

BIOKÉMIA

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

Szerkesztőbizottság:
BENYHE SÁNDOR, ERDŐDI FERENC, GERGELY PÁL,
HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, NYITRAY LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS,
SÜMEGI BALÁZS, VÁRADI ANDRÁS

Felelős szerkesztő:
SZÉKÁCS ANDRÁS

XXXII. ÉVF. 4. SZÁM

2008. DECEMBER

A tartalomról:

- ◇ Lassan járj, tovább érsz: a sejtosztódás és -differenciáció motorjainak mechanikai szabályozása – Kovács Mihály
- ◇ Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban – Pál Gábor
- ◇ A kecskerák (*Astacus leptodactylus*) tripszínjének esete a szarvasmarha-pankreász tripszíninhibitorával – Gráf László
- ◇ Proteázok és fertőzési folyamatok: egy szerralizin, a PrtA proteolitikus rendszerének szerepe – Venekei István
- ◇ Kétszálú és magányos α -hélixek: két sokoldalú fehérjeszerkezeti elem – Süveges Dániel és Nyitray László
- ◇ MIF: a gyógyszerkutató új korszakának hírnöke – Zahoránszky Gergely, Simon Zoltán, Zhenhui Yang, Hári Péter és Málnási-Csizmadia András
- ◇ Negyvenéves az ELTE Biokémiai Tanszék – Nyitray László
- ◇ A harmadik időszak kezdetén – Székács András
- ◇ Folytatása következik... – Fésüs László és Buday László

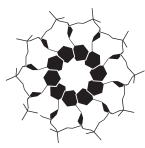
Címlapkép:

Felső panel: Az emberi növekedési hormon elsődleges receptorkötőhelyének (Site-1) vizsgálata fágbemutatással. A növekedési hormont M13 fág felszínén jelenítettük meg. Az összesen 35 aminosavcsoportból álló receptorkötő felszín 6 könyvtárra osztottuk, amelyeket 6 eltérő szín jelöl. Minden könyvtár legfeljebb 6 aminosavcsoportot tartalmaz úgy, hogy az egyes csoportok térben nem szomszédosak. Ez a speciális könyvtártervezés lehetővé tette egy olyan irányított evolúciós rendszer létrehozását, amelyben az egyes csoportok egymástól függetlenül evolválódtak. Így 6 könyvtár szelekciójával sikerült mind a 35 pozícióban feltárunk az adott pozíció aminosav-preferenciáját. Az így létrehozott hatalmas kísérletes adatbázis alapján pontosan meg tudjuk jósolni a kötőhelyet érintő bármely pontmutáció funkcionális hatását (ld. a vonatkozó közleményt a 82–87. oldalakon).

Alsó panel: Motoregységek. Az egyes fehérjekomponensek atomi szerkezeteinek az izom elektrontomográfias képébe illesztésével készített modell (PDB-kód: 1MVW) az aktinfilamentumhoz (zöld) kötött miozinféjek (kék, piros, lila) szerkezeti heterogenitását mutatja, amely az erőként működő nyaki régió orientációjában is megnyilvánul. (ld. a vonatkozó közleményt a 92–94. oldalakon). Háttérkép: A Biokémiai Tanszéknek is helyet adó ELTE TTK Lágymányosi Campus déli épülete.

Contents:

- ◇ Slowly but steadily: mechanoregulation of motors of cell division and differentiation – Mihály Kovács
- ◇ Competition of billions: directed evolution in protein science – Gábor Pál
- ◇ The affair of crayfish trypsin with bovine pancreatic trypsin inhibitor – László Gráf
- ◇ Proteases and infection processes: the role of the proteolytic system of the serralysin-type PrtA enzyme – István Venekei
- ◇ Two stranded and lone α -helices: two versatile protein structural motifs – Dániel Süveges and László Nyitray
- ◇ MIF: a new wave in drug discovery – Gergely Zahoránszky, Zoltán Simon, Zhenhui Yang, Péter Hári and András Málnási-Csizmadia
- ◇ The 40th anniversary of the Department of Biochemistry at ELTE – László Nyitray
- ◇ Launch of the third era – András Székács
- ◇ To be continued... – László Fésüs and László Buday



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6
e-mail: biokemia@nki.hu <http://www.mbkegy.hu/htmls/biokemf.html>

Felelős kiadó: Dr. Fésüs László

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: 850 Ft + postaköltség



Lassan járj, tovább érsz: a sejtosztódás és -differentiáció motorjainak mechanikai szabályozása

Slowly but steadily: mechanoregulation of motors of cell division and differentiation

Kovács Mihály

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: kovacsm@elte.hu, web: <http://www.mk-lab.org>

Összefoglalás

A minden állati sejtben jelen lévő nem izom miozin-2 (NM2) motorok a sejtosztódás, -mozgás és -differentiáció folyamataiban játszanak nélkülözhetetlen szerepet. Felderítettük, hogy e motorok hosszú távú sejtbeli erő kifejtésre és erő tartásra specializálódtak, amely működés a vázizommiozinokétól drasztikusan eltérő biokémiai és mechanikai sajátosságok következménye. Az NM2 enzim működésének és mozgatóképességének (motilitásának) analizálásával azt is megmutattuk, hogy a humán NM2 izoformák – sejtbeli funkcióiknak megfelelően – eltérő motilitási típusokat tesznek lehetővé: az NM2A inkább aktív kontrakcióra, míg az NM2B inkább energiahatékony erő tartásra képes. Kiemelkedő élettani jelentőségén túl az NM2 ideális kísérleti objektum egy új áttörésekkel kecsegtető tudományterület, a mechano-biokémia számára is, amely többek között a külső erők enzim működésre gyakorolt hatásait vizsgálja.

Kovács, M.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: kovacsm@elte.hu

Summary

Non-muscle myosin-2 (NM2) isoforms are ubiquitously expressed in animal tissues and play essential roles in cell division, migration and differentiation. We have shown that NM2 exhibits functional adaptations to prolonged force generation and maintenance. Accordingly, the biochemical and mechanical properties of NM2 drastically differ from those of skeletal muscle myosins. By analyzing their enzyme kinetic and motile properties, we have shown that, according to their physiological roles, human NM2 isoforms can perform different types of motility: NM2A is more suited for active contraction, whereas NM2B is suited for sustained tension maintenance. Beyond its prominent physiological roles, NM2's biochemical properties make it an excellent system for studies in mechano-biochemistry, a promising field investigating the effect of mechanical forces on enzyme function.

A miozinok funkcionális diverzitása

Az aktomiozin-mozgatórendszer a sejt váz fontos elemeként valamennyi eukarióta sejtben jelen van. A miozinmotorok aktinfilamentumokon történő mozgása a hajtóereje a különböző izmok összehúzó-dásán kívül például a sejtosztódás során a leánysejtek szétválásának, az exo- és endocitózisnak, a sejt-szervecskéik transzportjának és az amőboid sejtmozgásnak. Ehhez az aktív mozgáshoz a miozin az adenozin-trifoszfát (ATP) hidrolíziséből származó szabad energiát hasznosítja. Jóllehet a miozin ATPáz működésének és erőgenerálásának számos lényegi mozzanata – Szent-Györgyi Albert és kutatócsoportja alapvető felfedezéseire építve – a múlt század végére leírásra került, az erőgeneráló lépésnek a

kemomechanikai ciklusban elfoglalt helyével és az aktomiozin-kölcsönhatással kapcsolatban számos kérdőjel maradt. Emellett az utóbbi két évtizedben nagyszámú, szerkezeti és funkcionális sokféleséget mutató miozinosztály és -izoforma létére derült fény. Ezek az ismeretek két szempontból is alapvetően befolyásolják a tudományterület további irányvonalait: 1) Az új miozinok közül számos izoforma rendelkezik (vagy rendelkezhet) olyan biokémiai és szerkezeti sajátosságokkal, amelyek lehetővé teszik a kemomechanikai energiaátalakítás máig ismeretlen, az izommiozinokon nehezen vizsgálható aspektusainak felderítését; 2) Az új miozinok az eddig leírt motilitási mechanizmusoktól jelentősen eltérő módon fejthetik ki aktivitásukat, és ezeknek az eddig ismeretlen motilitási típusoknak – a miozinok széles

körü biológiai funkciói révén – fontos élettani, orvosbiológiai és biotechnológiai szerepe lehet.

A diverzitás mint a biológia egyik alapvető aspektusa, a motorenzim működési sajátosságainak sokféleségében is megmutatkozik [1]. A vázizom miozin-2 fehérjének, amely a – több száz molekulából felépülő – vastag filamentum részeként fejt ki működését, és gyors izom-összehúzódást produkál, alapvetően más mechanikai teljesítményre és ehhez szorosan kapcsolt enzimkinetikai mechanizmusra van szüksége, mint például a miozin-5 alának, amely egyedi molekulaként lépeget az aktinszálon, és vezikulumok transzportját végzi. Ezt a funkcionális diverzitást eltérő enzimmechanizmusok teszik lehetővé, amelyek közül számosat részletesen jellemeztünk [2-7].

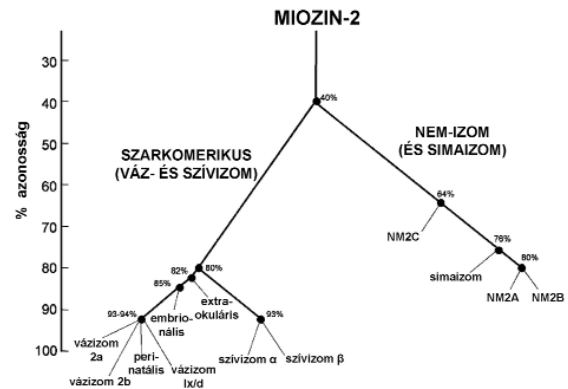
Az NM2 motorok hosszú távú, alacsony energiaigényű erő kifejtésre szakosodtak

Az NM2 az izommiozin-2 fehérjéhez hasonlóan kétféjű, filamentumokat képező miozin. Az izom vastag filamentumaival ellentétben azonban az NM2 mindössze kb. 30 molekulából álló minifilamentumokat képez (1. ábra), amelyek valamennyi állati sejttípusban jelen vannak, és központi szerepet játszanak a citokinézisben, az amőboid sejtvándorlásban, valamint a sejtek és szövetek alakjának fenntartásában [8]. A legtöbb alacsonyabb rendű szervezet egyetlen NM2-izoformával rendelkezik, míg emlősökben három különböző NM2 (A, B és C) izoenzim található, amelyek a simaizom-miozinnal mutatnak evolúciós rokonságot (2. ábra).

Élettani szerepükből adódóan az NM2-izoformáknak a gyors kontrakció helyett lassabb sejtbeli mozgások végrehajtására specializálódott mecanoenzimikus működési paraméterekkel kell rendelkezniük. Részletes állandósult állapotú és tranziens enzimkinetikai mérésorozatokban, valamint fénymikroszkópos aktinmozgató kísérletekben megvizsgáltuk e miozinok enzimkinetikai sajátosságait és mozgatóképességét (motilitását). Azt találtuk, hogy a két



1. ábra Az NM2-minifilamentum szerkezete [26].



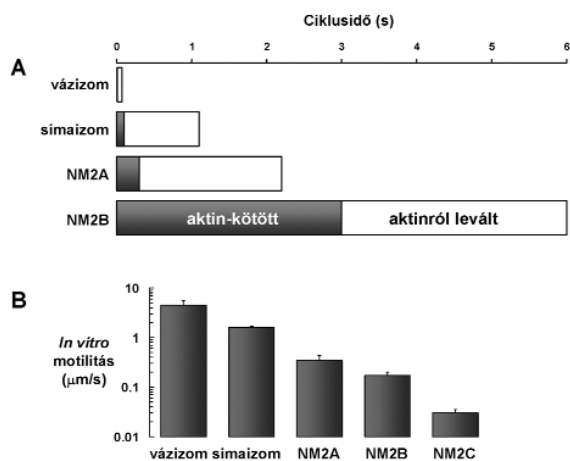
2. ábra Humán miozin-2-izoformák törzsfája [25].

korábban ismert humán NM2-izoforma (NM2A és NM2B) mind a vázizom-, mind a simaizom-miozinoknál sokkal lassabban működő motor (3. ábra) [3,4]. A terhelési arány (*duty ratio*) kifejezi, hogy az állandósult állapotú működés során a miozinfaj az enzim ciklusidő mekkora hányadát tölti aktinhez kötött, teherterő állapotban [1], ami az adott miozin-izoforma részletes kinetikai sajátosságainak ismeretében kiszámítható. Érdekes módon az NM2A az izommiozinokéhoz hasonló alacsony terhelési arányt (kb. 10%) mutat, míg az NM2B (amely még az NM2A fehérjénél is hosszabb ATPáz ciklusidejű) terhelési aránya magas (50%), motilitása pedig lassú (3. ábra). Ezek a sajátosságok azt sugallják, hogy az NM2B elsősorban hosszú távú erőtartásra specializálódott.

Enzimológiai és motilitási jellemzéseink látványos összhangban voltak későbbi munkákkal, amelyek azt mutatták meg, hogy különböző élettani folyamatokban (például idegszövet-regeneráció, simaizom-kontrakció) az NM2A mindig a gyorsabb kontrakciót igénylő feladatot végzi, míg az NM2B feladata az erőtartás [9-12]. Élettani munkákból arra is fény derült, hogy a simaizom-kontrakcióhoz



Kovács Mihály az Eötvös Loránd Tudományegyetemen szerzett biológusdiplomát 1998-ban. Tanulmányait az ELTE-n és a Leicesteri Egyetemen folytatta, 2002-ben kapott PhD-fokozatot. Ezután három évig az egyesült államokbeli *National Institutes of Health* intézményben dolgozott posztdoktorként. 2005-ben tért vissza az ELTE Biokémiai Tanszékére, ahol a motorenzimológiai kutatócsoportot vezeti (<http://www.mk-lab.org>). A 2008. évi Talentum-díj nyertese az élettudományi kategóriában. Fő érdeklődési területe különböző biológiai motorok (aktomiozinrendszerek, DNS-helikázok) működési és szabályozási mechanizmusainak, valamint mechanikai erők enzim működésére gyakorolt hatásainak vizsgálata.



3. ábra A miozin-2-enzimkinetika és -motilitás diverzitása. A: Miozin-izoenzimek enzimatis ciklusidejének összehasonlítása, az aktinhoz kötött (szürke) és aktinról levált (fehér) állapotokban töltött időhányad feltüntetésével. B: Miozin-2-izoenzimek in vitro aktinmozgató sebessége [3,4,20].

az NM2-izofomák gyakran dominánsan hozzájárulnak [9,13]. A húgyhólyag simaizom-falában például, ahol aktív kontrakcióra van szükség, elsősorban NM2A található, míg az aorta sima izmában, ahol a passzív erőtartás az elsődleges funkció, az NM2B van jelen nagyobb mennyiségben [9].

Mechanikai szabályozás: az NM2 kontraktilis és teher tartó üzemmódok közötti váltásra képes

A mechanobiokémia fontosságát egyre több megfigyelés jelzi, amelyek azt igazolják, hogy külső erőhatások egyes enzimek specifikus konformációváltozásait idézik elő, és így a biokémiai folyamatok rövid és hosszú távú szabályozásához járulnak hozzá [14,15]. Szerepéből és biokémiai sajátságából adódóan a miozin (különösen az NM2) az egyik legalkalmasabb kísérleti rendszer mechanobiokémiai effektusok vizsgálatára [16].

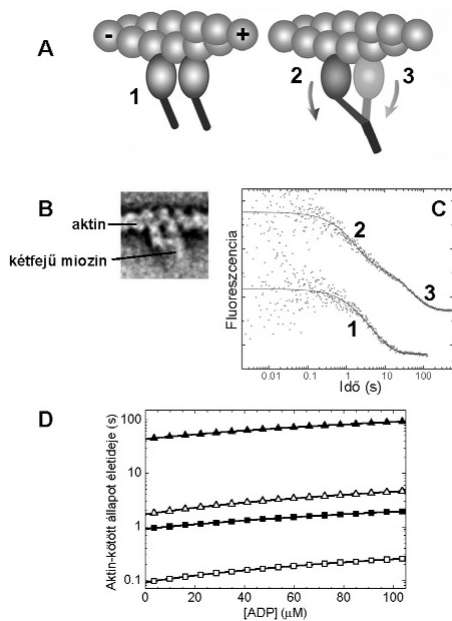
Az erő tartó szerep alapján sejtettük, hogy az NM2 működésének erősen terhelésfüggőnek kell lennie. Korábbi eredményekre építve kidolgoztunk egy olyan eljárást, amelynek segítségével a nukleotidkötés és az ADP-felszabadulás, az ATPáz-ciklus két kulcs lépése mechanikailag terhelt állapotban is vizsgálható oldatbeli körülmények között (4. ábra) [17]. Kiderítettük, hogy az NM2 állandósult állapotú kontrakciós ciklusának végén az ATP-hidrolízis termék ADP távozása a legfontosabb kinetikai „kapu”, amely meghatározza az NM2 erős aktin-

kötő, azaz teher tartó állapotának életidejét. Ennek alapja az, hogy az ADP-kötött teher tartó állapotból való kilépéshez az ADP-nek először el kell távoznia a miozin aktív helyéről, hogy helyére ATP-molekula kötődhessen, amely az aktomiozin komplex disszociációját okozva új kontrakciós ciklust indít el.

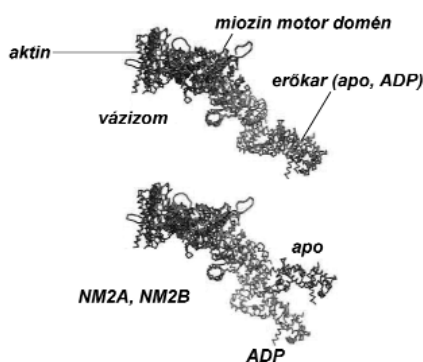
Adataink azt mutatták, hogy az ADP-felszabadulás kinetikája erősen terhelésfüggő (NM2B esetén még kifejezettebben, mint NM2A esetében), és ez a tulajdonság ellenirányú (a miozin mozgási irányával ellentétes) erő esetén az ATPáz-ciklus drasztikus lelassulását, illetve a terhelési arány növekedését okozza [17]. Az NM2 nagy ADP-affinitása révén az ADP által okozott termékgátlás is hozzájárul a teher tartó működéshez (4. ábra). Ez a mechanikai szabályozó funkció lehetővé teszi, hogy ellenirányú terhelés esetén az NM2 az aktinkötött teher tartó állapot életidejének igen jelentős megnövelésével (amely ebben az állapotban több perccel is elérhető) rendkívül energiatékony módon (alacsony ATPáz-aktivitás mellett) hosszú távú erő tartásra legyen képes. Ugyanezen jelenség azt is biztosítja, hogy asszisztáló (a miozin mozgási irányával megegyező irányú) erő hatás esetén az NM2-izofomák ATPáz-ciklusa felgyorsuljon, és terhelési aránya csökkenjen, így elkerülve azt, hogy a miozinok a gyorsabban mozgó motorok (például simaizom-miozin) által hajtott kontrakciót fékezzék.

Az ADP-felszabadulás terhelésfüggéséből arra is következtettünk, hogy az ADP-kötött és -mentes formák közötti átmenet során erő karmozgásnak kell történnie. Ezt a feltételezést alátámasztotta egy másik munkánk, amelyben kisszögű röntgenszórás-kísérletekben az NM2-izofomák minden eddig vizsgált miozinnál nagyobb (közel 5 nm méretű) erő karmozgást mutattak az ADP-felszabaduláshoz kapcsolatosan (5. ábra) [18]. Ez összhangban áll kinetikai és energetikai adataink alapján végzett számításainkkal is [17]. Jelenleg a korábban kidolgozott kinetikai mérési eljárás alkalmazásával vizsgáljuk, hogy a mechanikai terhelés hogyan változtatja meg az NM2 és más enzimek reakcióinak termodinamikai jellemzőit [19].

Számos, emberben előforduló NM2-mutáció súlyos betegséget (May-Hegglin-anómia, sükettség) okoz [8]. Mutáns miozinok enzimológiájának és motilitásának jellemzésével kimutattuk, hogy e mutációk az aktinaktiválás, a fehérjék stabilitásának megváltozása, az erő karműködés és így a motilitás akadályozása révén fejtik ki hatásukat [20].



4. ábra Az NM2-enzimkinetika terhelésfüggése. A: Egyfejű miozinkonstrukció (1) esetén a szomszédos aktinmonomerekhez kapcsolódó miozinféjek nyaki végei egymástól több nm távolságra helyezkednek el. Amikor egy kétféjű miozinkonstrukció mindkét fejével (2,3) aktinhoz köt, a fejekben különböző irányú mechanikai feszültségek jönnek létre. A „2” jelű fejre az aktin-filamentum „+” vége felé irányuló, asszisztáló erő hat, míg a „3” jelű fejre a „-” vég felé irányuló, ellenálló erő hat (nyilak). B: A kétféjű aktinkötött NM2 elektronmikroszkópos képe. C: Fluoreszcens mant-ADP-ligandum NM2B-fejekről történő disszociációjának tranziensei mechanikailag terheletlen (1) és terhelt (2,3) állapotokban (stopped-flow kísérlet). D: A miozinféjek aktinkötésének élettideje állandósult állapotú kontrakció során (üres jelek: NM2A, sötét jelek: NM2B, négyzet: 2 pN asszisztáló erő, háromszög: 2 pN ellenálló erő esetén) [17,23].



5. ábra Aktinkötött miozin-2-fejek kisszögű röntgenszórással és fehérjekristályszerkezet-dokkolással megállapított szerkezete nukleotidmentes (apo) és ADP-kötött állapotban [18]. A vázizom miozin-2 fehérjével (fent) ellentétben az NM2 (lent) jelentős (5 nm) erőkarlemozdulást mutat ADP-kötés hatására.

Az NM2 működése a simaizom-miozin-2 fehérjéhez hasonlóan a nyaki régió foszforilációja révén szabá-

lyozódik [21]. A kétféjű, defoszforilált miozin aszimmetrikus szerkezetet vesz fel, amelyben a két fej kölcsönösen akadályozza egymás ATP-áz és mozgató aktivitását [22]. A gátolt állapot biokémiai sajátosságai azonban jórészt ismeretlenek. Kimutattuk, hogy a blokkolt állapot csak ATP jelenlétében jön létre, más nukleotidállapotokban nem [23]. Jelenleg folyó munkáinkban jellemezni kívánjuk, hogy a gátolt állapot milyen aktinkötő sajátosságokkal rendelkezik, és részt tud-e venni az erőtartásban. Ezzel a simaizom-életlen egyik legfontosabb jelenlegi kérdését célozzuk meg, mivel az inaktív erőtartó molekula mibenléte és állapota ismeretlen. Munkáink között szerepel továbbá az NM2-működés erőfüggésének vizsgálata lézercsapda-kísérletekkel [24], valamint a nemrég felfedezett, a hallás folyamataiban szerepet játszó NM2C-izoforma működésének felderítése [25].

Irodalomjegyzék

- [1] De La Cruz, E. M., Ostap, E. M. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**: 61–67.
- [2] Kovacs, M., Wang, F., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 15071–15083.
- [3] Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 27439–27448.
- [4] Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 38132–38140.
- [5] Toth, J., Kovacs, M., Wang, F., Nyitrai, L., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 30594–30603.
- [6] Yang, Y., Kovacs, M., Xu, Q., Anderson, J. B., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 32061–32068.
- [7] Yang, Y., Kovacs, M., Sakamoto, T., Zhang, F., Kiehart, D. P., Sellers, J. R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 5746–5751.
- [8] Sellers, J. R. (1999) *Myosins*. Oxford University Press, New York.
- [9] Rhee, A. Y., Ogun, O., Brozovich, F. V. (2006) *Pflugers Arch.*, **452**: 766–774.
- [10] Wylie, S. R., Wu, P. J., Patel, H., Chantler, P. D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 12967–12972.
- [11] Wylie, S. R., Chantler, P. D. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**: 88–92.
- [12] Wylie, S. R., Chantler, P. D. (2003) Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol. Biol. Cell*, **14**: 4654–4666.
- [13] Morano, I., Chai, G. X., Baltas, L. G., Lamounier-Zepter, V., Lutsch, G., Kott, M., Haase, H., Bader, M. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**: 371–375.
- [14] Johnson, C. P., Tang, H. Y., Carag, C., Speicher, D. W., Discher, D. E. (2007) *Science*, **317**: 663–666.
- [15] Epstein, N. D., Davis, J. S. (2003) *Cell*, **112**: 147–150.
- [16] Howard, J. (2001) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton* (Sinauer Associates, Sunderland, MA., USA).
- [17] Kovacs, M., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 9994–9999.
- [18] Iwamoto, H., Oiwa, K., Kovacs, M., Sellers, J. R., Suzuki, T., Wakayama, J., Tamura, T., Yagi, N., Fujisawa, T. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**: 249–264.
- [19] Sarlos, K., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R., Kovacs, M. (2007) *J. Muscle Res. Motil.*, **28**: 429.
- [20] Kim, K. Y., Kovacs, M., Kawamoto, S., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 22769–22775.
- [21] Sellers, J. R., Pato, M. D., Adelstein, R. S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**: 13137–13142.
- [22] Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K. M., Taylor, K. A. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**: 1385–1390.
- [23] Kovacs, M., Toth, J., Nyitrai, L., Sellers, J. R. (2004) *Biochemistry*, **43**: 4219–4226.
- [24] Veigel, C., Schmitz, S., Takagi, Y., Kovacs, M., Sellers, J. R. (2008) *Meeting Biophys. Soc.* accepted.
- [25] Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**: 2800–2808.

Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban

Competition of billions: directed evolution in protein science

Pál Gábor

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: palgabor@elte.hu

Összefoglalás

Az élet molekuláris szintű folyamatainak megértéséhez, részletesen ismerni kell a részt vevő fehérjéket, és atomi szinten kell feltárni, hogy a fehérjék mely részletei, milyen kölcsönhatásokban, miként teszik lehetővé az adott szerep ellátását. A megértésnek ilyen atomi szintű igénye hatja át a fehérjetudomány művelőit, akik DNS-technológiákkal felvértezve célzottan változtatják meg a fehérjéket, majd nagy felbontású szerkezetvizsgáló és egyéb módszerek birtokában elemzik a módosítások szerkezeti és működésbeli következményeit. Habár a fehérjemérnökség idestova húsz éve alatt hatalmas eredmények születtek, az egyedi mutációkra alapozó haladás módfelett lassú. Saját munkákon keresztül azt mutatjuk be, miként lehet alapvető fehérjemérnöki kérdéseket hatékonyabban megválaszolni fehérjevariánsok milliárdjainak irányított evolúciójával.

Pál, G.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, Hungary, E-mail: palgabor@elte.hu

Summary

To understand the mechanisms of key role protein life-processes, we need to identify the participating proteins, dissect the molecular interactions and reveal in atomic details how individual protein residues contribute to the function. Comprehension at such atomic details drives the protein scientists. Armed with DNA technologies these researches make targeted alterations in proteins and study the structural and functional consequences by high resolution techniques. Although protein science has delivered great achievements in the last 20 years, the progress based on individual mutations is rather slow. In this article I review some of our recent works to illustrate how fundamental questions in protein science can be answered through the directed evolution of billions of protein variants.

A klasszikus fehérjemérnöki megközelítés lehetőségei és korlátai

A pusztán megfigyelést leszámítva minden vizsgálatban szándékosan megzavarjuk a vizsgált rendszert, megfigyeljük, hogyan reagál. A fehérjék esetében kezdetben csak az oldatkörnyezetet (hőmérséklet, ionerő, kémhatás) lehetett változtatni, így például oldallánc-töltések szerepére következtetni. Később a szelektív kémiai módosítások számos aminosavtípus szerepét tették vizsgálhatóvá. Kivételes esetekben a kémiai módosítás célzott aminosavcserét is lehetővé tett [1]. Az áttörést a molekuláris biológia hozta: lehetővé vált a fehérjégek klónozása és irányított mutagenézise [2,3], a fehérjék aminosav-sorrendje ma már tetszés szerint változtatható.

Ez határtalannak tűnő szabadságot, de egyben meglepő korlátokat hozott. Kiderült, hogy esély sincs a

teljes szekvenciateret bejárni, mivel az praktikusán végtelen. Egy 60 aminosavas kis fehérje esetén a lehetséges egyedi aminosavcserék száma 1140. Ennyi mutáns génre, tisztított fehérjevariánsra és egyedi mérésre lenne szükség ahhoz, hogy feltárjuk egy ilyen fehérje összes pozíciójának egyedi szerepét és evolúciós lehetőségeit. Természetesen soha senki nem végzett ilyen teljes vizsgálatot. Ráadásul, ha nem egyedi, hanem kombinált mutációkban gondolkodunk, akkor a variánsok száma exponenciálisan növekszik. Egy 60 aminosavas polipeptid összes variánsának száma 20^{60} , ami több, mint a ma ismert univerzumban létező összes elemi részecske. A szekvenciater a maga teljességében tehát nem feltárható. Emiatt a kísérletekben mindig komoly kérdés, mely pozíciók hányféle variánsa készüljön el. A vizsgálatok rendszerint korábbi ismeretek alapján fontosnak ítélt pozíciókra összpontosulnak, ismeretlen

területeket ritkán vizsgálnak. Ez a megközelítés talán érthető, de súlyos előítéletektől terhelt.

A kutatók elsőként egyszerűnek ígérkező vizsgálatokat hajtottak végre: egy-egy enzim aktív helyén cseréltek le olyan oldalláncokat, amelyeket más vizsgálatok már kulcsfontosságúnak jósoltak. A nyolcvanas években ilyen vizsgálatok indultak el a tRNS szintetázok, szubtilizin, foszfofruktokináz, lizozim, RN-áz és a tripszin esetében, mely utóbbi-ba az ELTE Biokémiai Tanszék is bekapcsolódott Gráf László vezetésével [4-9]. A már eleve fontosnak vélt pozíciók mutációi azt sugallták, hogy a fehérjékben „minden mindennel összefügg”, alig akad funkcionálisan semleges mutáció.

Szisztematikus fehérjemérnöki vizsgálatok – a pásztázó alanin-mutagenézis

James Wells, a Genentech cég kutatója, bevezette az első szisztematikus mutagenézis-eljárást, a pásztázó alaninmutagenézist (*alanine scanning mutagenesis*) [10]: egyenként alaninra cserélve a vizsgált oldalláncokat megmérték a mutáció hatását. Az alanin a glicin után a legkisebb aminosav, de szemben a glicinnel, nem növeli lényegesen a főlánc konformációs szabadságát. Egy alanincseré 18 aminosav esetében a β -szélen kívüli részlet eltávolítását jelenti, így az eltávolított rész szerepét vizsgáljuk.

Elsőként az emberi növekedési hormon (hGH) nagy affinitású (*Site 1*) receptorkötő felszínének összes, 35 csoportját vizsgálták. Ezt, az ezzel kölcsönható hGH-receptor (hGHR) hasonló méretű hormonkötő felszíne követte [11,12]. E hatalmas munkákban együttesen több mint hatvan egyedi alaninvariánst termeltek, izoláltak és jellemezték kötési tesztekben. Munkájuk gyümölcse az a nagy visszhangot kiváltó felismerés volt, miszerint a térben szorosan illeszkedő két felismerőhely oldalláncainak csak negyede járul hozzá produktívan a kötéshez. A többi alanin cseréjének nincs érdemi hatása. A pozíciónkénti

kötésienergia-hozzájárulásokat a kötőfelszínre vetítve két kisméretű, egymással komplementer „forró folt” (*hotspot*) képe jelent meg. Azóta számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban találtak ilyen koncentrált kötési energiát. Egyik munkám során, amikor a Chicagói Egyetem Tony Kossiakoff által vezetett intézetében a jeltovábbítás során kialakuló 1:2 összetételű hGH:(hGHR)₂ hormon-receptor komplexet vizsgáltuk, ilyen komplementer forró foltokat fedeztünk fel a két receptor közötti interakciós felszínen is [13]. A korábbi kép szertefoszlott, kiderült, hogy még olyan aminosavak is megváltoztathatók funkcióromlás nélkül, amelyek szerkezeti értelemben egy interakciós hely részét képezik.

A páros oldallánc-kölcsönhatások vizsgálatának páratlan nehézsége

Egyedi mutációkkal csak egyedi oldallánc-hozzájárulások vizsgálhatók, oldallánc-kölcsönhatások nem. Enzimek esetében jól ismert az együttműködő oldalláncok kiemelkedő szerepe. Páros oldallánc-kölcsönhatások vizsgálatára vezették be a dupla mutációs ciklus (*double mutation cycle*) eljárást [14]. Ha két oldallánc egymástól függetlenül működik, úgy egyedi mutációjuk hatásának összege megegyezik a dupla mutánsra kapott hatás értékével. Ha a dupla mutáció hatása kisebb vagy nagyobb az egyediek összegénél, úgy a két oldallánc funkcionális kapcsolatban áll. A hGH kapcsán belátható, hogy a páros variánsokat igénylő projekt kivitelezhetetlen lenne, hiszen a 35 egyedi alaninmutáns mellett még 595 (35x34/2) páros alaninmutáns előállítását és mérését igényelné.

Fehérjemérnöki taposómalom – mire elég a tudásunk?

A klasszikus kutatások további korlátja a vizsgálatok iteratív, ciklikus jellegéből fakad. Korábbi ismeretek alapján hipotézist állítunk fel egy-egy fehérjerészlet



Pál Gábor 1990-ben, az ELTE TTK biológus szakán végzett okleveles biológusként. Azóta az ELTE TTK Biokémiai Tanszékén dolgozik, 2003-tól egyetemi docens. PhD-fokozatát az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában szerezte 1996-ban. 1998-tól négy és fél évig posztdoktori ösztöndíjasként egyesült államokbeli tanulmányúton volt, mely során a kaliforniai Genentech cégnél és a Chicagói Egyetemen dolgozott. Amerikai munkája során az emberi növekedési hormon és receptora között kialakuló molekuláris felismerések energetikáját kutatta klasszikus fehérjemérnöki és irányított evolúciós megközelítésekkel. Hazatérte után az általa alapított Irányított Fehérjeevolúció Kutatócsoportban is

bevezette a fágbemutatásnak nevezett evolúciós eljárást. A csoportban olyan fehérje-kölcsönhatások mechanizmusát kutatják, amelyek egyrészt alapkutatói szempontból érdekesek, másrészt terápiás alkalmazási szempontból ígéretesek.

szerepéről, egyedi mutációval megváltoztatjuk azt, majd új szerkezeti-funkcionális vizsgálatokat követően elemezzük a hipotézis helyességét, és ha kell, újabb hipotézist alkotunk. Általában nagyszámú ilyen ciklus szükséges még jól célzott kérdések megválaszolásához is. Nem meglepő, hogy az utóbbi évtizedek intenzív kutatásai ellenére is korlátozottak a fehérjeműködéssel kapcsolatos ismereteink. Ennek illusztrálására és egy alternatív megoldás bemutatása céljából végezzünk el egy rövid gondolat kísérletet.

A szakavatott biokémikus olvasó egy pillanatra képzelje el, hogy szervezetét veszélyes kórokozó támadja meg, amelynek egy kulcsfontosságú felszíni molekuláját kellene szelektíven blokkolni ahhoz, hogy a kórokozó el ne szaporodjon. Vajon elegendő tudás áll-e az olvasó rendelkezésére ahhoz, hogy a klasszikus fehérjemérnöki fegyvertár összes elemét bevetve egy-két hét leforgása alatt kifejlesszen egy szelektív kötésre képes fehérjét? A válasz minden bizonnyal nem. Ugyanakkor tudjuk, hogy immunrendszerünk rutinszerűen, nap mint nap megbirkózik ugyanezzel a feladattal, pár hét alatt csodálatos blokkoló fehérjéket kifejlesztve gyakorlatilag bármilyen idegen molekula ellen. Csakhogy az immunrendszer nem az emlegetett séma szerint működik. Egyenkénti mutációkon alapuló, iteratív fejlesztés helyett az immunrendszer a blokkoló fehérje, vagyis az ellenanyag-molekula mintegy 100 milliárdnyi variáns seregével „fogadja” a betolakodót. Minden variáns más-más B-sejt-klón felszínén jelenik meg receptorként, és azok a klónok szaporodnak el, amelyek hatékonyan kötődnek az idegen fehérjéhez. A szelektív kötésre képes fehérje tehát egy hatalmas variánsseregből, evolúciós folyamatban szelektálódik. Ennek a sémának az analógiájaként vezette be George P. Smith a fágbemutatás (*phage display*) néven ismertté vált eljárást, amely lehetővé teszi fehérjék irányított *in vitro* evolúcióját [15].

A legeredményesebb *in vitro* evolúciós megközelítés – a fágbemutatás

A fágbemutatás (1. ábra) során az evolúcióba bevont fehérje génjét egy bakteriofág burokkészletéhez kapcsoljuk. Így olyan fúziós fehérje keletkezik, amely beépül a fág burkába. A fág részecske a belsejében hordozza az idegen fehérje génjét, miközben a külsején megjeleníti az idegen fehérjét. A fehérje és annak génje a fágon keresztül fizikailag kapcsolódik.

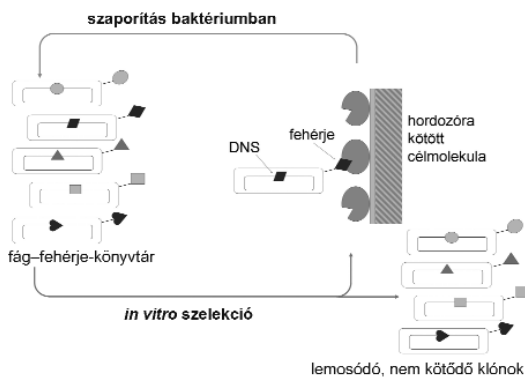
A fehérje irányított evolúciójához a gén általunk pontosan megszabott kodonjait változtatjuk meg. Egyszerre számos kodont is megváltoztathatunk szintetikus oligonukleotidok keverékén alapuló kombinatorikus mutagenézissel [16]. Egyszerre szabjuk meg a mutációk helyét és a pozíciókenti variabilitást. Több milliárd variánst tartalmazó DNS-könyvtárat hozunk létre, amelyet baktériumokba juttatva létrejön a fág-fehérje könyvtár. Minden fág csak egyfajta fehérjevariánst jelenít meg, és csak annak a génjét hordozza. Így egy, a B-sejtekkel szoros analógiát mutató rendszer jön létre. A fágbemutatás azonban számos komoly előnnyel bír: a könyvtár variabilitását kizárólag a kutató határozza meg, nem valamilyen bonyolult sejtfüggő mechanizmus; a variánsok száma lényegesen meghaladhatja a B-sejteken megjelenő ellenanyagokét; bármilyen baktériumban termelhető fehérjével dolgozhatunk; és végül a szelekció is a kutató által kontrollált, *in vitro* módszerekkel zajlik.

Az evolúció során mutánsok egyenkénti vizsgálata helyett több milliárd kísérletet végzünk párhuzamosan. A megfelelőnek bizonyult fág-fehérje variánsokat a fizikailag kapcsolt gén szekvenálásával azonosítjuk. Egyedi mérések helyett a funkciószelektált klónok szekvenációanalízisével derítjük ki, hogy a funkció ellátását milyen aminosavsorrendek teszik lehetővé.

Mutánsok milliárdjaival dolgozunk, ami az egyedi mutációkhoz képest hatalmas szám. Mégis okosan kell gazdálkodnunk a könyvtár tervezésekor. Mint láttuk, egész fehérjék teljes variálása nem lehetséges. Az oszd meg és uralkodj elvét kell alkalmaznunk. Ha egyszerre sok pozíciót akarunk vizsgálni, akkor a szekvenciateret osztjuk csoportokra, tehát a 20 féle aminosav helyett csak egy kis hányadot engedünk meg, szélsőséges esetben például csak kettőt. Ha viszont mind a 20 féle aminosavat meg akarjuk engedni, akkor valamilyen átgondolt elv alapján a fehérjepozíciókat osztjuk fel csoportokra. A milliárdnyi variáns 6-7 pozíció teljes feltárására elegendő.

Sörétes pásztázó alaninmutagenézis

Sachdev Sidhu, korábbi munkatársam a Genentech cégnél, kifejlesztett egy módszert a klasszikus pásztázó alaninmutagenézis kiváltására. A sörétes pásztázó alaninmutagenézisnek (*shotgun alanine scanning*) keresztelt eljárásban egyedi mutációk helyett kombinatorikus sémát alkalmazott. Az első ilyen



1. ábra A fágbemutatás sémája

munkában a növekedési hormon *Site-1* területén egyszerre 19 pozíciót variált bináris módon a vad típusú és alaninoldallancot 1:1 arányban megengedve (2. ábra) [17]. Funkciónszeptált klónok szekvenálásával minden variált pozíciónál meghatározta a vad típusú (wt) és az alaninmutáns (Ala) arányát. Egyhez közeli wt/Ala arány arra utal, hogy az alaninmutáció nem okoz funkcióváltozást, tehát a vad típusú oldallánc szerepe elhanyagolható. Minél nagyobb a wt/Ala arány, annál fontosabb a vad típusú csoport. Sidhu és munkatársai bebizonyították, hogy ez a várakozás kvantitatív értelemben is teljesül. Az egyes pozíciók wt/Ala aránya ragyogóan korrelál a vad típusú fehérjére és az adott pozíció egyedi alaninmutánsára vonatkozó affinitások (asszociációs állandók) arányával.

Saját példák irányított evolúció alkalmazására fehérjemérnöki kutatásokban

A fenti munka nyomán Sachdev Sidhu-val együttműködésben számos kutatást végeztem [18-22], amelyekből most hármát említek.

Affinitásnövekedés molekuláris hátterének feltárása. A sörétes alaninmutagenézist kiterjesztettem a hGH *Site-1* teljes, 35 aminosavas felszínére, és az energiatérképezést elvégeztem egy olyan, 400-szoros affinitású, 15 mutációt hordozó hGH-variáns is, amelyet a Genentech cég fágbemutatással fejlesztett ki [22]. A két energiatérkép összehasonlítása megmutatta, hogy az affinitásnövekedés egymás ellen ható effektusok eredője. A vad típusra jellemző koncentrált „forró folt” helyett egy kiterjedtebb „langyos” energiatérképet kaptunk. Az eredeti forró foltot alkotó aminosavak az affinitásnövelés során a mutánsban megőrződtek, de szerepük lecsökkent, a terület „lehűlt”. Ez jelezte, hogy ere-

deti szerepük ellátását az egyéb pozíciók mutációi akadályozzák. A „langyos folt” kiterjedtségét zömmel éppen ezek az új, affinitásnövelő mutációk okozták, amelyek receptorkötést gátló vagy a kötésben funkcionálisan részt nem vevő oldallancokat cseréltek funkcióképesebbekre. Meglepetésre olyan vad típusú csoportot is azonosítottunk, amelynek energetikai szerepe az egyéb pozíciók mutációi nyomán megnőtt. A vad típusú oldalláncok szerepmódosulását is magyarázó modellünk szerint az affinitásnövekedés komoly konformációs átrendeződéssel járt. Szerkezeti vizsgálatok ezt a következtetésünket igazolták [23].

Intramolekuláris oldallánckapcsolatok feltárása. A hGH sörétes alaninmutagenézisének adatait felhasználva demonstráltam, hogy a kombinatorikus mutagenézissel nem csak egyedi oldalláncszerepek, de oldallánc-kölcsönhatások is azonosíthatók [20]. Minden binárisan variált pozíciópárra kiszámoltam, hogy az ott kapott együttes wt:wt; Ala:wt; wt:Ala és Ala:Ala párok előfordulási gyakorisága mennyire tér el a véletlen kombinálódás esetén várt értékektől, és statisztikai próbával elemeztem az eltérés szignifikanciaszintjét. Azt találtam, hogy a vad típusú kötőhely oldalláncainak túlnyomó többsége autonóm módon működik. Néhány, zömmében töltéssel bíró oldalláncpár esetében az adatok gyenge, egymást segítő vagy éppen gátló hatást jósoltak. Egyedi és dupla mutánsok méréseivel igazoltam, hogy a kombinatorikus eljárás még gyenge kölcsönhatások azonosítására is képes.

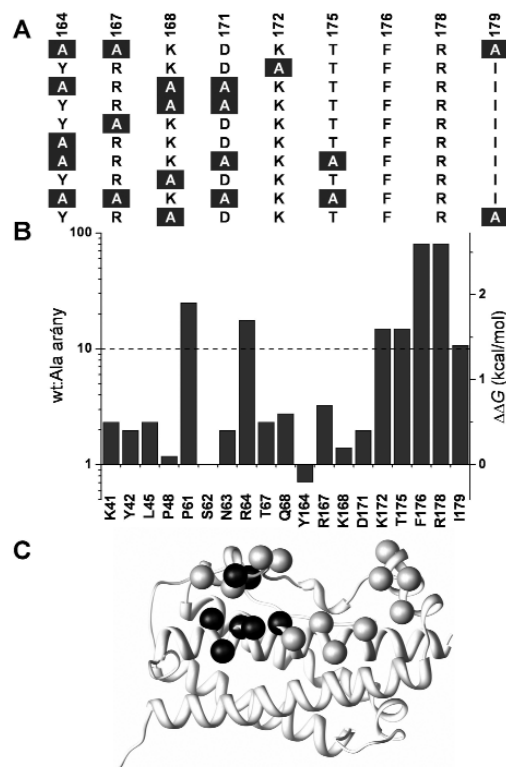
Az evolúciós fehérjemérnöki megközelítés segítségével az ELTE Biokémiai Tanszékén elsőként egy proteázinhibitor-családot érintő rejtélyes viselkedés okait tártuk fel [24]. A pacifastincsalád a hidrofób mag tekintetében két paralóg alcsaládra oszlik [25]. Az I-es alcsalád tagjairól kiderült, hogy korábban soha nem tapasztalt mértékű taxonszelektivitással bírnak: kiválóan gátolják gerinctelen fajok tripszinjeit, de alig hatnak a gerincesek tripszinjeire [26].

A II-es alcsalád tagjai mindkét tripszinforma hatékony inhibitorai. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az eltérés oka nem az inhibitorok proteázzal kölcsönható „aktív hurok” régiójában rejlik. Az eltérés okát egy sörétes paralógmutagenézisnek is nevezhető eljárással tártuk fel. A két alcsaládból kiválasztottunk egy-egy ismert inhibitor, amelyek 18 pozícióban tértek el egymástól. A két szekvencia tökéletes, pozícióőrző keverésével létrehoztuk az

összes lehetséges, tehát 2^{18} féle (több mint negyedmillió) kimeravariánst. A könyvtárat eltérő eredetű tripszineken szelektáltuk. Az oldallánckapcsoltságok vizsgálata megjósolta, hogy a taxonszelektivitást az I-es típusú mag és egy szintén I-es típusra jellemző, prolintartalmú felszíni kanyar kombinációja okozza. Ezt egyedi mutánsok mérésével igazoltuk. Ez az első példa arra, hogy egy kisméretű inhibitor esetén a belső mag és egy felszíni elem funkcionálisan meghatározó kapcsolatban áll egymással [24].

Nagy kötőfelszínnek totális jellemzése – Affinitásigazítás rendelésre. Eddigi legátfogóbb munkám visszavezet az emberi növekedési hormonhoz [18]. Korábbi bináris vizsgálataink fontos ismereteket nyújtottak, de továbbra sem tudtuk, hogy a hatalmas receptor-kötő felszínen az egyes csoportok milyen mértékben és mire változnának meg, ha mind a 20-féle aminosavat megengednénk. A 35 pozíció szimultán variálása a lehetséges változatok elképzelhetetlenül kicsiny hányadát hozta volna létre a valóságban. A 35 aminosavas felszínt felosztottuk hat nem átfedő halmazra (későbbi könyvtárra) úgy, hogy minden halmazba legfeljebb 6 pozíció kerüljön. Minden halmazba csak egyetlen olyan pozíció került, amit a korábbi alaninmutagenézis kiemelkedően fontosnak talált, és az egy halmazba tartozó pozíciók nem lehettek szomszédosak. A két elv alkalmazásával segítettük elő, hogy minden könyvtár biztosan tartalmazzon funkcionális klónokat, és az egyes pozíciók egymástól függetlenül evolváljanak, tehát ne szelektálódjanak ki együttműködő csoportok. Két-féle szelekciót alkalmaztunk. A funkcionális szelekciónál a kötőpartner a hGH-receptor volt, míg a szerkezeti szelekciónál egy olyan monoklonális ellenanyag, amely a receptorkötő felszínnel átellenes oldalon egy szerkezeti epitópot ismer fel.

A vizsgálat primer eredménye egy példátlanul átfogó, részletes és megbízható, kísérleteken alapuló adatsereg volt. Mind a 35 pozíció esetén meghatároztuk, hogy a 20 aminosavtípus milyen előfordulási gyakorisággal reagál a szerkezeti és funkcionális szelekciók nyomására. A két szelekcióból összesen 1400 ($2 \times 35 \times 20$) kísérletes aminosav-gyakorisági adatot kaptunk. Kiderítettük, hogy melyek azok a pozíciók, amelyek funkcionálisan részt tudnak venni a receptorkötésben, és melyek azok, amelyek nem. Megmutattuk, hogy melyek azok a megoldások, amelyeknél az irányított evolúció utánózza a természetes evolúciót, és melyek azok, ame-



2. ábra Sörétes pásztázó alaninmutagenézis: a szekvenált pozíciók/klónok részlete (A), wt/Ala arányok (B) és ezek szerkezeti eloszlása (C).

lyeknél attól eltérő megoldásokra lel. Ez utóbbiak affinitásnövelést ígértek, amit egyedi pontmutások mérésével igazoltunk. Bebizonyítottuk, hogy a hGH vonatkozásában bármilyen aminosavcsere esetén meg tudjuk jósolni, hogy annak milyen hatása lesz a hormon stabilitására és receptorkötő affinitására. A módszer természetesen általános, tehát minden fehérje esetén alkalmazható.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetét fejezi ki az OTKA (K68408, TS049812) és az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj pénzügyi támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- [1] Polgar, L., Bender, M. L. (1967) *Biochemistry*, 6(2): 610–620.
- [2] Zoller, M. J., Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.*, 100: 468–500.
- [3] Smith, M. (1982) *Trends Biochem. Sci.*, 7(12): 440–442.
- [4] Nicholson, H., Anderson, D. E., Daopin, S., Matthews, B. W. (1991) *Biochemistry*, 30(41): 9816–9828.
- [5] Lau, F. T. K., Fersht, A. R. (1987) *Nature*, 326(6115): 811–812.
- [6] Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Rocznik, S., Fletterick, R. J., Rutter, W. J. (1987) *Biochemistry*, 26(9): 2616–2623.
- [7] Wells, J. A., Bott, R. R., Powers, D. B., Ultsch, M. H., Power, S. D., Adams, R. M., Cunningham, B., Graycar, T. P., Estell, D. A. (1986) *J. Cell. Biochem., Suppl.* 10: 246.
- [8] Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R., Rutter, W. J. (1985) *Science*, 228(4697): 291–297.

- [9] Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M., Smith, M. (1982) *Nature*, **299**(5885): 756–758.
- [10] Cunningham, B. C., Wells, J. A. (1989) *Science*, **244**(4908): 1081–1085.
- [11] Clackson, T., Wells, J. A. (1995) *Science*, **267**(5196): 383–386.
- [12] Cunningham, B. C., Wells, J. A. (1993) *J. Mol. Biol.*, **234**(3): 554–563.
- [13] Bernat, B., Pal, G., Sun, M., Kossiakoff, A. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(3): 952–957.
- [14] Carter, P. J., Winter, G., Wilkinson, A. J., Fersht, A. R. (1984) *Cell*, **38**(3): 835–840.
- [15] Smith, G. P. (1985) *Science*, **228**(4705): 1315–1317.
- [16] Fellouse, F. A., Pal, G. (2005) Methods for the Construction of Phage-Displayed Libraries. In: Sidhu, S. S. (Ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, CRC Press, Boca Raton
- [17] Weiss, G. A., Watanabe, C. K., Zhong, A., Goddard, A., Sidhu, S. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(16): 8950–8954.
- [18] Pal, G., Kouadio, J. L. K., Artis, D. R., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**(31): 22378–22385.
- [19] Kouadio, J. L. K., Horn, J. R., Pal, G., Kossiakoff, A. A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**(27): 25524–25532.
- [20] Pal, G., Ultsch, M. H., Clark, K. P., Currell, B., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2005) *J. Mol. Biol.*, **347**(3): 489–494.
- [21] Pal, G., Fong, S. Y., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2005) *Protein Sci.*, **14**(9): 2405–2413.
- [22] Pal, G., Kossiakoff, A. A., Sidhu, S. S. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**(1): 195–204.
- [23] Schiffer, C., Ultsch, M., Walsh, S., Somers, W., de Vos, A. M., Kossiakoff, A. (2002) *J. Mol. Biol.*, **316**(2): 277–289.
- [24] Szenthe, B., Patthy, A., Gaspari, Z., Kekesi, A. K., Graf, L., Pal, G. (2007) *J. Mol. Biol.*, **370**(1): 63–79.
- [25] Malik, Z., Amir, S., Pal, G., Buzas, Z., Varallyay, E., Antal, J., Szilagy, Z., Vekey, K., Asboth, B., Patthy, A., Graf, L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1434**(1): 143–150.
- [26] Patthy, A., Amir, S., Malik, Z., Bodi, A., Kardos, J., Asboth, B., Graf, L. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**(2): 179–187.

A kecskerák (*Astacus leptodactylus*) tripszinjének esete a szarvasmarha-pankreász tripszininhibitorával

The affair of crayfish trypsin with bovine pancreatic trypsin inhibitor

Gráf László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA KK-ELTE Biotechnológiai Kutatócsoport, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Gráf, L.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Summary

The most precious reward of a scientist is the discovery that he makes. Discovery is the recognition of a phenomenon or relationship that cannot be seen before the research is started.

The recognition that the tightness or strength of a complex formed between crayfish trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor is much stronger than that of bovine trypsin with its natural trypsin inhibitor is a discovery. It is not evident at this stage, however, how important it is.

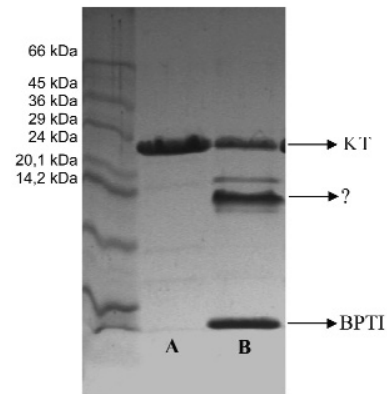
A *Biokémia* első, 1977. márciusi számába, a lap alapító szerkesztőjének, Bagdy Dánielnek a biztatására írtam meg „Endorfinsztori” című tanulmányomat. Most alkalom adódott, hogy a lap nyomtatásban utoljára megjelenő számába is írjak egy történetet. Fogadják jó szívvel.

A történet a kilencvenes évek közepén kezdődött. Akkor még rendszeresen részt vettem a Karchiban (Pakisztán) két évente megrendezett „*Protein Structure and Function*” című nemzetközi konferencián. Egy ilyen szimpózium alkalmával találkoztam először két pakisztáni diákkal, Malik Zulfiqarral és Sumaira

Amirral. A diákok, akik néhány év múlva összeházasodtak Budapesten, a fejükbe vették, hogy nálam doktorálnak. Ugyancsak hosszú történet kerekedne, ha elmesélném, hogy ezt az elképzelésüket miképpen valósítottuk meg. Egy szó, mint száz, eljöttek Magyarországra, és a Gödöllői Biotechnológiai Központban az irányításom mellett végzett ötéves küzdelmes munka árán doktoráltak. Témájuk a sivatagi sáska hemolimfájából általuk izolált két kisméretű szerinproteáz-inhibitornak, az SGCI (*Schistocerca gregaria chymotrypsin inhibitor*) és SGTI (*S. gregaria trypsin inhibitor*) peptidek biokémiai vizsgálata volt

[1,2]. A munka során kiderült, hogy míg az SGCI pikomolos inhibíciós konstanssal gátolja a szarvasmarha-kimotripsint, a homológ szerkezetű, aminosavsorrendje alapján tripszininhibitornak imponáló SGTI csak 5 nagyságrenddel gyengébben gátolja a szarvasmarhatripszin (SZT) aktivitását. A téma ezen a ponton elakadt volna, ha nem jut eszembe a mélyhűtőben heverő, folyami rákból (*A. fluviatilis*) vett tripszinminta, melyet évekkorábban Robert Zwilling professzortól (Heidelberg) kaptam. Megvizsgáltuk az SGTI hatását ráktripszinre, és meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a peptid ezt a proteáz szubpikomolos K_i -értékkel gátolja [2]. A felismerés szárnyakat adott a projektnek [3-7]. Most már a különös fajspecifitás szerkezeti okainak felderítése volt a cél. Történetünk szempontjából a természetes forrásból izolált kecskeráktripszin (KT) – melyet géntechnológiai úton eddig nem sikerült előállítanunk – SGTI peptiddel alkotott komplexének a kristályszerkezete a legérdekesebb [5]. Ez a munka az ismert szerinproteáz–proteázinhibitor interakciónál kiterjedtebb, bensőségebb fehérje–fehérje kölcsönhatásra derített fényt [5]. A cikk egyik társszerzője, Kardos József kollégám vetette fel, hogy a KT szarvasmarhatripszin-inhibitorral (BPTI) alkotott komplexének szerkezetét is meg kellene határoznunk. A kristályosítást előkészítő preparatív műveletek során Vörös Judit diákommal tettük az 1. ábrán bemutatott megfigyelést. A KT és BPTI keverékét hagyományos körülmények között [8], merkaptó-etanol és nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmazó pufferben (mintaoldat) háromperces forralás után, SDS-tartalmú poliakrilamid-gélben elektroforetizálva egy, a kontrollként futtatott ráktripszinnél mozgékonyabb komponenst figyeltünk meg a gélben.

A redukív körülmények között végzett SDS-PAGE módszert szinte minden biokémikus használja, és nehézség nélkül értelmezi az ilyesfajta géleképeket. Írásomnak ezen a pontján megkérem hát a Kedves Érdeklődő Olvasót, hogy takarja le a cikk további

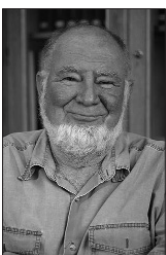


1. ábra A kecskeráktripszin (KT) (A), illetve a kecskeráktripszin és a BPTI 1:4 molarányú, 15 percig előinkubált keverékének (B) a mintapufferben (5% SDS, 4% merkaptó-etanol) történő háromperces forralás után végzett 0,05% (w/v) SDS-poliakrilamid-gélelektroforézise Laemmli [8] szerint.

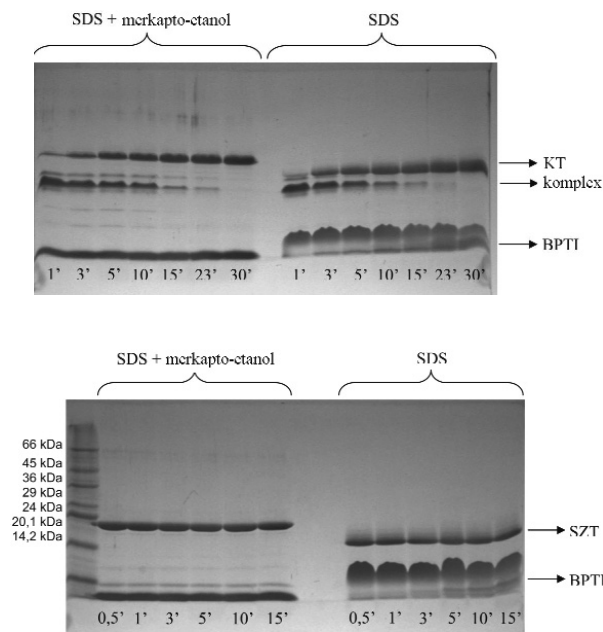
ábráit, és tippelje meg, mit tartalmazhat ez megkérdőjelezett fehérjekomponens? Nekünk sok időnkbe és fáradságunkba tellett, míg megfejtettük a talányt. A felderítés nehézségét részben az okozta, hogy ezt az ismeretlen fehérjét a szokásos technikával nem tudtuk a gélről membránra blotolni.

Nos, a rejtély kulcsát az SDS-gélek natív körülmények között készült elektroforézis-gélekkel való figyelmes összevetése adta kezünkbe. A géleket tanulmányozva merült fel bennem a gyanú, hogy az ismeretlen fehérje a hagyományos körülmények között végzett SDS-merkaptó-etanolos denaturációnak ellenálló enzim–inhibitor komplex lehet. Ezt igazoltuk a 2. ábrán bemutatott kísérletekkel. A SZT–BPTI keverékkel végzett kontrollkísérletek nyilvánvalóvá tették a KT–BPTI komplex SDS-sel szembeni rendkívüli stabilitását.

A Porrogi Pálma doktoranduszom és Harmat Veronika kollégám által előállított KT–BPTI-komplex kristályszerkezetét Katona Gergely, jelenleg a Göteborgi Egyetemen dolgozó, évekkorábban a tanszékünkön doktorált kollégánk oldotta meg a napokban. Még tanulmányozzuk a kölcsönhatás



Gráf László 1965-ben az ELTE-n szerzett vegyészdiplomát. 1985-ig a budapesti Gyógyszerkutató Intézetben dolgozott, 1975-től a Biokémiai Intézet vezetőjeként. 1968-ban doktorált, 1972-ben a biológiai tudomány kandidátusa, 1982-ben a biológiai tudomány doktora lett, 2001 óta az MTA rendes tagja. 1972–73, 1980–81 és 1984–86 időszakokban a *University of California, San Francisco* Hormonkutató Intézetében dolgozott. 1981–82-ig a *New York University Experimental Psychiatry* tanszékének társprofesszora volt. 1986 és 2007 között az ELTE Biokémiai Tanszékét vezette. Jelenleg is az ELTE Szerkezeti Biokémia Program vezetője. Irányítása mellett eddig tizenöt diák szerzett PhD-fokozatot. Érdeklődésének középpontjában a szerin proteázok működésmechanizmusa áll.



2. ábra A kecskeráktripszin (felül), illetve a szarvasmarhatripszin (Sigma Kft., Budapest) (alul) és BPTI 1:4 molarányú keverékének az 1. ábra körülményei között történő SDS–poliakrilamid-gélelektroforézise merkaptó-etanol jelenlétében és távollétében a mintáknak a mintaoldatban 1–30 percig történő forralása után.

részleteit. A történetet azonban befejezetlenül is érdekesnek és tanulságosnak találhatják. Ebben bízva várom kérdéseiket a graf@elte.hu címen.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetet mond Pálinkás Gábornak, az MTA Kémiai Kutatóközpont főigazgatójának a baráti biztatásért és a kutatócsoport hathatós anyagi támogatásáért. Ezzel nyugodt, alkotásra ösztönző légkört teremtett munkámhoz.

Irodalomjegyzék

- [1] Malik, Z., Amir, S., Pál, G., Buzás, Z., Várallyay, É., Antal, J., Szilágyi, Z., Vékey, K., Asbóth, B., Patthy, A., Gráf, L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1434**: 143–150.
- [2] Patthy, A., Amir, S., Malik, Z., Bódi, A., Kardos, J., Asbóth, B., Gráf, L. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**: 179–187.
- [3] Gáspári, Z., Patthy, A., Gráf, L., Perczel, A. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**: 527–537.
- [4] Szenthe, B., Gáspári, Z., Nagy, A., Perczel, A., Gráf, L. (2004) *Biochemistry*, **43**: 3376–3384.
- [5] Fodor, K., Harmat, V., Hetényi, C., Kardos, J., Antal, J., Perczel, A., Katona, G., Gráf, L. (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**: 156–169.
- [6] Gáspári, Z., Szenthe, B., Patthy, A., Westler, W.M., Gráf, L., Perczel, A. (2006) *FEBS J.*, **273**: 1831–1842.
- [7] Szenthe, B., Patthy, A., Gáspári, Z., Kékesi, A.K., Gráf, L., Pál, G. (2007) *J. Mol. Biol.*, **370**: 63–69.
- [8] Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**: 680–685.

Proteázok és fertőzési folyamatok: egy szerralizin, a PrtA proteolitikus rendszerének szerepe

Proteases and infection processes: the role of the proteolytic system of the serralysin-type PrtA enzyme

Venekei István

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Venekei, I.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány sétány 1/C, Hungary

Summary

As an attempt to understand the role of proteolytic systems in the complex process of infection, we study a serralysin-type enzyme, PrtA, from an insect pathogen bacterium, *Photobacterium*. The virulence factor function of serralysins is supposed but not proven, because their target pro-

teins are not known. We identified, six target proteins to PrtA in insect hemolymph, all of immune-related function, indicating an immune suppressor role to PrtA. We have found an inhibitor of PrtA, produced by the host upon infection, as a component of its immune response. This is the first serralysin inhibitor from an eukaryote.

A soksejtű, magasabb rendű élőlények és a mikroorganizmusok között kialakuló kölcsönhatások egyike a patogének által kezdeményezett fertőzés. A folyamat első, patogenitási szakaszában – melynek célja a patogén szempontjából a fertőzés kialakítása, a gazda szempontjából annak felszámolása – bonyolult molekuláris kölcsönhatásrendszer alakul ki az egymással küzdő felek között, melyben mindketten sokféle eszközzel vesznek részt, igyekezvén többszörösen biztosítani a harc maguk számára előnyös kimenetelét. Így a patogének számos virulenciafaktorot vetnek be, míg a gazdák egy sokfunkciójú rendszert alkalmaznak, az immunrendszert. A részt vevő molekulák és kölcsönhatásaik nagy száma és nagyobb részük, valamint szerepük ismeretlensége az oka annak, hogy a fertőzési folyamatok molekuláris szintű eseményeit lényegében nem értjük. Így például nem tudjuk, hogy egy adott patogén–gazda pár esetében mely faktorok és folyamatok határozzák meg és hogyan azokat az alkalmakat, amikor a patogén fertőzést tud kialakítani. Az erre vonatkozó ismeretek sokoldalú hasznosíthatóságát nem kell hangsúlyozni. Noha a rendszer összetettsége miatt a gazda–patogén kölcsönhatás eredményes vizsgálata nagyteljesítményű, molekuláris rendszerbiológiai megközelítést igényel, egy-egy alrendszer hagyományos, biokémiai/molekuláris biológiai módszerekkel is felderíthető, és fontos információkat szolgáltat. Mi egy ilyen alrendszert, egy bakteriális proteáz proteolitikus rendszerét, annak a fertőzési folyamatban játszott szerepét vizsgáljuk.

A proteolitikus kölcsönhatásrendszerek háromoldalúak, a proteázon kívül annak összes természetes szubsztrátjai és inhibitorai alkotják. Egy proteáz pontos szerepének megértéséhez proteolitikus rendszerének teljes ismerete szükséges. Az igen nagyszámú proteolitikus enzim döntő többségének nem felderített a kölcsönhatásrendszere, így azoké sem, amelyeket patogén mikroorganizmusok szekretálnak. Ezeknek általában virulenciafaktor-funkciót tulajdonítanak, ami logikus, hiszen egy patogén nagy hasz-

nát veheti peptideket és fehérjéket bontó enzimeknek a gazda szöveteiben való előrejutáskor, az immunválasz elkerülésében. Értelemszerű, hogy az ilyen proteázok proteolitikus rendszerében az inhibitor oldal gazda eredetű inhibitor (is) fog tartalmazni, mert az a gazda védelmét szolgálja. Sőt, az ilyen inhibitor várhatóan a gazda immunválaszának a részét képezi. Nagyon sok, patogének által szekretált proteáz ismert, virulenciafaktor szerepük azonban – egy-két kivételtől eltekintve – csak feltételezés, mert nemhogy proteolitikus rendszerük nem felderített, de döntő többségüknek még a szubsztrátfehérjei sem ismertek.

Kísérleteinkhez egyszerű és olcsó, de igen hatékony fertőzési modellt használunk. Az előbbi tulajdonságokkal a gazda rendelkezik, ami esetünkben két, a Lepidoptera rendbe tartozó rovar, a dohányszender (*Manduca sexta*) és a viaszmolyl (*Galleria mellonella*) lárvája. A rovarok védekezése csak a veleszületett immunitáson alapszik, azonban ennek a rendszernek a felépítése sok tekintetben hasonló a magasabbrendűek veleszületett immunitásához, sőt, számos esetben azonos molekulakomponenseik is vannak, így a rovarokon tett megfigyelések hasznosíthatók a gerincesek tanulmányozásában is. Fertőzési modellünkben a patogén a *Photobacterium* (Enterobacteriaceae). A *Photobacterium*-fajok általában rendkívüli rovarpatogenitással bírnak, akár egyetlen sejtnek a rovar testfolyadékába jutása is elegendő a fertőzés kialakulásához, ami mindig a rovar pusztulásával végződik. Noha behatolóképeséggel egyáltalán nem rendelkeznek (ehhez a természetben szimbionta partnerükre, a *Heterorhabditis* fonalférgekre vannak utalva – amit kísérleteinkben injektálással helyettesítünk), kivételes virulenciájuk ideális modellpatogénné teszi őket. Tanulságos lehet más patogének fertőzési folyamataira, valamint a veleszületett immunitás működésére nézve a *Photobacterium* azon képességeit megtalálni, amelyek lehetővé teszik, hogy elkerüljék a gazda összetett és általában hatékony immunválaszát, illetve hogy felderítsék, hogy a gazda védekezésé-



Venekei István 1979-ben végzett a SOTE Gyógyszerésztudományi Karán. Kutatói pályáját az EGIS Gyógyszergyárban kezdte, majd 1983-tól a SOTE II. Biokémiai Intézetében volt tanársegéd, ahol a lipidperoxidációs folyamatokat vizsgálta. 1984-ben nyert egyetemi doktori címe alapján 1998-ban kapott PhD-fokozatot. 1988-tól az ELTE Biokémiai Tanszékén dolgozik, jelenleg mint egyetemi docens. 1989-től 1992-ig a *University of California at San Francisco* egyetemen dolgozott, majd azután 2002-ig a pankreatikus szerin proteázok szerkezetkutatásával foglalkozott. Jelenleg egy szerralizin enzim proteolitikus rendszerének a fertőzési folyamatokban játszott szerepét tanulmányozza.

nek mely elemei károsodnak, ami miatt nem képes néhány baktériumsejtnyi fertőzést felszámolni.

Öt különböző módszerrel megvizsgáltuk hús *Photorhabdus*-törzs proteázszekrécióját kultúrában és fertőzési folyamat során, olyan enzimet keresve, amely mindkét körülmény között elég korán jelenik meg ahhoz, hogy a virulenciában szerepet játszhasson [1]. A négy talált enzimaktivitás közül egy metcinkin típusú, PrtA néven ismert Zn-metalloproteáz felelt meg a kritériumnak. A PrtA enzimek az intersticiális kollagenázok családjában (M10) a – szerralizineknek is nevezett – bakteriális eredetűek közé tartoznak (M10B alcsalád). Az ebben az alcsaládban ismeretes több mint 60 enzimet nagyszámú mikroorganizmus termeli, ideértve növényi és humánpatogéneket is. A szerralizineknek fontos szerepet tulajdonítanak a virulenciában, azonban ez csak feltételezés, mert nem ismertek a természetes szubsztrátjai, azaz olyan fehérjék, amelyeket szelektíven és hatékonyan hasítanak.

A dohányyszender testfolyadékában kerestünk a *Photorhabdus* PrtA számára célfehérjét, hogy azonosításukkal képet kapjunk a PrtA fertőzésben betöltött szerepéről. Tizenhat olyan fehérjét találtunk, amelyeket a PrtA hatékonyan és szelektíven hasított *in vitro* [Felföldi G. és mtsai (1), kézirat közlésre benyújtva]. N-terminálisuk alapján hat fehérjét sikerült az adatbázisokban azonosítani, amelyek funkciói a veleszületett immunitás minden főbb funkcióját képviselik: immunfelismerés (β -1,3-glucan recognition protein 2), immunvégrehajtás (szkolexin A és B) immunszabályozás és jelátvitel (*hemocyte aggregation inhibitor protein*, *serin proteinase inhibitor 1* és *serine proteinase homolog 3*, SPH-3). Az SPH-3 proteintről mindössze annyi irodalmi információ állt rendelkezésre, hogy ez a fehérje is immunindukálható. Közel 100 olyan gén ismert, amely SPH fehérjét kódol, de eddig csak ötnek sikerült funkciót találni. A Bath-i Egyetem Stuart Reynolds és Richard French-Constant vezette kutatócsoportjával együttműködésben sikerült megállapítani, hogy az SPH-3 a sejten kívüli immunjelátvitelben tölt be fontos szerepet [Felföldi G. és mtsai (2) kézirat közlésre benyújtva]. Noha a mechanizmus még tisztázásra vár, RNS-inaktivációs kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az SPH-3 jelenléte nélkül az immunvégrehajtásért felelős peptideket és fehérjéket kódoló gének aktivitása represszálódik, és a fertőzést követő indukciójuk sem következik be, ugyanakkor az

immunreceptorokat kódoló gének működése érintetlenül marad. Ez arra utal, hogy rovarokban – az eddigi elképzelésekkel ellentétben – az immunjelátvitel már a sejten kívüli szakaszban is két, egymástól elkülönülő útvonalon halad. (Az immunjelátvitel ezen szakasza rovarokban még teljesen felderítetlen.)

Az eddig azonosított hat PrtA célfehérje funkciói arra engednek következtetni (a többi tíz fehérje ismerete nélkül is), hogy a PrtA (egyik) szerepe az immunszuppresszióban lehet. A *Photorhabdus* ennek az egy enzimnek a termelésével is összetett támadást tud intézni a gazda immunrendszere ellen, célozva annak mindhárom elemét, a felismerést, a jeltovábbítást és a végrehajtást. Így a PrtA is hozzájárulhat a *Photorhabdus* rendkívüli patogenitásához. Két általánosabb tanulsága is van eddigi eredményeinknek: (1) Mivel az azonosított PrtA célfehérjék a veleszületett immunitás hordozói, elképzelhető, hogy a többi szerralizinek (például a humánpatogén *Pseudomonas aeruginosa* alkalikus proteázának) célfehérjéit is ebben a körben, s nem a szerzett immunitásért felelős fehérjék között kell keresni, mint eddig tették. (2) Az SPH-3 esete példázza, hogy egy (proteolitikus) virulenciafaktort eszközként lehet használni az immunrendszer komponenseinek és működésüknek felderítésében.

A *Photorhabdus*-PrtA hasítóhely-specifitásának megállapítása után egy igen érzékeny és specifikus szubsztrátot fejlesztettünk ki [2], és annak segítségével kerestük a PrtA proteolitikus rendszerében az inhibitor oldalának gazda eredetű tagját. Mind a viaszmollyal, mind a dohányszenderrel végzett kísérleteink szerint létezik a keresett inhibitor, és az valóban immunindukálható, tehát a rovar immunválaszának a részét képezi. Ez a PrtA-inhibitor (PAI) az első olyan szerralizininhibitor, amit eukarióta szervezet termel. (Az eddig ismert szerralizininhibitorok – így a PrtA inhibitora, az Inh is – mind prokarióta eredetűek, maguk a proteázot termelő mikroorganizmusok termelik ezeket is.) N-terminális szekvenciája alapján a PAI különbözik nemcsak a szerralizinek eddig ismert inhibitoraitól, hanem az intersticiális kollagenázok (az M10 család) másik alcsaládjának (M10A alcsalád), a mátrix metalloproteázoknak az inhibitoraitól is. Viszont szinte teljes aminosavszekvencia-azonosság adódott a dohányszender és más fajok lebecinjának egy belső darabjával. A lebecinok a rovarok testfolyadékának

immunindukálható fehérjéi, amelyeknek funkciója ismeretlen. Érdekes szerkezet-biokémiai kérdés, hogy a PAI milyen mértékben és hogyan különbözteti meg az M10 család A és B alcsaládjába tartozó enzimeket, azaz a patogén szerralizin típusú proteázát a gazda saját mátrix metalloproteázától? Ennek alapján lehet-e olyan szintetikus inhibitor készíteni, ami ugyanerre képes?

Köszönetnyilvánítás

A munka résztvevői: Marokházi Judit (PhD), Felföldi Gabriella (doktori iskolás), Pekár Szilvia

(PhD), Fodor András (egyetemi docens), valamint Tóth Alexandra, Képiró Miklós, Gudics Ágnes és Mészárosné Gyimesi Zsófia szakdolgozatos diákok. A szerző köszöni Patthy Andrásnak az *N*-terminális szekvenálásokat, valamint Hudecz Ferencnek és Mihala Nikolettnek a PrtA-szubsztrát kifejlesztésében nyújtott segítségét.

Irodalomjegyzék

- [1] Marokházi, J., Lengyel, K., Pekár, Sz., Felföldi, G., Patthy, A., Gráf, L., Fodor, A., Venekei, I. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7311–7320.
- [2] Marokházi, M., Mihala, N., Hudecz, L., Fodor, A., Gráf, L., Venekei, I. (2007) *FEBS J.*, **274**: 1946–1956.

Kétszálú és magányos α -hélixek: két sokoldalú fehérjeszerkezeti elem

Two stranded and lone α -helices: two versatile protein structural motifs

Süveges Dániel, Nyitray László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C

Süveges, D., Nyitray, L.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány sétány 1/C, Hungary

Summary

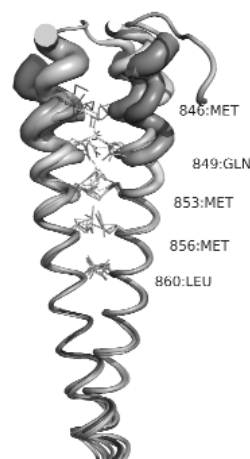
Lone α -helices were previously thought to be very rare in the protein world. However, two α -helices could form coiled-coil structures, the most abundant protein dimerization motif. They are responsible for the dimerization of many myosin motors, as well. We found that the head-proximal region of the long coiled-coil tail is more flexible in regulated than in non-regulated conventional

myosins. We succeeded to visualize such an unstable coiled-coil by X-ray crystallography. By studying a predicted dimerization domain of class VI unconventional myosin, we showed that it forms, instead of a coiled-coil, a highly charged single α -helix (CSAH) that could extend the lever arm of the motor. Moreover, using two newly developed computational methods, a remarkable number of additional proteins with various functions were found to contain CSAH motifs.

Az α -hélix felfedezése óta eltelt több mint fél évszázad, de még mindig tartogat újdonságokat ez az alapvető fehérjeszerkezeti elem. Korábban általánosan elterjedt volt az a nézet, miszerint az α -hélix csak a fehérjék harmadlagos szerkezetének védelmében lehet stabil, hiszen a szerkezet fenntartását biztosító, karboniloxigén, és amidnitrogén közti

hidrogénhíd-kötés a környező vízmolekulák támadásának nem képes ellenállni. A fehérjék hidrofób magjához hasonlóan a membránok hidrofób környezete, valamint egyes szerves molekulák mint a trifluor-etanol azáltal stabilizálják az α -hélixet, hogy távol tartják a vizet a peptidgerinctől.

Az evolúció egyszerű és elegáns módszere az α -hélix stabilizálására, ha két jobbmertes α -hélix balmenetes helikális feltekéréssel *coiled-coil* szerkezetet, fehérje-„szuperhélixet” tud alkotni. Az α -hélixeket ebben a szerkezetben egy hidrofób varrat stabilizálja. A *coiled-coil* a fehérjék világának leggyakoribb dimerizációs motívuma (de léteznek három-, négy-, sőt ötláncú szuperhélixek is). Becslések szerint a proteom 20%-ában megtalálható, így az általunk már régóta vizsgált miozinokban is. A konvencionális, az izomkontrakcióért is felelős miozin (M2) „kétféjű” molekula, amelyet a hosszú „farokrégió” *coiled-coil* szerkezete tart össze. Mivel a két fej *in vitro* kísérletekben független erőgenerátorként (motorfehérjeként) működik, felmerül a kérdés, miért kétféjű az M2. Az egyik válasz, hogy a *coiled-coil* farokrégió képes filamentummá rendeződni (a hélixek felszíni töltésmintázatai közötti ionos kapcsolat révén), ami a „csoportos motor” miofibrillumok csúszófilamentum-működésének az egyik szerkezeti alapja. Másrészt az utóbbi időben kiderült, hogy a „kétféjűség” előfeltétele egyes M2 motorok terhelésfüggő működésének [ld. Kovács M. cikkét ebben a lapszámban], valamint az ún. regulált M2 izoformák szabályozásának is. Ez utóbbi kategóriába tartoznak a gerinces-simaizom és sok gerinctelenizom M2 (beleértve a mi „modellünket”, a közvetlen Ca^{2+} -kötéssel szabályozott puhatestűizom-miozinokat), valamint az ún. nem izom M2 paralógok. A szabályozás úgy valósul meg, hogy az alaphelyzetnek megfelelő kikapcsolt állapotban (ami alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál áll fenn) két M2 fej aszimmetrikusan egymáshoz, s a *coiled-coil* farok proximális régiójához (S2) kapcsolódik. Feltételezésünk szerint ez a szerkezet csak a *coiled-coil* S2 letekéréseivel jöhet létre. Egy ilyen, ezek szerint erősen flexibilis S2 fragmentum röntgendiffrakciós szerkezetét sikerült meghatározni (1. ábra) [1]. Hogy lehet egy instabil szerkezetet kristályosítani? A trükk az volt, hogy egy 50 aminosavból álló, ön-



1. ábra A miozin-2 proximális S2 flexibilis *coiled-coil* szerkezete. Öt modell (1nkn, 3bas, 3bat) egymásra szuperponálva. Néhány nem szokványos *coiled-coil* kölcsönhatásban lévő oldallánc kiemelve szerepel. A szerkezet C-terminális egyharmada a Leu-cipzár.

magában szerkezet nélkül S2 szekvenciához kiméraként hozzákapcsoltunk egy Leu-cipzár-motívumot. A szerkezet dinamikus voltára utal az a tény is, hogy három különböző kristályformában tíz különböző térszerkezetű láncot kaptunk [2]. CD spektroszkópiai és kalorimetriás mérésekkel bizonyítottuk, hogy csak a regulált M2 fehérjékre jellemző a proximális S2 nagyfokú flexibilitása, míg a közvetlenül szabályozott izoformák (ilyen a gerinces vázizom M2) stabilabbak.

Lehet-e a természetben a kétszálú szuperhélixek mellett más módon is stabilizálni egy α -hélixet poláros környezetben? A nyolcvanas években egyes szintetikus peptidekről derült ki, hogy képesek vizes oldatban is stabil egyszálú α -hélix kialakítására [3,4]. Ezek a hélixek jellegzetes aminosavmintázatot mutattak, ahol ellentétesen töltött oldalláncok helyezkedtek el négy aminosavnyi távolságra, így az α -hélix menetemelkedése során egymás fölé kerülve közöttük kialakuló sóhidak stabilizálhatták a szerkezetet. A kilencvenes években egy aktinkötő fehérje, a



Süveges Dániel az ELTE TTK biológus szakán végzett 2005-ben. A Biológus doktori iskola Szerkezeti biokémia programjában szerzett abszolutóriumot 2008-ban, jelenleg doktori disszertációján dolgozik. 2008 őszétől az ELTE Biokémiai tanszéken egyetemi tanársegéd. Kutatási területe a kétszálú és egyszálú α -hélixek, valamint a miozinszabályozás szerkezet-funkció vizsgálata.

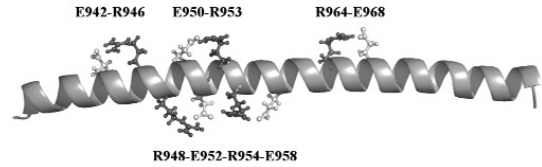
Nyitray László az ELTE TTK biológus szakán végzett 1981-ben, azóta a TTK Biokémia tanszék munkatársa, 1997-től egyetemi docensként, 2007-től tanszékvezetőként.

1985-ben, majd 1989-91-ig az Egyesült Államokban (Boston Biomedical Research Institute, majd Brandeis Egyetem) dolgozott. 1997 és 2004 között Széchenyi professzori ösztöndíjban részesült. Fő érdeklődési területe a motorfehérjék molekuláris és szerkezeti biológiája, fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata.



kaldezmon centrális, nagy töltéssűrűséggel bíró szakaszról mutatták ki, hogy magányos α -hélixet képez [5]. Csoportunk hasonló aminosavmintázatra lett figyelmes egy nem konvencionális miozin (M6) farokrészének vizsgálatakor. Bizonyítottuk, hogy a predikciókkal ellentétben a kérdéses szakasz *coiled-coil* szerkezet kialakítására nem képes, ellenben fiziológiás környezetben is stabil egyszálú α -hélixet alkot [6] (2. ábra). Velünk egy időben egy másik miozincsalád, az M10 esetében is hasonló töltésmintázatú régiót fedeztek fel [7]. Felmerült a kérdés, hogy mennyire elterjedt a fehérjék világában az erősen töltött magányos α -hélix (CSAH: *charged single α -helix*) motívum? Két, alapvetően különböző predikciós programot készítettünk. Az egyik a szekvencia mentén összegzi a CSAH-szerkezetekre jellemző stabilizáló és destabilizáló hatásokat (az ellentétesen/azonosan töltött aminosavak számát és egymástól való távolságát, az ionpárcsoportok kooperatív hatását, a hélix dipólmomentumának stabilizálása révén kialakuló sóhidak relatív orientációját, a nem töltött oldalláncok számát és helyét). A másik program a töltött aminosavak mintázatának periodicitásán alapul: a pozitív és negatív aminosavak elhelyezkedéséből egy töltéskorrelációs függvényt számol, s ennek a függvénynek a Fourier-transzformáltja árulkodik arról, hogy a szekvenciában megtalálható-e a CSAH szerkezeti elemre jellemző ismétlődő töltésmintázat. Az M6 és M10, valamint a kaldezmon mellett a két program konszenzusát alapul véve további 140 fehérjében találtunk minimum 40 aminosavnyi hosszúságú CSAH-motívumot (ami valószínűleg alulbecslés). A jóslatok kísérletes alátámasztására további két fehérje (GCP60 Golgi protein és M4K4 MAP-kináz) magányos α -hélixnek jóslott régióját klónoztuk, expresszáltuk, majd CD-spektroszkópiával vizsgáltuk a kialakuló másodlagos szerkezetet és annak stabilitását. Magas α -hélix-tartalmat mértünk ezeknél is, amely a hőmérséklet-növelés hatására, a *coiled-coil* szerkezettel ellentétben nem kooperatív módon denaturálódott, de még 80 °C-on is ~30% hélix tartalommal bírt [8].

A CSAH-motívumot tartalmazó fehérjék között a sejt működésének szinte minden fontosabb aspektusa képviselt, a metabolikus enzimektől, motorfehérjékén át transzlációs iniciációs faktorig. A magányos hélix funkciójáról csak néhány esetben van kísérletes adatunk: az M6 esetében sikerült bizonyítani, hogy a motordomén erőkarját meghosszabbítva a motor lé-



2. ábra A miozin 6 CSAH-motívum in silico modellje. Néhány ionpárt és egy négytagú sóhidklasztert jelöltünk.

péshosszát növeli meg [9], míg a kaldezmon és néhány további fehérje esetében azt valószínűsíthetjük, hogy a CSAH-szegmens két domén közé ékelődve afféle távtartó szerepet tölt be. Az egyszálú hélixek meglepően nagy stabilitásához az ionpárokon túl a Lys és Arg oldalláncok hidrofób részének vízfelvonó hatása is hozzájárul. Legújabb molekuláris dinamikai szimulációs kísérleteink meglepő módon azt sejtetik, hogy a CSAH-motívum flexibilitását, illetve merevségét az Arg és Lys oldalláncok befolyásolják [10].

Zárszóként megállapíthatjuk, hogy a magányos α -hélix csatlakozott a kétszálú α -hélixhez, s együtt alkotják a fehérjék világának két legegyszerűbb, leggazdaságosabb, de egyszersmind változatos szerpellel bíró szerkezeti elemét.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Carolyn Cohen (Brandeis Univ., USA) csoportjának, Michel Espinoza-Fonsecanak (Univ. Minnesota, USA), Gáspári Zoltánnak (ELTE, Kémiai Intézet) és Tóth Gábornak (MBK, Gödöllő) az együttműködésért, valamint az OTKA Irodának (K61784, TS049812, NI68466) a pénzügyi támogatásért.

Irodalomjegyzék

- [1] Li, Y., Brown, J. H., Reshetnikova, L., Blazsek, A., Farkas, L., Nyitray, L., Cohen, C. (2003) *Nature*, **424**: 341–345.
- [2] Brown, J. H., Yang, Y., Reshetnikova, L., Gourinath, S., Suvéges, D., Kardos, J., Hobor, F., Reutzel, R., Nyitray, L., Cohen, C. (2008) *J. Mol. Biol.*, **5**: 1434–1443.
- [3] Lyu, P. C., Marky, L. A., Kallenbach, N. R. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **7**: 2733–2734.
- [4] Marqusee, S., Baldwin, R. L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **24**: 8898–8902.
- [5] Wang, C. L., Chalovich, J. M., Graceffa, P., Lu, R. C., Mabuchi, K., Stafford, W. F. (1991) *J. Biol. Chem.*, **21**: 13958–13963.
- [6] Suvéges, D., Németh, A., Gáspári, Z., Tóth, G., Nyitray, L. (2005) *J. Muscle Res. Cell Motility*, **26**: 74.
- [7] Knight, P. J., Thirumurugan, K., Xu, Y., Wang, F., Kalverda, A. P., Stafford, W. F. 3rd, Sellers, J. R., Peckham, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **41**: 34702–34708.
- [8] Suvéges, D., Gaspari, Z., Toth, G., Nyitray, L. (2009) *Proteins*, **74**: 905–916.
- [9] Spink, B. J., Sivaramakrishnan, S., Lipfert, J., Doniach, S., Spudich, J. A. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **6**: 591–597.
- [10] Espinoza-Fonseca, L. M., Suvéges, D., Gáspári, Z., Tóth, G., Nyitray, L. (2009) *Biophys. J.*, submitted (2009 Annual Meeting of the Biophysical Society)

MIF: a gyógyszerkutatás új korszakának hírnöke

MIF: a new wave in drug discovery

Zahoránszky-Kőhalmi Gergely¹, Simon Zoltán¹,
Zhenhui Yang¹, Jelinek Balázs, Hári Péter²,
Málnási-Csizmadia András¹

¹ ELTE Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest,
Pázmány sétány 1/C, ² Delta Informatika Zrt.,
1033 Budapest, Szentendrei út 29–53.

Összefoglalás

A molekulák interakciós viselkedési mintázatainak (*Molecular Interaction Fingerprint, MIF*) vizsgálata új irányzatot nyithat a gyógyszerkutatásban. Egy molekula MIF-képe annak egy előre meghatározott fehérjekészletre történő *in silico* dokkolása során kapott kötésienergia-mintázatból áll elő. Vizsgálataink során jelentős összefüggést tapasztaltunk 969, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhivatala (*US Food and Drug Administration, FDA*) által elfogadott gyógyszerhatóanyag MIF-mintázatainak és farmakológiai profiljainak hasonlósága között. A MIF-hatáspredikció az általunk vizsgált gyógyszerhatóanyag-molekula közül 8 esetben COX-1- és COX-2-gátló hatást ígért. A 8 molekula közül 4 esetben ezt a hatást *in vitro* kísérleteink valóban igazolták. A MIF-eljárás és a 969 molekula MIF-mintázata, valamint hatás- és mellékhatásadatai elérhetőek a publikus *MIF DataBase* weboldalon.

Az új *in silico*, azaz algoritmusokra épülő informatikai technológiák a gyógyszerkutatásban is megvetették lábukat, ezekre példa a több évtizede alkalmazott QSAR, azaz kvantitatív szerkezet-aktivitás összefüggés-vizsgálat, valamint a *Virtual Screening*, azaz célfehérjék és szerves molekulák közötti kölcsönhatást modellező eljárások. A várakozásokkal ellentétben, az évente felfedezett új gyógyszerhatóanyagok száma nem nő. A polifarmakológia új keletű elmélete szerint az egyes hatóanyag-molekulák több fehérjével is kölcsönhatásba lépnek, egy hasonló elmélet, a hálózati farmakológia szerint pedig a fehérjék kölcsönhatási hálózatába avatkoznak be.

MIF-eljárás. Kutatásunk célja olyan hatáspredikciós eljárás kifejlesztése volt, amely segítséget nyújt új gyógyszerhatóanyagok tervezésében, valamint ezek

Zahoránszky, G.¹, Simon, Z.¹, Yang, Z.¹,
Jelinek, B., Hári, P.², Málnási-Csizmadia, A.¹

¹ Department of Biochemistry, Eötvös Loránd
University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter
sétány 1/C, ² Delta Informatika Zrt., H-1033
Budapest, Szentendrei út 29–53., Hungary

Summary

Prediction of clinical and side effects of drug molecules through their complex interaction behavior is a promising alternative of drug development. We present a novel Molecular Interaction Fingerprint (MIF) generating method which aims to relate the multiple binding patterns of drug-like molecules with their pharmacological profiles. MIF is a set of binding free energies of a drug molecule to a series of protein surfaces. Strong correlations were obtained between MIFs and pharmacological profiles of 969 drugs approved by the US FDA. The MIF method predicted COX-1 and COX-2 inhibitory effect for 8 approved drug molecules which was proven for 4 of them by *in vitro* experiments. The MIF Method and the MIFs of 969 approved drugs are available through the public online MIF DataBase.

élettani hatásainak gyors, szisztematikus feltérképezésében. Továbbá lehetőséget kínál már ismert gyógyszerhatóanyagok a jelenlegitől eltérő terápiás alkalmazási területének felderítésére. Az eljárás alapötlete, hogy a szerkezet felismerőképességét egy fehérjekészlettel imitáljuk, amelyben a különböző kötőzsebek az egyes molekulák számára egy diszkriminátorfelületet adnak. Ezt az affinitási mintázatot egy ismert *in silico* eljárás, úgynevezett molekuláris dokkolás segítségével állítjuk elő [1,2]: az egyes molekulákat 89 előre meghatározott, különböző fehérjére dokkoljuk, az affinitási értéket pedig a dokkolt szerkezet kötési szabadenergia-értékéből származtatjuk. Egy adott molekula affinitási mintázatát molekuláris interakciós ujjlenyomatnak (MIF) nevezzük. Fontos megjegyezni, hogy az eljárásban nem használjuk ki azt, hogy valamely fehérje egyben célfehérjeje is egy

molekulának, hiszen a dokkolt molekulák nagy részének egyetlen ismert célfehérjeje sem szerepel a 89 fehérje között. Kísérleteink során kb. 2 500 000 dokkolással elkészítettük a jelenleg forgalomban lévő, az FDA által elfogadott közel 1000 gyógyszerhatóanyag MIF-mintázatát.

Hatáspredikció. Egy adott molekula MIF-mintázata felfogható egy 89 dimenziójú vektornak, ahol az egyes dimenziókat a fehérjék jelentik, a koordinátaértékek pedig az adott dimenzióban, tehát fehérjén mért affinitási értékek. Így két MIF közötti hasonlóságot, illetve távolságot a két MIF-„vektor” által bezárt szögértékkel jellemezhetünk, amely a két molekula közötti hasonlóságot kvantitatívan jellemzi. Minden molekulához meghatározható tehát egy lista, amely a többi molekulát MIF-hasonlóságiérték szerinti csökkenő sorrendben tartalmazza. Ezt nevezzük MIF-szomszédsági listának. Alapfeltétele-

zésünk szerint a listát „birtokló” molekula farmakológiai profilja hasonló a lista élén álló molekulák profiljához. Ennek segítségével olyan élettani hatását jelezhetjük előre molekuláknak, amelyek eddig ismeretlenek voltak.

Validálás. A MIF-eljárás hatás-előrejelző pontosságát az úgynevezett „leave-one-out” módszerrel validáltuk, statisztikailag. E módszer lényege, hogy az adatbázisban szereplő mindegyik molekulának az ismert hatásait próbáljuk visszakapni úgy, hogy csak a MIF-szomszédsági listája élén szereplő molekula ismert hatásaira támaszkodunk. Az így nyert előrejelzési helyességek átlaga jellemzi a MIF-eljárás előrejelző képességét. A valós adatbázison alapuló értéket egy összekevert, randomizált adatbázison kapott értékhez viszonyítva elmondható, hogy a MIF-eljárás 90% konfidenciaszint fölött képes egy molekula várható hatását előrejelezni.



Zahoránszky-Kóhalmi Gergely vegyészmérnöki tanulmányait a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen és a New Mexico State University (USA) végezte. 2004-ben készített diplomamunkáját a BMGTE a Máté Tibor emlékére alapított innovációs diplomamunka-díjjal jutalmazta. Fejlesztőmérnökként 2005-ig a Sanofi-Aventis Nyrt.-ben dolgozott, majd 2006-ig szintézisvezető kutatóként az AMRI Hungary Nyrt.-ben. 2006-tól az ELTE Biokémiai Tanszékén működő bioinformatikai csoportban végez kutatást, a Biológiai Doktori Iskola keretében.

Simon Zoltán biológus, diplomáját 2005-ben szerezte az Eötvös Loránd Tudományegyetemen. Szakdolgozati témája egy kombinált *stopped-flow/temperature jump* készülék kifejlesztése volt. Ugyanebben az évben kezdte meg doktori tanulmányait az ELTE Szerkezeti Biokémia programjában, melynek keretében a MIF módszer kifejlesztése mellett a humán 4-es tripszin belső viszkozitását vizsgálta. Doktori tanulmányai 2008-as befejeztével az ELTE-vel szorosan együttműködő Delta Informatika Zrt. kutatás-fejlesztési igazgatója lett.



Yang Zhenhui az ELTE Szerkezeti Biokémia doktori programjának harmadéves hallgatója, 2005-ben szerzett egyetemi végzettséget a Kínai Katonai Orvosi Akadémia Orvosbiológiai Intézetében, Pekingben. A számítógépes kémiai szoftverek és programozás mellett behatóan ismer számos molekuláris biológiai és biokémiai labor technikát, járatos különböző gyógyszertervezési és állatkísérletek tervezésében és kivitelezésében. Rendelkezik kínai orvoslás irányú egyetemi végzettséggel is.

Jelinek Balázs biológus, tudományos munkatárs az ELTE Biokémiai Tanszékén. Doktori értekezésének témája az emésztőenzimek szerkezet-működés összefüggései, egy évig foglalkozott gyógyszerfejlesztéssel az Alapítvány a Rák Megelőzéséért és Hatásos Kezeléséért humán sejtvonalakat testelő laboratóriumában. Több, az ELTE-n futó magyar és nemzetközi pályázatban projektmenedzser, két magyarországi és egy európai uniós projektmenedzsment-kurzuson szerzett oklevelet.



Hári Péter villamosmérnökként végzett, 2000 óta a Delta Informatika Zrt. innovációs igazgatója. Vezetésével a Delta Zrt. számos sikeres tudományos projektben működik együtt egyetemi kutatócsoportokkal.

Málnási-Csizmadia András biológus, egyetemi docens az ELTE Biokémiai Tanszékén. Elsőként és eddig egyedülként kapta meg Európában mind az *EMBO Young Investigator*, mind az *EMBO/HHMI Researcher* díjat, valamint elnyerte a Békéssy- és a Magyary-ösztöndíjat, illetve az *EU FP7 ERC Starting Grant* pályázatát. Fő kutatási témája: motorenzimekben kialakuló intramolekuláris erők hatása az enzimreakciókra, s az általa alapított és vezetett bioinformatikai csoporttal több önálló, gyógyszerfejlesztéssel kapcsolatos projekten is dolgozik.



Kísérleti eredmények. A molekulák MIF-mintázata alapján alapuló analízis 8 gyógyszer esetében tárt fel egyértelmű, eddig ismeretlen COX-1-, illetve COX-2-gátló hatást. Kísérleteink során igazolást nyert, hogy a 8 közül 4 szer valóban COX-inhibitor hatással rendelkezik, ami azért is különösen jelentős eredmény, mert sem a COX-1, sem a COX-2 nem szerepelt a dokkolás során alkalmazott 89 fehérje között. A 4 szer közül az egyik az aszpirinnél is erősebb COX-1- és COX-2-inhibíciós hatással rendelkezik.

Adatbázis. Az FDA által jóváhagyott 969 gyógyszerhatóanyag MIF-mintázataiból előállítottunk egy interneten hozzáférhető, publikus adatbázist, *MIF DataBase* néven [3]. Ebbe az adatbázisba integráltuk a molekulák ismert farmakológiai profilját (hatás- és mellékhatási adatokat), szerkezetét, generikus neveit, valamint közismert azonosítóit, amelyeket adatbányászati eljárással nyertünk a *DrugBank* adatbázisból [4].

A MIF-analízisek során esetenként szerkezetileg távoli molekulák is igen közeli MIF-szomszédságba kerültek. Ez számunkra megmutatta, hogy a MIF képes a molekulák a szerkezeti információn túlmutató, komplexebb tulajdonságainak felismerésére. (A molekulák szerkezeti hasonlóságának megállapításához JChem Base szoftvert használtuk [5].) Úgy gondoljuk, hogy a *MIF DataBase*, illetve annak motorjával szolgáló MIF eljárás jelentős áttörést fog eredményezni a molekulák élettani hatásainak felderítésében, továbbá már ismert gyógyszerhatóanyag-molekulák új terápiás alkalmazási területeinek felderítésében.

Irodalomjegyzék

- [1] Hetenyi, C., Maran, U., Karelson, M. (2003) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**: 1576–1583.
- [2] Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998) *J. Comput. Chem.*, **19**: 1639–1662. <http://www.mifdb.com>
- [3] Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., Woolsey, J. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: D668–D672.
- [5] JChem Base 3.2., 2006, ChemAxon, Budapest, Hungary

Negyvenéves az ELTE Biokémiai Tanszék

Szeptember elején az ELTE Biológiai Intézetének Biokémiai Tanszéke emlékülést szervezett a tanszék alapításának 40. és az alapító professzor, Bíró Endre halálának 20. évfordulójára emlékezve. Az oldott hangulatú összejövetel első felében a tanszék múltját és Bíró Zebi (ahogy barátai hívták) emlékét idézték fel az előadók: Szent-Györgyi András (a bostoni Brandeis Egyetem emeritusz professzora, az MTA tiszteletbeli tagja), aki Bíró Endre első munkatársa volt Szent-Györgyi Albert budapesti laboratóriumában, „Kezdet és szellemi atmoszféra” címmel emlékezett; Gergely János (a bostoni *Biomedical Research Institute* nyugalmazott igazgatója, az MTA tiszteletbeli tagja) a Bíró iskolának az aktomiozinkutatásban elért eredményeit méltatta; Mührlád András (a jeruzsálemi Hebrew Egyetem nyugalmazott professzora) a Tanszék 1957-től 1968-ig tartó „előéletét” mutatta be; végül Gráf László professzor (az MTA rendes tagja), aki Bíró Endre után 21 évig vezette a tanszékot, szórakoztatta a szép számban összegyűlt közönséget és emlékezett „a boldog szép napokra”.

Az emlékülés második felében a tanszék munkatársainak tudományos előadásai hangzottak el. A va-

laha egy-, majd kéttémás tanszék, amelyet a Bírőkorszakban az izombiokémiai, majd a Gráf-korszak nagy részében a szerin proteázok és inhibitoraik kutatása fémjelzett, mai tíz kutatócsoportjával már sokkal szélesebb kutatási palettán dolgozik. Jőmagam, aki egy éve vettem át a tanszékvezetés stafétáját, az „egyszerűséget dicsértem”: a miozinnok egyszálú és kétszálú α -hélix szerkezeti elemeivel kapcsolatos eredményeinkről számoltam be. A tanszék negyvenéves történetének két, még aktív szemtanúja közül Hegyi György a „gúzsba kötött” aktinfilamentumok viselkedéséről beszélt, míg Szilágyi László a „miozin limitált proteolízisétől a proteázok mutagenéziséig” terjedő kutatásait foglalta össze. Az emlékülésen is bemutatkozó munkatársaim többségének eredményeiről a *Biokémia* olvasói e szám hasábjain részletesebb beszámolókat is olvashatnak. A további két kutatócsoport közül Reményi Attila a protein kinázok és az állványfehérjék szerkezeti viszonyát kutatja (ld. *Biokémia* (2007) **31**: 42–46), míg Kardos József az amiloid fehérjék kialakulását és tulajdonságait vizsgálja.

A Biokémiai Tanszék 40 évének szakmai teljesítményét és oktatási feladatait tekintve tanszékünk oktatja, ma már a kétlépcsős BSc- és MSc-képzés keretében, a több száz biológus- (valamint kisebb számú kémikus- és biofizikus-) hallgató részére a biokémia és molekuláris biológia, géntechnológia, valamint fehérjetudomány kötelező tárgyakat, ezenfelül tucatnyi választható kurzust. Kiemelendő, hogy a rekombináns DNS-technikák oktatását külön tárgyként az országban először mi vezettük be, a nyolcvanas évek második felében. A tanszékhez köthető az ELTE Biológus doktori iskola egyik legnagyobb

(Gráf László vezette), „Szerkezeti biokémia” nevű programja. A tanszék munkatársainak közreműködésével összesen 266 angol nyelvű közlemény (amelynek a fele az utolsó 10 év termése), 121 egyetemi szakdolgozat, 27 egyetemi doktori, kandidátusi és akadémiai doktori, valamint 25 PhD-disszertáció született. A tanszék munkatársai közül korábban 6 Széchenyi professzori ösztöndíjas volt, jelenleg 4 Bolyai János kutatási ösztöndíjasunk van. További részletek olvashatók az emlékülés alkalmával megjelent kiadványunkban (<http://biokemia.elte.hu/kiadvany>).

Nyitrai László

A harmadik időszak kezdetén

*Harmickét éves lettem én –
s elbúcsúzom, mint közlemény,
papírlapi...*

mormolhatná folyóiratunk mélabúsan egy laboratóriumi szegleten, visszatekintve emberöltőnyi léte emlékeire. Harmickét év után ez a *Biokémia* utolsó papírra nyomtatott száma, ezt követően a periodika már csak az interneten lesz elérhető.

Nem mintha most kerülne a folyóirat a világhálóra: az 1998 óta napjainkig megjelent számok fent vannak az egyesületi honlapon. Most azonban megválnak a – költséges – nyomtatott alaktól, s a *Biokémia* a jövőben internetes folyóiratként él tovább. Mondhatni, harmadik korszak indul hát a folyóirat életében: a Hőskor, majd a Korszerűség Kora (lásd Gráf L., lejjebb) után a Világháló Kora.

A Hőskor valóban a hőskor volt. A Magyar Kémikusok Egyesületéből „lefűződő” egyesület és folyóiratának alapítása, mely utóbbi szorosán és elidegeníthetetlenül kötődik Bagdy Dániel nevéhez, a lap odaadón megszállott alapítójáéhoz, aki huszonegy évig végezte a felelős szerkesztő áldozatos munkáját. Az induló folyóirat súlyát nemcsak az adta, hogy egy újonnan alakult egyesület tájékoztatójaként hívták életre, de az is, hogy jószerivel az egyetlen olyan sajtóanyag volt, amely szakmai kommunikációs csatornát teremtett a nagyvilágtól akkor, a mai viszonyokhoz képest még – legalábbis politikai értelemben – lényegesen elszigeteltebben működő, és publikációs technikai lehetőségeiben is

szerényebb eszközökkel rendelkező magyar biokémiai szakma számára. E küldetés fáradhatatlan motorjaként dolgozott Bagdy Dániel. Különös, ugyanakkor impozáns a kontraszt a lap pezsgő szakmai színvonala és akkori, stencilezett külalakja között.

A stafétabotot 1998-ban vettem át Bagdy Dánieltől, aki részint idős kora, de sokkal inkább az egyesület belső átalakulása miatt leköszönni kényszerült. Akkor még csak három éve voltam a szerkesztőbizottság fiatal, ámde aktív tagja, s a magam részéről úgy éreztem, az első perctől kezdve élvezhettem Dani bácsi bizalmát, és kényszerű visszalépése miatt rossz érzést irányomban nem táplált. Nagy veszteség volt, hogy alkotó közreműködésére nem számíthatott tovább a folyóirat, és különösen fájdalmas, hogy alig több mint egy évvel leköszönése után végleg eltávozott közülünk. Ahogy Gráf László találóan fogalmazott nekrológiájában: „a Biokémia Bagdy Dánielnek a felelős szerkesztői posztról való távozását követően korszerűbbé vált ugyan, elvesztette azt a különös varázst, amely az ő egyéniségéből áradt”.

Az elkövetkező tizenegy év temérdek – elődömhöz hasonlóan társadalmi munkában végzett – tenni-valóval telő, örömteli időszak volt. A folyóirat „új” profilja megújuló alaki megjelenésével párhuzamosan alakult ki. Arra törekedtünk, hogy – a szerkesztés korábbi értékeit megtartva – bemutassuk a hazai biokémiai műhelyek munkáját, eközben lehetőséget teremtsünk a bemutatkozásra fiatal, pályakezdő kutatóknak. Talán az egyetlen „hungarikumkövetmény” annyi volt, hogy legyen a közölt munkáknak

magyar vonatkozása, akár azért, mert megírója magyar vagy magyar származású, mert az eredmények hazai kutatócsoportokkal együttműködésben készültek, de az is adhatta az apropót, hogy a szerző kiemelkedő hazai elismerésben részesült. Akár így, akár úgy, igyekeztünk a legszínvonalasabb szakmai eredményekről (is) számot adni a lapban. Hogy ezt mennyiben sikerült elérni, döntse el az Olvasó. Ehelyütt álljon csupán egy hevenyészett összefoglaló: 1998 óta 1160 oldalon 103 szócikket (köztük 11 rövid közleményt) közzeltünk, s emellett 44 általános publicisztikai írás, 57 rendezvény- vagy konferenciabeszámoló, 38 könyv recenziója, 12 technológiasmertető, 11 különféle szakmai díj odaítélését méltató írás és sajnos 14 nekrológ látott napvilágot. Szerzőink között nem csupán a hazai biokémiai kutatás nagyjait találjuk, de számos világhírű külföldi (vagy külföldön élő magyar) kutató, köztük három Nobel-díjas is írt szócikket a lapba. Szívmelengető személyes emlék visszagondolni Avram Hershko, Aron Ciechanover vagy éppen Lányi János szívélyes soraira cikkeik megjelenését követően, s tudtommal 2002. márciusi számunk borítója a mai napig büszkén díszelg Julius Rebeck professzor igazgatói irodájának falán a Scripps Intézetben, a kaliforniai La Jollában. Nem csupán formai változtatás okán lényegében 1999 óta megfeleltünk az *Institute for Scientific Information* (ISI) tudományos impakt faktor nyilvántartásához szükséges valamennyi formai szabálynak, s „csupán” az egyesület Intéző Bizottságának döntése volt, hogy nem pályáztunk arra, hogy az ISI hivatalosan nyilvántartsa a lapot. (A vezetőségi döntés – 2000. évben – úgy szólt, hogy jobb a hazai biokémiai szakma egyetlen magyar nyelvű, ha nemzetközi szinten nem is jegyzett fórumának lenni, mint a nemzetközi folyóirat-áradat egy, mondjuk, 0,05-ös impaktfaktorú tagjának.)

A folyóirat profiljához lazán illeszkedő, többé-kevésbé állandó rovatként honosítottam meg a *Művészsarok* szekciót, amelyben XX. századi és kortárs modern képzőművészeket szerepeltettem Aba-Novák Vilmostól vagy Lossonczy Tamástól Závodszy Ferencig vagy Kó Boldizsárig (összesen 34 alkalommal). A rovatot, melyben munkahipotézise szerint a természettudomány és a képzőművészet kapcsolatát törekedtem boncolgatni (már amikor ez sikerült), a hazai tudományos élet rangos eseménye indította meg: az MTA 1998-as közgyűlésén Marosi Ernő akadémikus foglalkozott „*A tudomány és a mű-*

vészet közötti diskurzus lehetőségével” (*Biokémia*, XXII (4): 77, 1998). Ha mást nem, egyet biztosan sikerült bemutatni az évek során: a tudományos kutatás is teremt vizuális esztétikai értéket, melyről ránézésre nem tudhatjuk, tudományos vagy művészi alkotással van-e dolgunk. Ilyen szakmai illusztrációt nem egyszer volt módunkban közzélni, számomra a legkedvesebb mégis talán a 2001. júniusi számunk Kiss Ibolyától (SZBK) kapott címlapképe.

A kiadás pénzügyi lehetőségei kezdetben kedveztek a folyóirat mindezen bővítéseinek. Nemcsak állami és alapítványi támogatásért pályáztunk sikerrel, hanem több kereskedelmi cég is állandó hirdetője volt a lapnak. Utólag is köszönet illet ezért sokakat, például az Applied Biosystems, a Sigma-Aldrich vagy a Bio-Science Kft. cégeket (hogy csak hármat említsek). Ilyen módon a lap 1999-től lényegében önfenn tartóvá vált, sőt anyagi hasznot hozott az egyesületnek. Mindez megmutatkozott a terjedelmen (egy-egy számok 36 oldalon jelenhettek meg) és abban is, hogy színes belíveket is megengedhettünk magunknak. Sajnos azonban a pályázati források elapadtak (utoljára az OTKA publikációs támogatás 2003-ban), s a hirdető is fokozatosan visszaléptek. Utóbbi üzleti szempontból érthető: a *Biokémiában* elhelyezett szakmai anyagok legfeljebb termékismertetésnek nevezhetők, kereskedelmi értelemben nem megterülő hirdetések. Ennek tudatában a cégek afféle támogatásként fizették a hirdetési díjakat, amíg tehették. 2006-tól sajnos már csak két állandó hirdetőnk maradt, a Kvalitex Kft. és az Aktivit Kft. Köszönet lan- kadatlan támogatásukért!

A folyóirat szerzőit is köszönet illeti. Az egyre nehezedő pénzügyi helyzetben arra kényszerültünk, hogy anyagi hozzájárulást kérjünk a színes címlapképekhez. Sokan nyújtottak publikációs támogatást ilyen címen, ehelyütt szerepeljenek ábécérendben: Csermely Péter (SOTE), Fónagy Adrien (NKI), Jékely Gáspár (Max Planck Institut), Keserű György (Richter Rt.), Kiss Anna (SOTE), Kiss Ibolya (SZBK), Kolev Kraszimir (SOTE), Mandl József (SOTE), Méhes Előd (SZIE), Nagy László (DE), Novák Béla (BME), Nyitray László (ELTE), Perczel András (ELTE), Poppe László (BME), Puskás László (SZBK), Rákhely Gábor (SZE), Julius Rebeck (Skaggs Institute), Reményi Attila (ELTE), Sallai László (SOTE), Sümegi Balázs (PE), Szabad János (SZE), Szarka András (BME), Székács András (NKI), Tompa Péter (Enzimológiai Intézet), Tyihák Ernő (NKI),

Vértessy Beáta (Enzimológiai Intézet), Vonderviszt Ferenc (Pannon Egyetem).

De hiába az erőfeszítés: a folyóirat mind kisebb mértékben volt képes megtermelni saját önköltségét, így 2005 óta egyre nagyobb anyagi terhet rótt az egyesületre. Az, amíg lehetett, igyekezett a folyóiratot fenntartani, de a helyzet végül elvezetett az egyesület közgyűlésének s utóbb Intéző Bizottságának ahhoz a döntéséhez, hogy a folyóiratot a jövőben nyomtatott formában nem adja ki, és ezzel megtakarítja mind a nyomdai, mind a postaköltségeket. Piaci értelemben a döntés érthető és kényszerű, én azonban a főszerkesztői munkát a továbbiakra már nem vállaltam, mivel úgy gondolom, hogy a nyomtatásban megjelenő *Biokémia* megszűnése pótolhatatlan veszteség: ez volt a szakterület egyetlen olyan hazai fő-

ruma és nyomtatott hírmondója, amely nemcsak aktuális információs csatornaként szolgált (ezt ellátja majd az internetes verzió is), hanem kor- és tudománytörténeti dokumentum is volt, melynek révén egy évszázad múltán is visszatekinthet és képet alkothat majd az érdeklődő a korszakról.

Mi lesz a lap jövője? Elektronikus formájában folyóirat marad, vagy hírlevéllé alakul? Mindezt a jövő dönti el, s a magam részéről azon leszek, hogy új alakjában is tartalmas legyen. Ám így, a nyomtatott korszak végeztével, a felelős szerkesztői posztot átadva utódomnak, Szűcs Máriának, szomorúan búcsúzom az Olvasóktól. Öröm volt Önöket szolgálni.

Székács András
felelős szerkesztő

Folytatása következik...

Amint Székács András írásából a Tisztelt Kollégák értesülhettek, 2008-ban a MBKE vezetősége az egyesület közgyűlésének döntésére alapozva úgy határozott, hogy megszünteti a *Biokémia* folyóirat nyomtatott formájának kiadását. A folyóirat nem szűnik meg, hanem – számos nemzetközi folyóirathoz hasonlóan – elektronikus formában jelenik meg. Az Intéző Bizottság tagjai természetesen nem örömmel döntöttek a nyomtatásban megjelenő folyóirat megszűnéséről, a döntést kizárólag anyagi szempontok motiválták. Sajnálatos módon a folyóiratot támogató hirdetőik száma az utóbbi években megcsappant, ami oda vezetett, hogy a *Biokémia* kiadásának az egyesületet terhelő költséghányada 2008-ban már évi 1,4 millió forintra rúgott. Összehasonlításként szeretnénk megjegyezni, hogy a tagdíjakból befolyó éves bevétel 1 millió Ft körül alakul.

A *Biokémia* papírra nyomtatott formája 32 év után szűnik meg. Ez nyilvánvalóan sok szempontból veszteség az egyesület számára, hiszen sok tagtársunk számára ez volt az egyesület működésének „kézzel fogható” formája. Székács András leköszönő főszerkesztő 1998-ban vette át a posztot. Elődje, Bagdy Dániel legendás szakmaszeretete, lelkesedése és áldozatvállalása egyesületünk történetének szerves részévé vált. Az utóbbi 10 év alatt a *Biokémia* a kor kihívásainak megfelelően újult meg mind külső formájában, mind belső tartalmában. A könyvrecenziók és a publicisztikai írások mellett több mint 100

szakcikk jelent meg, lehetőséget adva a bemutatkozásra minden kutató számára, a legfiatalabb korosztálytól kezdve a Nobel-díjjal elismert tudósokig. Az egyesület vezetősége ezért hálás köszönetét fejezi ki ezúton is Székács Andrásnak állhatatos, színvonalas munkájáért. Bízunk benne, hogy – mint a Szerkesztőbizottság tagja – továbbra is segíteni fogja szakmai tapasztalataival az újság megjelenését.

Az egyesület vezetősége eltökélt abban, hogy a folyóirat értékeit megőrizze, sőt, kihasználva az elektronikus kiadás előnyeit, tovább fejlessze. Ennek része, hogy megbízást adott Szűcs Máriának (SZBK, Biokémia Intézet) az új formátumú lap főszerkesztői posztjára, aki nagy lelkesedéssel kezdte el munkáját. Tervei között szerepel a hazai műhelyek, iskolák, illetve kiváló kutatóink bemutatása, visszaemlékezések megjelentetése, kiemelkedő publikációk méltatása, illetve beszámolók hazai és nemzetközi konferenciákról. Természetesen szakcikkek megjelentetésére továbbra is lehetőség van. Ugyanakkor az *online* megjelenés lehetőséget ad arra is, hogy hirdetések, konferencia- és pályázati információk is rövid határidővel eljussanak a tagtársakhoz. Az egyesület vezetősége bízik abban, hogy a *Biokémia* nyomtatott formában történő megszűnése összességében nem veszteség lesz az egyesület számára, hanem új, a XXI. századi lehetőségekkel élő korszak nyitánya.

Fésüs László
elnök

Buday László
főtitkár



Stefanovits Péter, *Nő a laborban I.* (1998), szita és litográfia

dada akadémián nőtt fel / a tudós ki így / vizsgálja a nőt (Gaál József)

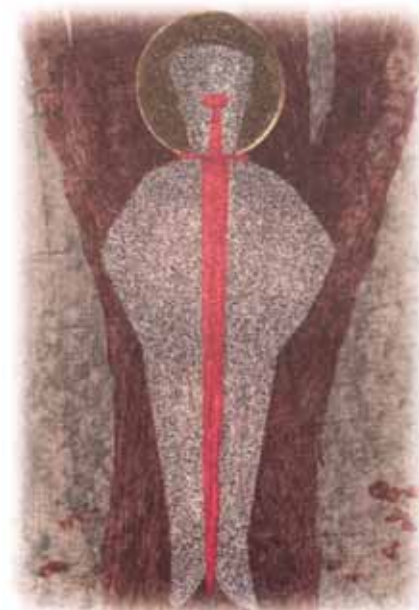


Stefanovits Péter, *Nő a laborban VI.* (1998), szita és litográfia

bolyhos hiány varázs / a groteszk hárpia / mint ázott köpeny / vesszőfutó libabőrben (Gaál József)

Stefanovits Péter 1978-ban végzett a Magyar Képzőművészeti Főiskola sokszorosító grafika szakán, mesterei Raszler Károly és Rozanits Tibor. Alkotásai megtalálhatók a Magyar Nemzeti Galéria, a pécsi Janus Pannonius Múzeum Modern Képtára, a Miskolci Galéria és a Herman Ottó Múzeum, valamint a győri Xantus János Múzeum és Városi Képtár közgyűjteményeiben. 1977 óta rendszeresen szerepel egyéni és csoportos kiállításokon, Jelenleg a Nyugat-Magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központjának docense, valamint grafikai

technikákról oktat szakmai továbbképzéseken. Főbb kitüntetései: Derkovits-ösztöndíj (1984, 1986), Munkácsy-díj (1997), a Magyar Festők Társaságának díja (1998). Pataki Gábor így méltatja: „Stefanovits egész eddigi pályafutásán végig érzékelhető, hogy a technikai perfekció sohasem volt számára öncél, a magyar grafika kondori-csohányi, közösségre apelláló etikai kérdésekkel vívódó szemléletének öröksége szinte mindvégig kimutatható lapjain.” Több mint húszéves pályáján korai munkái a magyar grafika szürrealis tradícióihoz kötődnek, kompozíciós megoldásai pedig a montázsokét idézik: különböző kvázi naturális



Stefanovits Péter, *Átszűrődés II.* (2000), számítógépes grafika

fragmentumok, tárgymorzsaik rajzaiból építi fel kompozícióit. Legújabb, posztmodern szemléletű grafikáit a jelképek uralják, ezekben az egyedi rajzot és a különböző grafikai applikációkat vegyíti, s számos munkájában sajátos humora is megnyilvánul. Érdeklék a múlt (kivált a magyar öskultúra) jelképei, valamint az archaikus/archetipikus motívumok, de foglalkoztatja a természettudomány is (a vegyészettel családon belül is kapcsolatba került), Leírás sorozatában a kémiai kísérlet szöveges leírását és műszaki sémáját vonja össze egyedi tablókban, s személyesen fontosnak tartott *Nő a laborban* sorozatában kontrasztba állítja a – századfordulós – műszaki ábrák bemutatása hideg szerkezeteket az organikus–élő–nőies formák rugalmas, hajlékony, plasztikusan színes alakzataival.



Stefanovits Péter, *Leírás I.* (1991), vegyes technika



Stefanovits Péter, *Beavatkozás* (2007), digitális nyomtatás, vászon

KÖRNYEZETVÉDELEM - VIZANALITIKA

MŰSZEREK - VIZANALITIKA
TEREPI, LABOR- ÉS ON-LINE
MÉRÉSTECHNIKA

CEC A. BERLIN



PARMÉTEREK:

- teljes paraméter mérés
- online mérés
- online jelzés
- online adatmentés
- online adatkezelés
- online adatkiértékelés
- online adatkiadás
- online adatnyelvtámogatás
- online adatkiírás
- online adatnyelvtámogatás
- online adatkiírás
- online adatnyelvtámogatás
- online adatkiírás

PROFESSIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA

MŰSZEREK - VIZANALITIKA
TEREPI ÉS LABORATORIUMI
MÉRÉSTECHNIKA

CEC A. BERLIN



PARMÉTEREK:

- pH
- oxidálós potenciál
- vezetőképesség
- szilikium
- ammónium
- ammóniacion
- ammónium-nitrit
- ammónium-nitrát
- ammónium-totál
- ammónium-nitrit
- ammónium-nitrát
- ammónium-totál
- ammónium-nitrit
- ammónium-nitrát
- ammónium-totál

PROFESSIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA

Vizanalitika

egyszerű
flexibilis

HAUSDORFER 500 D

Vizanalitikai fotométer

- automatizált adatgyűjtés
- memóriájában 1000 adatot tárolhat
- USB interfész csatlakoztatás

MACHEREY-NAGEL GmbH, Duren

VIZUÁLIS GYORSTESTEK

**Egyszerű
Kompakt
Megbízható**

HAUSDORFER Vízanalitikai tesztesetek

- praktikus tesztesetek számos paraméterre
- mobil vízvizsgáló készletek 1000 paraméterre
- vizuális és fotometriai kiértékelés

MACHEREY-NAGEL GmbH, Duren

SZÜRŐPAPÍROK
SZÜRŐKARTONOK
MEMBRÁNSZÜRÖK

A MACHEREY-NAGEL szűrőanyagok a legmagabbb szintű tisztaságot és biztonságosságot biztosítanak.

MACHEREY-NAGEL GmbH, Duren

össz-N & TC / TOC tartalom automatizált mérése iszapokból
1 ppm...100% elemtartalomra
Néhány perc alatt—teljes automatizációval

SAATCHI Vario MAX

C-H-N-S-TiC-TOC

Elementar GmbH. elemanalizátorok
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

AOX, EOP, POX és AOS mérése
Aktív szerves oxidálószer (AOX) és halogénvegyületek (EOP, POX, AOS) szerves anyagok meghatározására.

BEHR CI-10

VARIO analízátor család
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

Elementar GmbH. elemanalizátorok
1 ppm...100% elemtartalomra
C-H-N-O-S-CI

VARIO analízátor család
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

KVALITATIV TESZTPAPÍROK
PH - PAPIROK
TEHETSÉGVÉNY

MACHEREY-NAGEL GmbH, Duren

NAGYOBB TELJESÍTMÉNY KISEBB MÉRETBEN

liquiTOC II

Magas hőmérsékletű TOC és TN,
1 KÉSZÜLKÉKKEL 6 PARAMÉTERT

MACHEREY-NAGEL GmbH, Duren

PROFESSIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA ELÉRHETŐ ÁRON

AKTIVIT Kft.
1145 Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: +36-(1)-470-0125, 221-7865.
Fax: 252-9940, Mail: info@aktivit.hu, web:www.aktivit.hu
Környezetvédelmi műszerek, analitikai eszközök

Elementar GmbH. elemanalizátorok
1 ppm...100% elemtartalomra
C-H-N-O-S-CI

VARIO analízátor család
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

MEGBÍZHATÓ EREDMÉNYEK A TEREPEN
CSÚCSMINŐSÉGŰ ESZKÖZÖKKEL

AKTIVIT Kft.

MŰSZEREK - VIZANALITIKA
ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

MULTI-PARAMÉTERES MULTI-MÉRŐHELYES

VARIO analízátor család
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

Deszilláció, extrakció, temoreakció
behr
Labor - Technikum

AUTOMATA KDI analízátor
MSZ ISO 6080 szabvány
15 liter/h

AKTIVIT Kft.

ULTRA TISZTA VÍZ
CSAPVÍZBŐL TRÓPINKÉNYŐKÖZEL

EASYpure direct RoDi

RODI TISZTÍTÁS

- Kompakt
- Egyszerű
- Hatékony
- Kétfázisú áram

TOC < 5 ppb

18,2 Mg/Ø2m cm

ASTM Typ I minőségű víz

IKA

össz-N & TC / TOC tartalom automatizált mérése iszapokból
1 ppm...100% elemtartalomra
Néhány perc alatt—teljes automatizációval

SAATCHI Vario MAX

C-H-N-S-TiC-TOC

Elementar GmbH. elemanalizátorok
ELEMANALIZIS FELSŐFOKON

AUTOMATA VÍZMINTAVEVŐ BERENDEZÉSEK ÉS MÉRŐÁLLOMÁSOK

HORDOZHATÓ MINTAVEVŐK
TELEPÍTETT MINTAVEVŐK
EGYEDI KIALAKÍTÁSOK
MÉRŐÁLLOMÁSOK

nyomott vezetékbeli csatornából mélyvíznél

- PASZTÁBOR
- ISZAPGÖL
- VÍZGÖL

AKTIVIT Kft.

160

KERN

MÉRLEGEK SÜLYSOROZATOK

Magyar katalógus

AKTIVIT Kft.

NITRÓGEN / PROTEIN tartalom mérése
Dumas módszer szerinti égetéssel, automata analízátorokkal

VARIO MAX

A Dumas módszer előnye:

- kényszerűen az első helyen
- nagy mintabiztonság: 1-5 g
- pontos ismételt mérés
- egyszerű pontosság
- felgyűjtött minta
- fokozott higiénia
- gyors (8 perc)
- robotizált

LABORTECHNIKA, ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

NE KERESSE TOVÁBB, MEGTALÁLTA!

FINNZYMES ÉS NEW ENGLAND BIOLABS ENZIMEK
BUDAPESTI ÉS SZEGEDI RAKTÁRUNKBÓL!

