi díj 15.000.-Ft
- PhD-hallgatóknak 13.000.-Ft
- kísérő családtagoknak 14.000.-Ft

A Szervező Bizottság címe: (tudományos információk)

Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet, Dr. Szabad János tanszékvezető egyetemi tanár
6720 Szeged, Somogyi Béla u. 4. Telefon: (62) 545-109 Fax: (62) 545-131 e-mail: szabad@comser.szote.u-szeged.hu
Bővebb információért lásd: <http://www.tiszanet.hu/~congress/2002/sejt2002>

MIKROBIOLÓGIA MESTERFOKON

Mintaelőkészítés



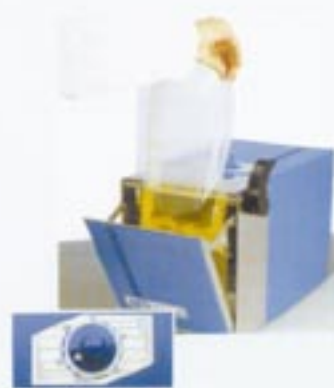
Dilumat 3 mk2

Szilárd minták
automata hígítása



Dilumat 4

Szilárd minták
automata hígítása



MIX 1

Keverő és homogenizáló
készülék

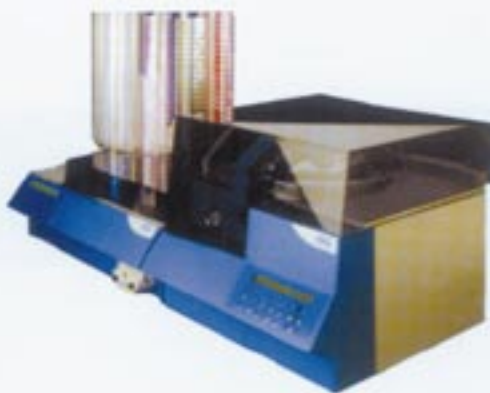
Táptalaj előkészítés

S 8000

Táptalajöntő automata

APS 300

Táptalaj adagoló automata



Csíraszámolás

EC 1

Csíraszámoló automata



NOVO-LAB

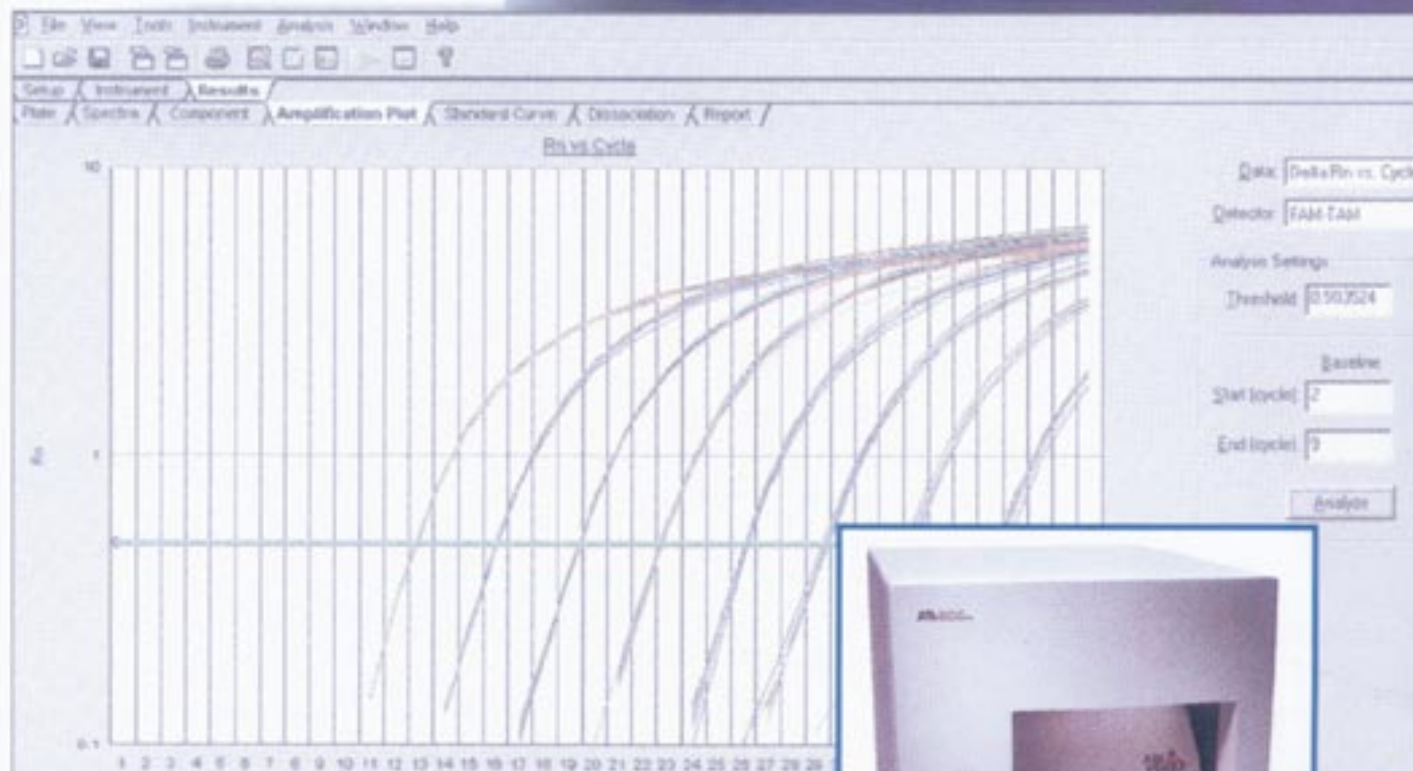


AES
laboratoire

MIKROBIOLÓGIA

1191 Budapest, Üllői út 200. Tel./Fax: 281-3692 Levélcím: 1680 Budapest, Pf.: 21. e-mail: novolab@elender.hu

ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System



AB Applied Biosystems

Science for Life[™]

Applied Biosystems
1135 Budapest, Szegedi út 35-37.
Tel.: 270-8398; Fax: 270-8288
www.appliedbiosystems.com

For Research Use Only
Not for use in diagnostic procedures.

Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a licence. The ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System is an Authorized Thermal Cycler for PCR and may be used with PCR licences available from Applied Biosystems. Its use with Authorized Reagents also provides a limited PCR licence in accordance with the label rights accompanying such reagents. Purchase of this instrument does not convey any right to practice the 5' nuclease assay or any of the other real-time methods covered by patents owned by Roche or Applied Biosystems.