

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XXXVI. ÉVFOLYAM 2. SZÁM 2012. június



BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Keserű György, Kiricsi Mónika (titkár),
Nyitray László, Sarkadi Balázs, Székács András, Szondy Zsuzsa, Váradi András

Főszerkesztő:
Szűcs Mária

Technikai szerkesztő:
Márki Árpád

XXXVI. ÉVFOLYAM 2. SZÁM

2012. június

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: *A FEBS3+ konferencia, Opatija pillanatai*

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

- Az MBKE tagjainak legújabb elismerései 3.
- Bemutatkozik a Magyar Érdemrend lovagkeresztjével kitüntetett Orosz Ferenc 4.
- Pál Gábor, az ELTE Innovatív Kutatója díj és a Bolyai-plakett nyertese 9.

HAZAI TUDOMÁNYOS ISKOLÁK

- Bemutatkozik az ELTE TTK Biokémiai Tanszék 21.
- Harami Gábor, Gyimesi Máté, Kovács Mihály: A kulcstól a bulldózerig: szárnyas hélix domének funkcionális adaptációja DNS-kötő fehérjékben 30.
- Kiss Bence és Nyitray László: A kuplung felengedése: az S100A4 – miozin IIA kölcsönhatás és a sejt migráció 42.
- Simon Zoltán, Peragovics Ágnes, Málnási-Csizmadia András: Gyógyszerprofil-összevetés: a polifarmakológia lehetőségei 51.
- Zeke András, Garai Ágnes, Reményi Attila : Mitogén-aktivált protein kináz kötő lineáris motívumok azonosítása szerkezeti alapon 64.

AKTUALITÁSOK

- Nyitray László: A 70 éves Gráf László köszöntése 72.
- Reményi Attila: Így kezdődött ...22 évvel ezelőtt... 75.
- Szilágyi László: Az első mutáns a Puskin utcából 77.
- A BIO-SCIENCE Kft. pályázatának eredményhirdetése 80.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

- Kiss Bernadett, Németh Áron, Sevelle Béla: Algák a fehér biotechnológiában 83.

KONFERENCIA HIREK

- FEBS3+, Opatija 90.
- Az MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály 2012 évi munkaértekezlete, Balatonöszöd 92.
- Egy héten át Szeged a Nobel-díjasok városa volt 94.
- A 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 96.
- A Peptidkémiai Munkabizottság 2012. évi ülése, Balatonszemes 98.
- MBKE Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája 101.
- IUBMB & FEBS, Sevilla, 2012 102.

TUDOMÁNY ÉS MŰVÉSZET

- Gráf László: Az Intézet, 1965 (esszé) 103.
- Gráf László: „Hajnali részegség” (fotóválogatás) 107.

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6, <http://www.mbkegy.hu/>

Felelős kiadó Dr. Fésűs László

Az engedély száma III/SZI/397/1977, HU ISSN 2060 8152 (Online)

HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)



AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI

A kiemelkedő magyar tudományos eredmények iránti társadalmi megbecsülés megnyilvánulásaként tizenkét akadémikus és az MTA öt doktora vehette át a tudományok, a kulturális és a művészeti alkotások, a kutatás, a gyógyítás, illetve a műszaki fejlesztés terén elért kivételesen magas színvonalú eredményeiért a 2012. évi **Széchenyi-díjat**. **Kondorosi Éva**, biológus, a Magyar Tudományos Akadémia levelező tagja, a Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézet igazgatója részére világszerte elismert, a növény-baktérium kölcsönhatás természetének kutatásában elért alapvető felfedezéseiért, a sejt-ciklust szabályozó géncsalád felismeréséért, nemzetközi tudományos-közéleti tevékenysége elismeréseként kapta a díjat.

A **Magyar Érdemrend lovagkeresztje** kitüntetésben részesült **Orosz Ferenc**, az MTA doktora, az MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet tudományos tanácsadója a gyógyszerkutatásban elért jelentős, egy új kalmodulin-antagonista, a KAR2 molekula hatásmechanizmusának azonosításával kapcsolatos eredményeiért, valamint az idegrendszeri megbetegedések terén végzett kutatómunkájáért.

Az ELTE Innovatív Kutatója díjat 2012-ben **Pál Gábor**, a Biokémiai Tanszék egyetemi docense vehette át. Az elismerést a komplement rendszert gátló fehérjék evolúciós létrehozása terén elért kiemelkedő eredményeivel érdemelte ki. Pál Gábor 2012-ben elnyerte az MTA által adományozott **Bolyai-plakettet** is.

Az idén negyedik alkalommal meghirdetett **Lendület pályázaton** 132 kutató indult, közülük 37-en alapíthatnak 1,25 milliárd forintos támogatásból önálló kutatócsoportot az akadémiai kutatóintézetekben és az egyetemeken a Lendület-program keretében. A kiemelkedően sikeres tudósoknak meghirdetett Lendület III. kategóriában támogatást nyert **Nagy László** (Debreceni Egyetem) Transzkripció interakciók a makrofág polarításban betegségben és egészségben; a Lendület II. kategóriában **Fuxreiter Mónika** (Debreceni Egyetem) Rendezetlen fehérjék terapeutikus alkalmazása; **Józsi Mihály Krisztián** (ELTE) A komplement H faktor szerepe egészségben és betegségben; **Pál Csaba** (MTA SZBK) A kórokozók ellenállásának evolúciója: integrált megközelítés; **Tusnády E. Gábor** (MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet) A transzmembrán fehérjék szerkezetének vizsgálata újfajta bioinformatikai eszközökkel című tudományos programjával.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

HÁROM ÉVTIZED A KAROLINA ÚTON



A Magyar Érdemrend lovagkeresztje kitüntetés átvételekor az MTA-nak adott nyilatkozatomban a következőképpen fogalmaztam: „Büszke vagyok arra, hogy az akadémia egyik legszebb hagyományokkal rendelkező és ma is egyik legjobb intézményében, az Enzimológiai Intézetben dolgozhatom immáron pontosan három évtizede.”

Kutatói pályám teljes egészében az MTA Enzimológiai Intézetéhez kapcsolódik. (Az intézet történetéről szóló, személyes tapasztalataim alapján is íródott cikkemmel a *Biokémia* újság 2011. decemberi számában találkozhatott az olvasó.) Harmadéves vegyészhallgatóként 1980-ban léptem át először az akkor már 20 éve Straub F. Brunó által vezetett Karolina úti intézet küszöbét, mint Szabolcsi Gertrud „Enzimek szerkezete és funkciója” speciális kollégiumának hallgatója. A következő évben Keleti Tamás előadásait hallgattam, az „Enzimkinetika alapjai” címmel, amelyekkel a gyakorlatban is megismerkedtem a biokémiai szaklabor keretében. Ötödévben a szakdolgozatomat is itt készítettem, Ovádi Judit témavezetésével. Ekkor még mindig, de már nem kizárólagosan az intézetalapító Szörényi Imre által megszabott pályán, a szerkezet-funkció paradigma keretében folyt a kutatás (Szabolcsi és Keleti is az ő tanítványai voltak), melynek tárgyai is még nagyrészt, mint korábban is, a glikolitikus enzimek voltak. Ennek ellenére a diplomamunkám egészen más témában, egy gyógyszergyári megbízás keretében a digitalis glikozidok enzimatiszta átalakításához kapcsolódott. Nem volt ez idegen számomra, hiszen az ELTE vegyész szakán gyógyszerkutatói szakágazati képzésben vettem részt, ahol a farmakokinetikától a szabadalomírásig sokféle előadást hallgattunk, többek között a vezető gyógyszergyárak kutatóitól is. S nem utolsósorban biokémiát és sejtant is. Mindezt nem a kémiai tárgyak helyett, hanem ráadásként.

Ez a gyógyszeripari téma négy szabadalmat, egy cikket és 1987-ben Akadémiai Ifjúsági Díjat hozott. A gyógyszerkutatáshoz kapcsolódó vagy általa ihletett témák a későbbiekben is fontos szerepet töltek be munkámban, a Chinoin és a Richter kutatóival való együttműködésben. Párhuzamosan bekapcsolódtam a glikolitikus enzimek kölcsönhatásainak vizsgálatába is, továbbra is Ovádi Judit munkatársaként, aki akkoriban alakított önálló csoportot. (A hosszabb külföldi tanulmányutakat leszámítva - sorrendben: Róma; Riverside, CA; Galveston, TX; Madrid; Barcelona - azóta is az általa vezetett Sejtarchitektúra-csoportban dolgozom.) A téma néhány évvel korábban kezdett teret nyerni az intézetben, nagyrészt az ő kezdeményezésére is. Ún. „rekonstituált” rendszerekben fizikokémiai és enzimkinetikai módszerekkel tanulmányoztuk a tisztított enzimek komplexképződését és ennek funkcionális következményeit. Ezek a kölcsönhatások viszonylag gyengék és tranziensek, ezért sokáig kétségbe vonták a fiziológias jelentőségüket. Hamar meg kellett szoknom az olyan cikkeket, hogy „in contrast to Ovádi and co-workers”. A kölcsönhatások legérdekesebb funkcionális következménye az ún. csatornahatás, vagyis egy konszekutív enzimreakcióban az intermedier (az első enzim terméke, ami a második enzim szubsztrátja) köz-

vetlen átadása az aktív centrumok között (Orosz és Ovádi, 1987). Ez a jelenség stabil enzimkomplexek között könnyebben kimutatható, így ott léte elfogadottabb is volt. A 90-es évek közepére azután általánosan is bevetté vált. Ekkor azonban mi már nagyrészt más témákon dolgoztunk.

A gyógyszerkutatásból kiinduló következő téma a kalmodulinantagonisták vizsgálata volt. A kalmodulin egy kisméretű, a sejt kalciumkoncentrációjának változására nagyon érzékenyen reagáló másodlagos hírvivő molekula. Mivel számtalan kölcsönható partnere van (többnyire enzimek, amelyeket aktivál), így szelektív antagonisták előállítása jelentős kihívás. Első érdekes eredményünk e téren az volt, hogy olyan enzimet találtunk, a foszfofruktokinázt, amelyet a kalmodulin gátol. Kidolgoztunk egy ezen a kölcsönhatáson alapuló antagonista tesztet, és azonosítottunk egy ún. funkcionális antagonistát, amely terner komplexet képez a kalmodulinnal és a célenzimmal (Orosz és mtsai, 1988, 1990). E munkák alapján védtem meg 1989-ben kandidátusi értekezésemet (Orosz, 1989).

A legtöbbet azonban egy másik, félszintetikus kalmodulinlítő molekula, a KAR-2 hozott a konyhára (Orosz és mtsai, 1997a,b; 1999). Az ezzel kapcsolatos eredmények az MTA doktori disszertációmnak (Orosz, 2004) is meghatározó részét képezték. Az ún. vinka alkaloidok, köztük a KAR-2 anyavegyülete, a vinblasztin is a daganat ellenes terápiában használatosak, és fő támadáspontjuk a mikrotubuláris hálózat. A mikrotubulusok az eukarióta sejtek citoszkeletális vázának egyik filamentumrendszerét alkotják. Dinamikus viselkedésük a sejtosztódás (mitózis) során alapvető jelentőségű, s ezt szüntetik meg az antimitotikus szerek. Felismertük, hogy e molekulák nemcsak depolimerizálják a mikrotubulusokat, de hatékony kalmodulinantagonisták is. A KAR-2 elsősorban ebben a tekintetben különbözik az anyavegyülettől, amivel összefügghet az, hogy állatkísérletekben annál sokkal kevésbé toxikus. Kollégáim röntgenkrisztallográfiával később azt is megmutatták, hogy a két molekulának a kalmodulinon lévő kötőhelye jelentősen különbözik (Horváth és mtsai, 2005).

Közben a glikolitikus enzimekhez sem lettünk hűtlenek. Két korábbi témánkat összekapcsolva, a glikolitikus enzimek és a mikrotubuláris hálózat kölcsönhatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy az enzimek katalitikus aktivitásukon túlmenően kötődésük révén képesek befolyásolni a mikrotubuláris rendszer dinamikáját és ultrastruktúráját; ugyanakkor a kölcsönhatások az egyes enzimek aktivitására és a glikolitikus fluxus egészére is hatással vannak. Az e témában kapott eredményeinket számos cikkben és összefoglaló munkában is közöltük (Ovádi és Orosz, 1996).

Az Országos Hematológiai és Vértranszfúziós Intézettel való együttműködésben kezdtük el vizsgálni egy különleges és igen ritka enzimhiány, a triózfoszfatáz (TPI) -deficiencia molekuláris alapjait. A glikolitikus enzimek defektusai közül ez jár a legsúlyosabb következményekkel; az egyedüli, amelyik progresszív neurodegenerációt okoz, és az esetek túlnyomó többségében kisgyermekkorban halálhoz vezet. Egyedülálló módon, egy beteg magyar testvérpár a többiekhez képest elhanyagolható tünetekkel érte meg a felnőttkort, annak ellenére, hogy mindkét szülőjüktől hibás allélt, egy-egy nonszensz és misszensz mutációt örö-

költek, aminek következtében a fiúk TPI aktivitása töredéke a normálisnak. A tőlük és más betegegektől származó vérmintákat és rekombináns enzimeket használva, enzimkinetikai, fiziko-kémiai és molekulamodellizációs módszerekkel végzett vizsgálatok alapján arra tettünk javaslatot, hogy nem önmagában a csökkent enzimaktivitás, hanem a megváltozott térszerkezet következtében fel-lépő szerkezeti labilitás okozza a súlyos tüneteket (Orosz és mtsai, 2000, 2001). Így a TPI-deficiencia elsősorban nem metabolikus betegség, hanem a konformációs betegségek közé tartozik, mint pl. az Alzheimer- (AD) és a Parkinson-kór (PD) is (Orosz és mtsai, 2006, 2009). A betegség általunk javasolt összetett patomechanizmusa az irodalomban is elfogadottá vált.

Ez már átvezet a csoport jelenlegi témájához, ami a molekuláris neurológia címszóval jellemezhető. Ehhez a témához – egyebek mellett - egy új, általunk azonosított és elnevezett agyspecifikus fehérje, a Tubulin Polymerization Promoting Protein (TPPP/p25) vezetett el (Hlavanda és mtsai, 2002; Tirián és mtsai, 2003). A név a molekulatömeg mellett arra utal, hogy *in vitro* és sejtszinten is elősegíti a mikrotubulusok tubulinból való képződését, majd képes kötegelni is őket. Elég hamar kiderült róla további két karakterisztikus tulajdonsága. Egyrészt, hogy az eredendően rendezetlen fehérjék (IUP, IDP) közé tartozik, másrészt, hogy a PD és más ún. szinukleinopátiák (melyek markerfehérjéje az α -szinuklein) esetén a gliális és neuronális zárványtestekben halmozódik fel (Orosz és mtsai, 2004). A két sajátosság között valószínűleg összefüggés van, mivel a legismertebb konformációs betegségek (PD, AD) hátterében rendezetlen fehérjék (α -szinuklein, illetve tau) aberráns kölcsönhatásai állnak. Újabban saját vizsgálatainkból és másokéból is kiderült, hogy a szinukleinopátiák és a tauopátiák (pl. az AD) markerfehérjéi között „átjárhatóság” van, s nem kivétel ez alól a TPPP/p25 sem (Oláh és mtsai, 2011). Munkatársaim révén fény derült a fehérje fiziológiás szerepére is: normál agyban a neuronok funkcióját biztosító mielin hüvelyt alkotó differenciált oligodendrocitákban fejeződik ki, és fejt ki a mikrotubulusok dinamikáját meghatározó funkcióját, ami az oligodendrociták differenciációjához szükséges (Lehotzky és mtsai, 2010).

A fehérje egy új fehérjecsalád első tagja; némiképp eltérő tulajdonságú paralógjait (TPPP2/p18 és TPPP3/p20) a közelmúltban molekuláris és sejtszinten is jellemeztük (Vincze és mtsai, 2006). A fehérje paralógjainak és ortológjainak *in silico* vizsgálata vezetett ahhoz a felvetéshez, hogy a TPPP fehérjék evolúciósan a csillóval/ostorral rendelkező eukarióta szervezetekhez köthetőek (Orosz és Ovádi, 2008). Azt is megmutattam, hogy a TPPP fehérjék két nagy csoportra (rövid és hosszú) oszthatóak, amelyek még a közös eukarióta ősből válhattak el egymástól, és filogenetikai előfordulásuk jellemző különbségeket mutat (Orosz, 2009). Így pl. állatokban csak a hosszú típus fordul elő. További bioinformatikai vizsgálatok vezettek el egy olyan új gén *in silico* azonosításához, amely a TPPP-re jellemző szekvencia egy része mellett egy ún. doublecortin domént is tartalmaz. Jellemzően egy egysejtű parazitacsaládban, az apikomplexákban, s az egyik legegyszerűbb állatban (korongállatka) fordul elő, s amelyet apicortinnak neveztem el (Orosz, 2009, 2011).

Harmadik éve vagyok az intézet igazgatóhelyettese. Ez a harminc év alatt ala-

posan megváltozott körülmények között is az intézet szellemiségének életben tartására kötelez. Ezt kívánom elősegíteni az intézet történetéről írott cikkekkel is, s ha időm majd engedi, még szeretném e témát folytatni.

Közismert dolog, hogy a természettudományos kutatás csoportmunka. Nincs arra terem, hogy valamennyi társszerzőmnek egyenként köszönetet mondjak. A cikkben leírtakból is nyilvánvaló, hogy pályámon meghatározó szerepe volt Ovádi Juditnak. Rajta kívül az intézeti kollégák közül Vértessy Beátát és Oláh Juditot, valamint Nuridsány Mimit és Hlavanda Emmát szeretném név szerint is kiemelni; a külső partnerek közül pedig Kovács János professor emeritust az ELTE-ről, és Hollán Zsuzsa professzor asszonyt, a Hematológiai Intézet néhai főigazgatóját. Köszönettel tartozom Dr. Nagy Mihály tanár úrnak, aki a debreceni Református Kollégium Gimnáziumában osztályfőnököm és kémiatanárom volt, akinek döntő szerepe volt pályaválasztásomban, s akivel, egy nap különbséggel, együtt vehettem át ugyanazt a kitüntetést. Végül, de nem utolsó sorban feleségemnek és két gyermekünknek, akiknek a mai napig elegendő türelmük van egy kutató rigolyáinak elviseléséhez.

Orosz Ferenc,
tudományos tanácsadó
igazgatóhelyettes
MTA TTK Enzimológiai Intézet
orosz@enzim.hu

Irodalomjegyzék

- Hlavanda E, Kovács J, Oláh J, Orosz F, Medzihradszky KF, Ovádi J. (2002) Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry*. 41:8657-8664.
- Horváth I, Harmat V, Perczel A, Pálfi V, Nyitray L, Nagy A, Hlavanda E, Náray-Szabó G, Ovádi J. (2005) The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *J Biol Chem*. 280:8266-8274.
- Lehotzky A, Lau P, Tokési N, Muja N, Hudson LD, Ovádi J. (2010) Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation. *Glia*. 58:157-168.
- Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozsó Z, Tókési N, Horváth I, Hlavanda E, Kovács J, Magyar A, Szűcs M, Orosz F, Penke B, Ovádi J. (2011) Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 286:34088-34100.
- Orosz F. (1989) *Fehérjék dinamikus kölcsönhatásainak vizsgálata modell rendszerekben*. Kandidátusi értekezés.
- Orosz F. (2004) *A molekuláris szintű vizsgálatok szerepe a gyógyszer-alapkutatásban: Kalmodulin-antagonizmus és citoskeleton-dinamika*. MTA doktori értekezés.
- Orosz F. 2009 Apicortin, a unique protein, with a putative cytoskeletal role, shared only by apicomplexan parasites and the placozoan *Trichoplax adhaerens*. *Infect Genet Evol*. 9:1275-1286.

- Orosz F. (2011) Apicomplexan apicortins possess a long disordered N-terminal extension. *Infect Genet Evol.* 11:1037-1044.
- Orosz F, Ovádi J. (1987) A simple approach to identify the mechanism of intermediate transfer: enzyme system related to triose phosphate metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 915:53-59.
- Orosz F, Ovádi J. (2008) TPPP orthologs are ciliary proteins. *FEBS Lett.* 582:3757-3764.
- Orosz F, Christova TY, Ovádi J. (1988) Functional in vitro test of calmodulin antagonism: effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes. *Mol Pharmacol.* 33:678-682.
- Orosz F, Telegdi M, Liliom K, Solti M, Korbonits D, Ovádi J. (1990) Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: quantitative analysis. *Mol Pharmacol.* 38:910-916.
- Orosz F, Kovács J, Lőw P, Vértessy BG, Urbányi Z, Acs T, Keve T, Ovádi J. (1997a) Interaction of a new bis-indol derivative, KAR-2 with tubulin and its antimetabolic activity. *Br J Pharmacol.* 121:947-954.
- Orosz F, Vértessy BG, Salerno C, Crifo C, Capuozzo E, Ovádi J. (1997b) The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin. *Br J Pharmacol.* 121:955-962.
- Orosz F, Comin B, Raš B, Puigjaner J, Kovács J, Tárkányi G, Ács T, Keve T, Cascante M, Ovádi J. (1999) New semisynthetic vinca alkaloids: chemical, biochemical and cellular studies. *Br J Cancer.* 79:1356-1365.
- Orosz F, Wágner G, Liliom K, Kovács J, Baróti K, Horányi M, Farkas T, Hollán S, Ovádi J. (2000) Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1026-1031.
- Orosz F, Oláh J, Alvarez M, Keserű GM, Szabó B, Wágner G, Kovári Z, Horányi M, Baróti K, Martial JA, Hollán S, Ovádi J. (2001) Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in isolated form: molecular basis of enzyme deficiency. *Blood.* 98:3106-3112.
- Orosz F, Kovács GG, Lehotzky A, Oláh J, Vincze O, Ovádi J. (2004) TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments. *Biol Cell.* 96:701-711.
- Orosz F, Oláh J, Ovádi J. (2006) Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life.* 58:703-715.
- Orosz F, Oláh J, Ovádi J. (2009) Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta.* 1792:1168-1174.
- Ovádi J, Orosz F (1996) New concept for control of glycolysis. In: Agius L, Sherratt HSA (szerk.) *Channelling in Intermediary Metabolism.* London: Portland Press, pp. 237-268.
- Tirián L, Hlavanda E, Oláh J, Horváth I, Orosz F, Szabó B, Kovács J, Szabad J, Ovádi J. (2003) TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13976-13981.
- Vincze O, Tőkési N, Oláh J, Hlavanda E, Zotter A, Horváth I, Lehotzky A, Tirián L, Medzihradsky KF, Kovács J, Orosz F, Ovádi J. (2006) Tubulin polymerization promoting proteins (TPPPs): members of a new family with distinct structures and functions. *Biochemistry.* 45:13818-13826.

IRÁNYÍTOTT FEHÉRJEEVOLÚCIÓ A KOMPLEMENTRENDSZER VIZSGÁLATÁBAN: ALAPKUTATÁSI EREDMÉNYEK TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEKKEL

Pál Gábor

ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Előszó

Parttalan, ezért örök vita, hogy melyik típusú kutatás a fontosabb: a szintisztán a megismerés vágya által hajtott alapkutatás, vagy a konkrét hasznosíthatóság vezérelte alkalmazott kutatás. Ahelyett, hogy ennek a kérdéskörnek az útvesztőjébe kerülnék, jelzem, hogy az itt bemutatott kutatás a fenti két típust ötvözi tökéletes harmóniában. Kutatásaink során egyfelől alapvető új ismeretekre tettünk szert, másfelől világossá vált, hogy az új ismeretek komoly gyakorlati jelentőséggel bírhatnak.

Közvetlen és közvetett előzmények

Ebben a közleményben egy gyümölcsöző együttműködés tudományos eredményeit igyekszem közérthetően összefoglalni. Az együttműködést Gál Péter (MTA Enzimológiai Intézet) kezdeményezte, akinek csoportja a világon elsőként állította elő rekombináns fehérjeként az emberi komplement rendszer lektin útjának két fő proteinázát (lásd később). Péter keresett meg azzal, hogy alapkutatási célból olyan szelektív inhibitorokra van szükségük, amelyek kizárólag a lektin utat gátolják, a komplementrendszer (továbbiakban CS) egyéb útvonalait nem. Mivel a Genentech (San Francisco, USA) cégnél töltött egyéves kutatói munkám során elsajátítottam az irányított fehérjeevolúció tudományát, és sokéves tapasztalatom volt szerin proteáz inhibitorok terén is, szívesen vállalkoztam erre a nehéznek ígérkező feladatra.

Az inhibitorok kifejlesztése két ütemben zajlott. Az első prototípusokat Péterrel közös doktoranduszunk (aki idén doktorált), Párisné Kocsis Andrea fejlesztette ki a laboratóriumomban [1]. Ez az eredmény komoly áttörést jelentett a komplement-kutatásban. A második, eltérő alapokon fejlesztett hatékonyabb és szelektívebb inhibitorokat doktoranduszom, Héja Dávid hozta létre [2, 3]. A gátlószerek funkcionális vizsgálatait is jórészt Ők végezték el, de ebben a sokrétű munkában közreműködött Balczer Júlia, Dobó József, Szilágyi Katalin és Végh Barbara (MTA Enzimológiai Intézet), valamint Szász Róbert (Debreceni Egyetem) is. Az említett projektekkel összefüggő térszerkezeti vizsgálatokat Harmat Veronika (ELTE Kémiai Intézet) irányította. Az elsőként kifejlesztett prototípus peptidok szintézisét Patthy András (ELTE Biokémiai Tanszék), míg az összes inhibitor tömegspektrometriás vizsgálatát Kékesi Katalin (ELTE Biológiai Intézet, Proteomikai csoport) végezte. A 2. prototípusú inhibitorok fágokon való kifejezését (lásd később) Szenthe Borbála oldotta meg [4]. Závodszy Péter volt az, aki Gál Péterrel közösen, hazánkban elsőként vágott bele a CS proteázainak fehérjemérnöki vizsgálatába [5-7].

A Biokémia lap jelen számának keretében ünnepeljük Gráf László professzor 70

születésnapját. Gráf László elévülhetetlen érdeme, hogy a nyolcvanas évek közepén Ő hozta elsőként haza az Amerikai Egyesült Államokból a fehérjemérnökség gondolatát és technológiáját. Modellként a tripszin és kimotripszin szolgáltak [8-10]. Én magam is az Ő iskolájában, doktori témavezetése mellett kezdtem el a szerin proteázok, majd ezek inhibitorainak kutatását [11-14].

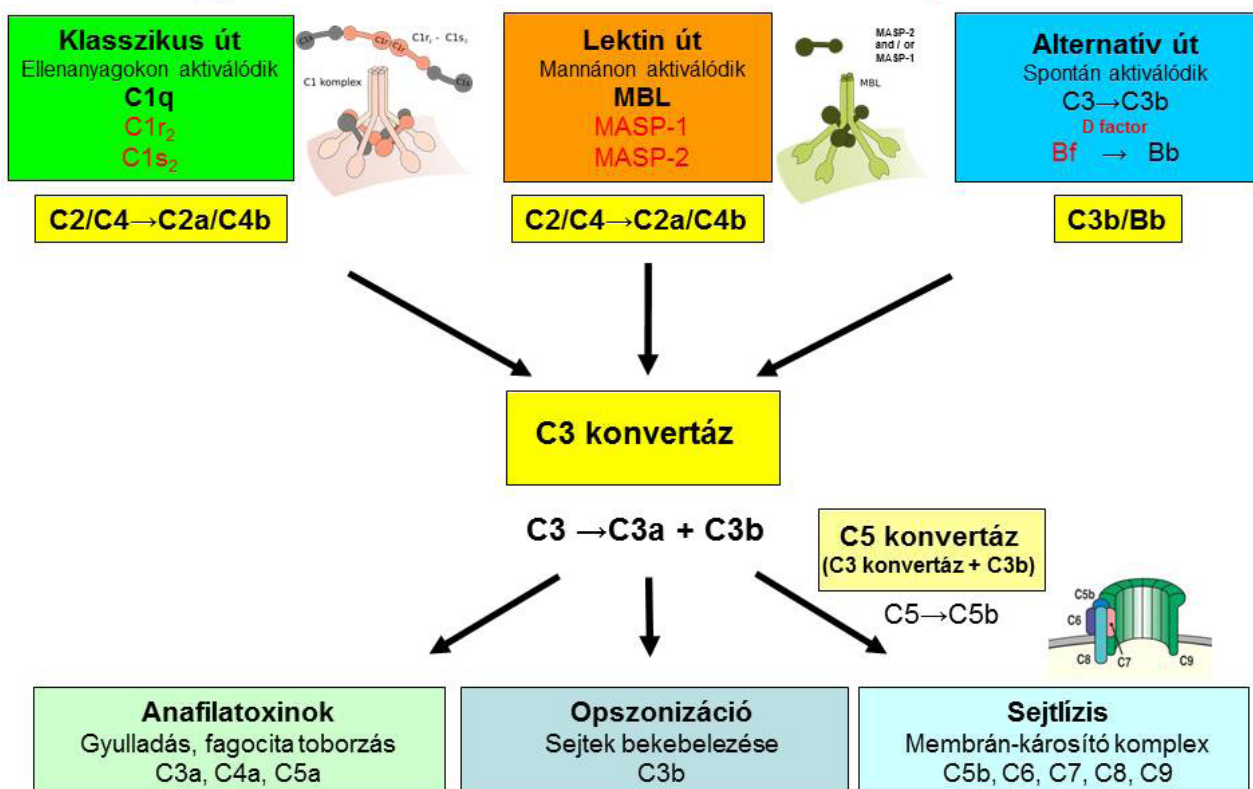
Tudományos bevezető

A komplementrendszer (CS) felépítése és működési alapelve

A CS az immunrendszer fontos része és egyben egyike a szérumban található szerin proteáz kaszkádrendszereknek. A CS legalább harminc fehérje komplex hálózatoként működik és kifinomult szabályozás alatt áll [15]. Az immunrendszer egyéb ágaihoz hasonlóan képes felismerni, megjelölni és elpusztítani a be-

A komplementrendszer sémája

3 eltérő vészjelre 3 eltérő útvonal aktiválódik útvonal-szelektív proteázokon keresztül



tegséget okozó mikrobákat, illetve saját veszélyesen megváltozott sejtjeinket.

A proteáz-hasítások során keletkező fehérjetermékek három fő kivitelező folyamatban vesznek részt. Egyesek (C3a, C4a, C5a) különböző fehérvérsejtek receptoraihoz kapcsolódva gyulladást indítanak el, mások (C3b, C4b) kovalensen megjelölik a fagociták számára a bekebelezendő sejteket, végül bizonyos komplement fehérjékből (C5b, C6-C9) pórusok épülnek ki a megtámadott sejtek membránjában, közvetlen módon, kilyukasztással elpusztítva azokat. A normálisan szabályozott CS fegyverarszenálja tehát fontos védelmi rendszert képez, de amint a rendszer szabályozásában zavarok támadnak, ugyanez az

arzenál ellenünk fordulva számos súlyos betegség forrása lehet. Ezek közül talán a legfontosabbak: a szívinfarktus, szélütés során bekövetkező iszkémiareperfúziós (IR) sérülés, az Alzheimer-kór és az időskori látáskárosodás (age-related macular degeneration).

A CS három jól elkülönülő úton, egyenként eltérő vészjelekre aktiválódik, majd végül a C3 konvertáznak nevezett enzim szintjén közös aktiválódási útba torkollik. Mielőtt a három útvonalra kitérnék, röviden összefoglalom a közös szakasz folyamatait. A C3 (a C4-hez hasonlóan, lásd lejjebb) egy rejtett tioészter csoportot tartalmaz, amely a C3-konvertáz általi hasításkor kerül a felszínre. A kovalensen rögzült C3b egyrészt megjelöli a sejtet fagociták számára, másrészt amennyiben egy C3 konvertázhoz kapcsolódik, úgy ez az új komplex már C5 konvertázként működve elindítja a membránkárosító komplex kialakulását. Visszatérve a három útvonalra:

A CS három aktiválódási útvonala

A klasszikus út

A klasszikus út vészjele az antigénekre rakódott ellenanyag-komplex. A CS ezen elsőként felfedezett, névadó útvonala tehát ráépül a specifikus ellenanyagokon alapuló immunválaszra, mintegy kiegészítve, „komplementálva” azt [16]. Az ellenanyag komplexeket a C1q nevű, tulipáncsokorra emlékeztető fehérje ismeri fel. A felismerés konformáció változással jár, amely kiterjed a C1q-hoz kötődő útvonal-szelektív szerin proteázokra. Itt az egyes lépések igen jól ismertek. Először az inaktív zimogén állapotban lévő homodimer C1r egyes monomerjei nyernek részleges aktivitást. Ennek birtokában ezek precíz hasítás által teljesen aktív kétláncú formává alakítják egymást. Az aktivált C1r proteázok ezek után hasítás révén aktiválják az inaktív zimogén homodimer formában jelenlévő C1s proteázt [17]. Az aktivált C1s kétféle komplement fehérjét hasít. Ezek a C4 és a C2. A hasított C4 felszínén megjelenik egy eladdig rejtett tioészter csoport, amelyen keresztül a molekula kovalens kötéssel képes rögzülni a megtámadott sejten. A C2 egy önmagában praktikus inaktív proteáz. A C2 a hasított C4b-hez kötődve a C1s jó szubsztrátjává válik. A C2-hasítás eredményeként kialakuló C2a-C4b komplexben a C2 immár aktív proteáz. Ez a komplex egy már említett C3 konvertáz.

Az alternatív út

Az alternatív út egy alacsony szinten, de folyamatosan működő rendszer, amely ellen az egészséges sejteink aktívan védekeznek. Ezt az utat a szérumban spontán keletkező és a sejtek felszínére kötődő hidrolizált C3 fehérje aktiválja [18]. Ehhez a komponenshez egy, a C2-vel homológ, önmagában inaktív B-faktor nevű proteáz kötődik. A komplexben lévő B faktort a D faktor nevű szerin proteáz aktiválja, létrehozva egy alternatív C3bBb nevű C3 konvertázt. A properdin nevű fehérje stabilizálja ezt az enzim komplexet, illetve önmagában is mintázatfelismerő molekulaként szolgálhat [19]. Mivel mind a klasszikus út, mind a lektin út (lásd lejjebb) maga is generál C3 konvertázt és így C3b terméket, az alternatív út ezen termékeket felhasználva és további C3 konvertázt gyártva felerősíti a másik két útvonal hatását.

A lektin út

A lektin út a klasszikus útéval azonos C3 konvertázt képez, de ez az útvonal mégis több szempontból lényegesen eltér a klasszikus úttól. Mint említettem, a klasszikus út működése ellenanyagokon alapul, tehát elsősorban akkor véd bennünket, ha szervezetünk egy több hetes folyamatban már létrehozta ezeket a specifikus ellenanyagokat. A lektin út ezzel szemben azonnali komplement választ biztosít, ugyanis ennek felismerő molekulái közvetlenül ismernek fel bizonyos ismétlődő molekuláris mintázatokat a patogéneken, vagy a megváltozott saját sejten. Részben ezzel összefüggésben ez az útvonal lényegesen összetettebb felépítésű. Egy helyett legalább ötféle felismerő molekulája van: a manná kötő lektin (Mannan Binding Lectin, MBL) [20], háromféle (L, H és M) fikolin [21] és a kollektin 11 molekula [22]. Ezekhez összesen háromféle MASP (MBL-Asszociált Szerin Proteáz) kapcsolódhat (MASP-1,2,3). Eddig kizárólag a MASP-1 és MASP-2 enzimekről sikerült bizonyítani, hogy érdemi szerepet játszanak a lektin út aktiválódásában. A három enzimen kívül két további, proteáz doménnal nem rendelkező MASP-termék is ismert. Ezek a Map44 és a Map19. A MASP-1, MASP-3 és Map44 a *MASP-1/3* gén, míg a MASP-2 és a Map-19 a *MASP-2* gén alternatív „splicing” révén kialakuló termékei [23-26].

A MASP-1 és a MASP-2 tulajdonságai

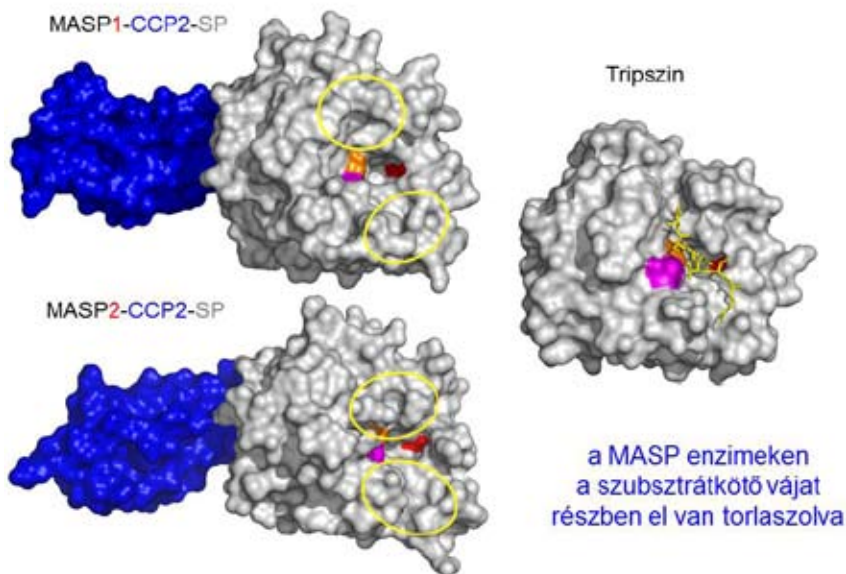
Mind a MASP-1, mind a MASP-2 (akárcsak a C1r és a C1s) öt nem-katalitikus és egy tripszinszerű katalitikus doménből álló fehérje. Az első három domén a dimer-képzésben és felismerő molekulához való kötésben játszik szerepet, a következő két domén a nagy természetes szubsztrát-fehérjék némelyikének felismeréséhez kell, míg természetesen a tripszinszerű domén végzi a hasítást. Ezeknek a fehérjéknek az útvonal-aktiválódásban betöltött szerepére részben az izolált fehérje *in vitro* aktivitásaiból, részben génkiütött egerek szérumának vizsgálataiból következtettek. A MASP-2 enzimről kimutatták, hogy képes „autoaktivációra”: részlegesen aktív állapotú MASP-2 zimogének képesek hasítani egymást, illetve hasított, teljes aktivitású MASP-2 képes hasítani zimogén MASP-2-t. Az aktivált MASP-2 ezen felül képes mind C2, mind C4 hasításra, tehát önmagában képes C2a-C4b típusú C3 konvertáz létrehozására. Ezzel összhangban kimutatták, hogy MBL-MASP-2 komplexek (egy MBL molekula és egy MASP-2 dimer) valóban képesek beindítani a komplement aktivációt *in vitro*. [27]. A MASP-1 vizsgálata azt mutatta, hogy képes autoaktivációra és C2 hasításra, de egyáltalán nem képes C4-et hasítani. *A mért aktivitások alapján a MASP-2 tehát képes lehet autonóm módon, MASP-1 nélkül beindítani a lektin utat. Ezzel szemben a MASP-1 önmagában nem lehet képes ugyanerre, hiszen nem képez C3 konvertázt.* Ezt a modellt erősítette az az ismeret is, hogy MASP-2 génkiütött egerekben nem működik a lektin út, míg MASP-1 génkiütött egerekben igen (habár a normálisnál lényegesen lassabban aktiválódik). Mindezek alapján alakult ki az a széles körben elfogadott és tankönyvekben szereplő nézet, miszerint a MASP-2 központi, míg a MASP-1 segédszereplő a folyamatban.

Eredmények

MASP-inhibitorok létrehozása irányított evolúcióval

Munkánk kezdetén már ismert volt mindkét MASP enzim üres, tehát szubsztráttal, illetve inhibitorral nem komplexált kristályszerkezete [28, 29].

A MASP enzimek és a tripszin szubsztrátkötő helye

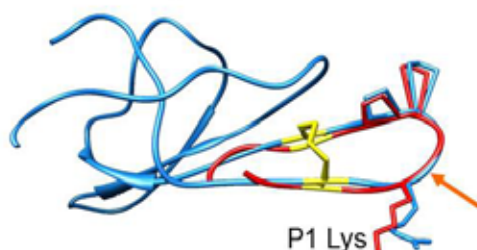


A tripszin-szerkezettel összevetve mindkét enzim esetében látható volt, hogy a MASP enzimek szubsztrátkötő árka részben blokkolt. A MASP-1 esetében kisebb, a MASP-2 esetében nagyobb mértékben fedték azt az enzim egyes hurok régiói, jelezve, hogy szubsztrát-kötött állapotban mindkét szerkezet eltérő kell, hogy legyen.

Napjainkban még akkor sem elegendően hatékony pusztán tervezés útján kötőmolekulát létrehozni, ha a célfehérje kötődés szempontjából kompetens szerkezete ismert. A fenti esetben az *in silico* megközelítést reménytelennek ítéltük. Szubsztrátszerű inhibitorokat szerettünk volna létrehozni, jóllehet számos érv szólt az ellen, hogy létrehozhatók MASP-szelektív inhibitorok. Az egyik ilyen érv szerint a sok-doménes moduláris szerin proteázok szubsztrát-specifitását elsősorban nem a proteáz domén, hanem az egyéb domének szabják meg. Egy másik érv szerint egy szubsztrátszerű inhibitor hasítóhelyhez közeli szekvenciájának nagyban emlékeztetnie kell a természetes szubsztrát szekvenciájára. Mivel a C2 nemcsak a MASP-1 és a MASP-2 közös szubsztrátja, de a C1s-é is (és ugyanez igaz a C4 MASP-2/C1s tekintetében), ezért várható volt, hogy az evolúált inhibitorok nem lesznek útvonal-szelektívek. Ettől függetlenül belevágtunk.

Első generációs inhibitorok

A legkisebb tripszin inhibitor: az SFTI
a Bowman-Birk család „önállósult” inhibitor hurok régiója



A már említett, részben blokkolt szubsztrátkötő árkok miatt úgy döntöttünk, hogy a természetből ismert legkisebb tripszin-gátló peptidből indulunk ki és ebből hozunk létre irányított evolúcióval MASP gátlószerkezeteket. A szubsztrátszerű, rever-

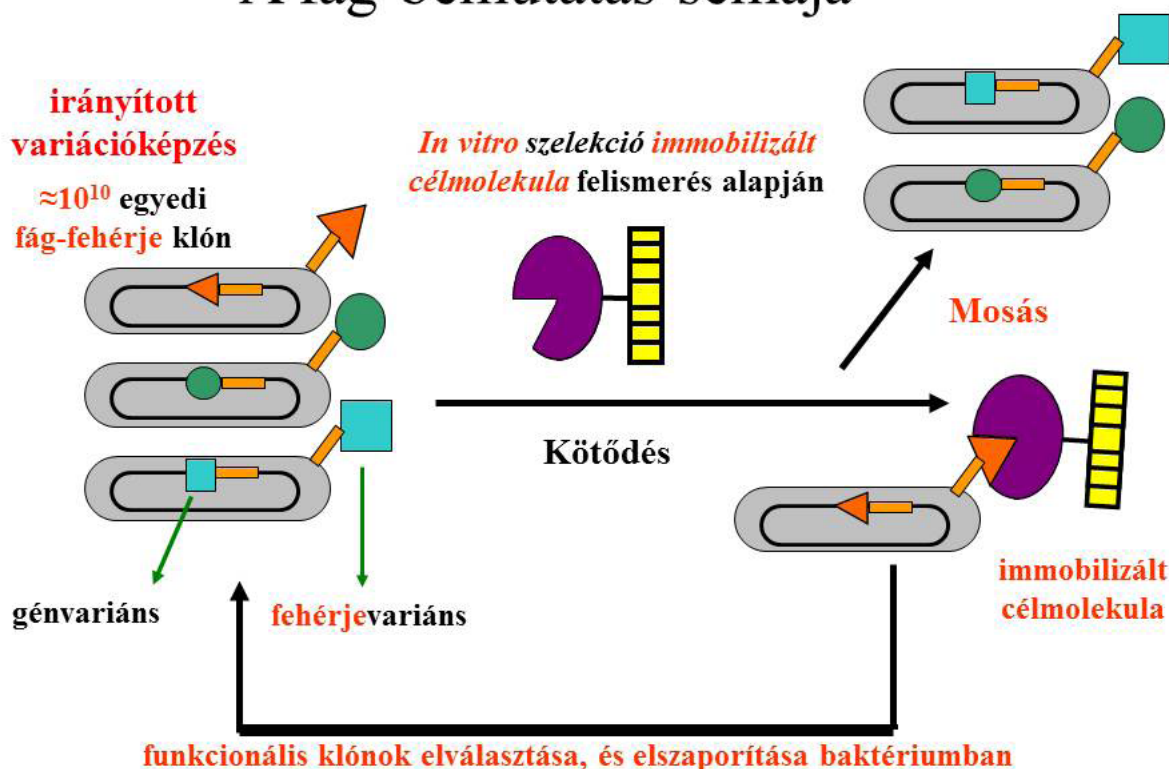
zibilis szerin proteáz inhibitoroknak 18 evolúciósan és szerkezetileg független családja ismert. Ezek mindegyike egy kanonikus szerkezetű felszíni hurokkal kapcsolódik a gátolt proteázhoz. A proteáz el is hasíthatja az inhibítort az ún. P1 és P1' csoportok között, de a hasított inhibitor is működőképes marad, így a reakció termodinamikai egyensúlyra vezet. A legkisebb kanonikus inhibitor a

14-tagú napraforgó tripszin inhibitor (Sunflower Trypsin Inhibitor, SFTI) amely tulajdonképpen a nagyobb Bowman-Birk inhibitorok egyfajta „evolúciósan önállóult” kanonikus hurok régiója.

A leghatékonyabb irányított fehérjeevolúciós eljárást, a fág-bemutatást alkalmaztuk.

A munka során az SFTI molekulát jelenítettük meg fágon. A 14 aminosav cso-

A fág-bemutatás sémája



portból 6, az enzimmel vélhetően kölcsönható esetében megengedtük mind a 20-féle aminosav megjelenését, míg a P1 csoport esetében csak arginint és lizint engedtünk meg. A P1 az a csoport, amelynek oldallánca az enzim S1 kötőzsebébe nyúlik. Ez a zseb MASP-ok esetében tripszinszerű, alján negatív töltésű aszparaginsav csoportot tartalmaz. Nem randomizáltuk az ismert módon szerkezetileg fontos, diszulfidhidat alkotó két ciszteint, és két egymást követő prolint, valamint további 3 olyan csoportot, amelyek vélhetően távol esnének az enzim felszínétől. A peptid-fág könyvtár 2 milliárd klónt tartalmazott.

Ebből külön-külön szelektáltunk MASP-1, illetve MASP-2 kötésre klónokat. Statisztikailag elegendő mennyiségű egyedi kötőképes klón DNS szekvenálásából meghatároztuk a MASP-1, illetve MASP-2 kötés szempontjából kedvező szekvencia mintázatokat, amelyeket szekvencia logó formában ábrázoltunk. A jobb összehasonlíthatóság kedvéért közös ábrán mutatom be ezeket az eredményeket a második generációs inhibitorok eredményeivel (lásd később).

A logók alapján előállítottuk a két leghatékonyabbnak ígérkező (konszenzus szekvenciának megfelelő) peptidet, melyeket rendre SFMI-1 (SFTI-alapú MASP In-

hibitor-1), illetve SFMI-2 nevet kapták. A MASP-2-ről szelektált SFMI-2 valóban szelektív MASP-2 inhibitornak bizonyult, míg az SFMI-1 mindkét MASP enzimet gátolta, igaz a MASP-1-et 16-szor jobban, mint a MASP-2-t. A legfontosabb kérdés természetesen az volt, hogy vajon ezek a peptidek gátolják-e a lektin utat, és ha igen, vajon szelektíven-e. Nagy örömeinkre mindkét peptid tökéletesen képes volt gátolni a lektin utat úgy, hogy a másik két komplement utat egyáltalán nem blokkolta. A leginkább figyelemreméltó eredmény mégis az volt, hogy az az SGMI-1 molekula, amely az SGMI-2 molekulához képest hatszor gyengébben gátolja a MASP-2 enzimet, háromszor hatékonyabban gátolta a lektin utat, mint a jobb MASP-2 inhibitor SGMI-2. Ez arra utalt, hogy a MASP-1 gátlás valami miatt nagyban növeli az inhibitor hatékonyságát, ami pedig azt sejtette, hogy a MASP-1 fontosabb szereplője az útvonalnak, mint ahogy az a jelenlegi modellből következne. Ahhoz azonban, hogy a MASP-1 relatív szerepét számszerűsíteni tudjuk, mindenképpen szükségünk volt MASP-1 szelektív inhibitorra is.

Alaposabban megvizsgálva az SFTI evolúciójának eredményét feltűnt, hogy mind a P2, mind a P1' pozícióban enzimtől függetlenül ugyanaz az aminosav, szerin szelektálódott. A kanonikus inhibitorok esetében gyakori, hogy a P2 csoport fontos hurok-stabilizáló szereppel bír. Az SFTI esetében azonban a P1' is ilyen szerepet játszik. Úgy döntöttünk, hogy az evolúciót egy olyan vázon is véghezvisszük, amelyen a P1'-nek nincs kötött stabilizáló szerepe. A legtöbb kanonikus váz ilyen. Olyan vázat választottunk, amelyet már korábban is sikeresen fejeztünk ki fágon [4].

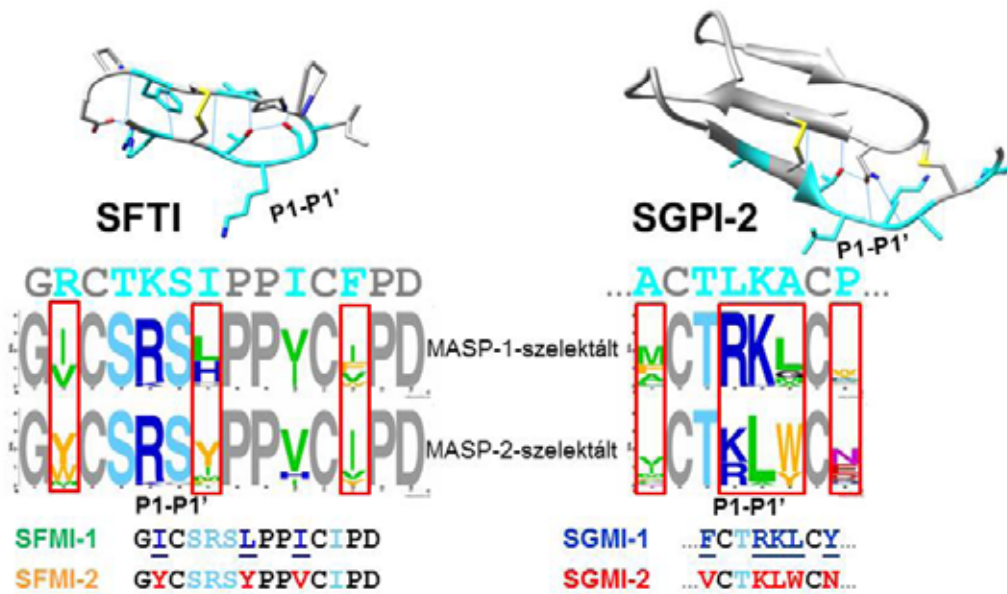
Második generációs inhibitorok

Ez a 35-tagú SGPI-2 (*Schistosoma gregaria* Protease Inhibitor-2) volt. Ebben az esetben 6 kanonikus hurokpozícióban (P4, P2, P1, P1', P2' és P4') engedjük meg mind a 20 aminosav megjelenését. A P3 és P3' pozícióban lévő ciszteineket nem változtattuk. Itt is kétmilliárd klónt tartalmazott a kiindulási könyvtár, amit ebben az esetben is MASP-1 és MASP-2 enzimen szelektáltunk. A szelekciók eredményét megjelenítő két logó a 6-ból 5 pozícióban mutatott lényeges eltéréseket. Ez önmagában előrevetítette monospecifikus MASP-1, illetve MASP-2 inhibitorok létrehozásának lehetőségét (2).

Ez így is lett. Az SGMI-1 (SGPI-alapú MASP Inhibitor-1) molekula 8300-szor jobban gátolja a MASP-1-et mint a MASP-2-t, míg az SGMI-2 kizárólag MASP-2-t gátol, MASP-1-et nem. Természetesen megnéztük, vajon hogyan hatnak az SGMI molekulák a három komplement aktiválódási útra. Ahogy a MASP-2 inhibitor esetében várható volt, az SGMI-2 tökéletesen gátolta a lektin utat. Nagy örömeinkre a másik két útra egyáltalán nem volt hatással. A kizárólag MASP-1-et gátló SGMI-1 esetében – a MASP-1 tankönyvi segédenzim szerepének megfelelően – csak részleges gátlást vártunk. Amellett, hogy ez az inhibitor sem hatott a másik két útvonalra, nagy meglepetésünkre a MASP-1 gátlása is totális lektin út gátlást eredményezett.

A MASP-1 valódi szerepe

Az elsőgenerációs inhibitorokkal arra jutottunk, hogy a MASP-1 fontosabb szereplő, mint ahogy azt korábban hitték. A második generációs monospecifikus



Inhibíciós állandók és IC50 értékek (nM)

	MASP-1	MASP-2	Lektin út gátlás IC50
SFMI-1	65	1030	3200
SGMI-1	7	58000	42
SFMI-2	n.m.	185	9900
SGMI-2	n.m.	6	66

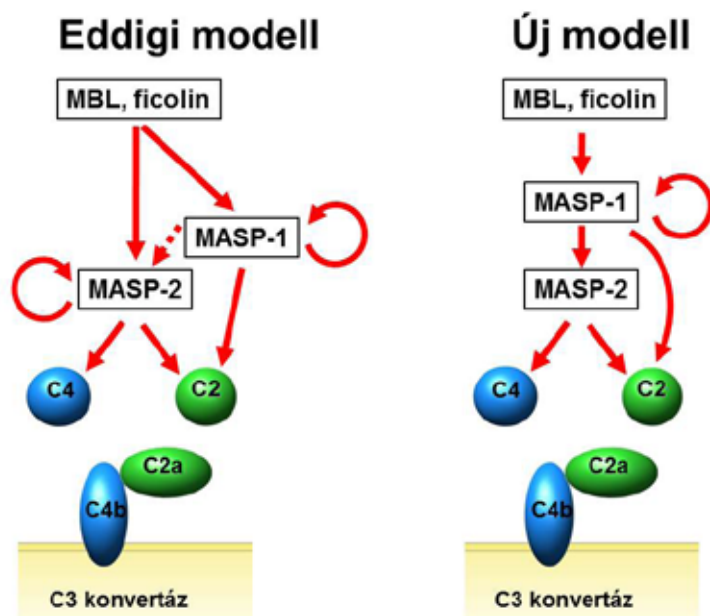
MASP-1 inhibitorral kapott 100 %-os gátlás egyértelműen bizonyította, hogy a MASP-1 nem segédenzim, ellenkezőleg, abszolút fontosságú, megkerülhetetlen komponense a lektin út aktiválódásának. A széles körben elfogadott aktiválódási mechanizmus tehát hibás. Hely hiányában ugyan ábrákkal nem illusztrálom, de a következő kísérletekkel eredtünk a MASP-1 szerepének nyomába. Először is kimutattuk, hogy a MASP-1 inhibitor SGMI-1 (szemben a MASP-2 inhibitor SGMI-2-vel) csak akkor képes tökéletesen gátolni a lektin utat, ha a MASP-2 a szérumban még alapállapotban, tehát zimogénként van jelen. Izolált zimogén MASP-2 autoaktivációját követve igazoltuk, hogy az SMGI-1 molekula (szemben az SGMI-2-vel) a MASP-2 autoaktivációra egyáltalán nem hat, tehát nem csak az aktivált MASP-2-t nem gátolja (ezt már tudtuk), de zimogén MASP-2-t sem gátol. Végül megmértük, hogy a MASP-2 zimogént milyen hatékonysággal képes a MASP-1 aktiválni. Ehhez olyan MASP-2 zimogént használtunk, amelyben a katalitikus szerint alanin helyettesíti, tehát az „aktiváció” eredménye egy inaktív MASP-2, ami nem képes zimogén MASP-2 hasításra. Kiderült, hogy ebben a rendszerben a MASP-1 mintegy húszszor hatékonyabban aktiválja a zimogén MASP-2-t mint maga a MASP-2 [3].

Értelmezés, egy új lektin út aktiválódási modell megalkotása

A modellalkotáshoz felhasznált új eredményeink röviden összefoglalva a következők:

- A MASP-1 gátlás tökéletes lektin út gátlást biztosít mindaddig, amíg a szérumban zimogén állapotú, tehát nincs aktív MASP-2 a rendszerben;
- A MASP-1 gátolt szérumban nem jelenik meg a MASP-2 autoaktivációs

- képessége, jóllehet az tisztított MASP-2 zimogénekkal kimutatható;
 c) Ez a hatás nem zimogén MASP-2 gátlásnak tulajdonítható, ugyanis az SGMI-1 nem gátol zimogén MASP-2-t sem;
 d) A MASP-1 húszszor jobb MASP-2 zimogén aktivátor, mint a MASP-2.



Mindezekből arra következtettünk, hogy a MASP-1 a MASP-2 kizárólagos fiziológiás aktivátora normál humán szérumban!

Igen ám, de amint azt a bevezetőben ismertettem, ez az eredmény ellentmond mind az *in vitro* adatoknak, mind pedig a MASP-1 génkiütött állatok szérumán folytatott kísérleteknek. *In vitro* kísérletekben igazolható, hogy a MASP-2 képes autoaktivációra, és a MASP-1 hiányos szérumban is zajlik – igaz csökkentett mértékben – a lektin út aktiválódása. Vajon hogyan oldható fel ez az ellentmondás?

Véleményünk szerint a fenti új eredmények egyetlen már korábban is ismert adattal kombinálva olyan modellhez vezetnek, amely minden eddigi megfigyeléssel összhangban van, sőt magyarázza az eddig kevésbé értelmezhető ismereteket is.

Az *in situ* MASP-1 gátláskor elmaradó MASP-2 autoaktiváció legegyszerűbb magyarázata az lehet, hogy fiziológiás körülmények között, tehát normál szérumban praktikusán soha nem találkozik egymással két MASP-2 zimogén. A MASP-1 és a MASP-2 ugyanazokhoz a felismerő molekulákhoz képesek kötődni, csak hogy MASP-1 molekulából a szérumban 20-szor annyi van, mint MASP-2 molekulából. Ráadásul méréseink szerint a MASP-1 20-szor nagyobb hatékonysággal hasítja a zimogén MASP-2 molekulát, mint a MASP-2. Mindezek együttesen azt eredményezik, hogy praktikusán minden MASP-2 zimogén MASP-1 molekulákkal van körbevéve, és még ha lenne is dinamikus átrendeződésre lehetőség a fiziológiás rendszerben, a MASP-2 önaktivációja lényegesen kevésbé hatékony, mint a MASP-1 általi aktiválása.

Amennyiben a felismerő-molekulák telítettek MASP enzimekkel, és a MASP-2 molekulákat körülvevő MASP-1 molekulákat *in situ* ható kis inhibitorokkal gátolva tartjuk, akkor a MASP-2 zimogéneket a MASP-1 immár nem aktiválja, a MASP-2 molekulák pedig a korábban említettek miatt nem tudják egymást aktiválni.

No de mit jósol ez a modell arra az esetre, ha a MASP-1 molekulákat nem *in situ* gátoljuk, hanem teljes egészében eltávolítjuk, mint a MASP-1 génkiütött egerek esetében? A helyzet ilyenkor radikálisan megváltozik. A normálisan 20-szoros feleslegben lévő MASP-1 eltávolítása szabad kötőhelyek megjelenéséhez vezet a felismerő-molekulákon, ami lehetővé teszi, hogy MASP-2 zimogének dinamikus átrendeződéssel egymás közelébe kötődjenek és aktiválják egymást. Mivel ilyenkor sokkal több szabad kötőhely van, mint MASP-2, és mivel a MASP-2 molekulák viszonylag kis hatékonysággal aktiválják a MASP-2 zimogént, ez a dinamikus egymásra találás és aktiválás jóval kisebb hatékonyságú kell, hogy legyen, mint a fiziológias, MASP-1 általi aktiválás.

Nos, a MASP-1 génkiütött egerek esetében éppen ez a helyzet! Az új modell tehát nem csak a saját új eredményeinkkel, hanem mások korábbi, látszólag ellentmondó modelljeivel is tökéletesen összhangban van.

Túl azon, hogy sikerült korigálnunk egy fontos immunológiai folyamat aktiválódási modelljét, ezek az eredmények fontos gyakorlati jelentőséggel is bírhatnak. Mivel a lektin út jelentős szerepet játszik az iszkémia/reperfúziós sérülések, így a szívinfarktust és szélütést követő masszív szövetkárosodás kialakulásában [30], ezen útvonal szelektív gátlása komoly terápiás lehetőségeket nyit meg. Az ezek felé vezető úton egyrészt létrehoztuk az első lektin út szelektív inhibitorokat, másrészt a MASP-1 központi jelentőségének feltárásával megdupláztuk a gyógyszercélpontként szóba jöhető proteázok számát.

Irodalomjegyzék

- [1] Kocsis, A., Kekesi, K. A., Szasz, R., Vegh, B. M., Balczer, J., Dobo, J., Zavodszky, P., Gal, P. & Pal, G. (2010) Selective Inhibition of the Lectin Pathway of Complement with Phage Display Selected Peptides against Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 and-2: Significant Contribution of MASP-1 to Lectin Pathway Activation. *J Immunol*, **185**: 4169-4178.
- [2] Heja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobo, J., Kekesi, K. A., Zavodszky, P., Gal, P. & Pal, G. (2012) Monospecific Inhibitors Show That Both Mannan-binding Lectin-associated Serine Protease-1 (MASP-1) and -2 Are Essential for Lectin Pathway Activation and Reveal Structural Plasticity of MASP-2. *J Biol Chem*, **287**: 20290-300.
- [3] Heja, D., Kocsis, A., Dobo, J., Szilagyi, K., Szasz, R., Zavodszky, P., Pal, G. & Gal, P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012 Jun 12. [Epub ahead of print]
- [4] Szenthe, B., Patthy, A., Gaspari, Z., Kekesi, A. K., Graf, L. & Pal, G. (2007) When the surface tells what lies beneath: Combinatorial phage-display mutagenesis reveals complex networks of surface-core interactions in the pacifastin protease inhibitor family. *J Mol Biol*, **370**: 63-79.
- [5] Cseh, S., Gal, P., Sarvari, M., Dobo, J., Lorincz, Z., Schumaker, V. N. & Zavodszky, P. (1996) Functional effects of domain deletions in a multidomain serine protease, C1r. *Mol Immunol*, **33**: 351-9.
- [6] Gal, P., Sarvari, M., Szilagyi, K., Zavodszky, P. & Schumaker, V. N. (1989) Expression of hemolytically active human complement component C1r proenzyme in insect cells using a baculovirus vector. *Complement Inflamm*, **6**: 433-41.

- [7] Luo, C., Thielens, N. M., Gagnon, J., Gal, P., Sarvari, M., Tseng, Y., Tosi, M., Zavodszky, P., Arlaud, G. J. & Schumaker, V. N. (1992) Recombinant human complement subcomponent C1s lacking beta-hydroxyasparagine, sialic acid, and one of its two carbohydrate chains still reassembles with C1q and C1r to form a functional C1 complex. *Biochemistry*, **31**: 4254-62.
- [8] Graf, L., Hegyi, G., Liko, I., Hepp, J., Medzihradzsky, K., Craik, C. S. & Rutter, W. J. (1988) Structural and functional integrity of specificity and catalytic sites of trypsin. *Int J Pept Protein Res*, **32**: 512-8.
- [9] Graf, L., Jancso, A., Szilagyi, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradzsky, K. & Rutter, W. J. (1988) Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 4961-5.
- [10] Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Roczniak, S., Fletterick, R. J. & Rutter, W. J. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry*, **26**: 2616-23.
- [11] Malik, Z., Amir, S., Pal, G., Buzas, Z., Varallyay, E., Antal, J., Szilagyi, Z., Vekey, K., Asboth, B., Patthy, A. & Graf, L. (1999) Proteinase inhibitors from desert locust, *Schistocerca gregaria*: engineering of both P(1) and P(1)' residues converts a potent chymotrypsin inhibitor to a potent trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta*, **1434**: 143-50.
- [12] Pal, G., Sprengel, G., Patthy, A. & Graf, L. (1994) Alteration of the specificity of ecotin, an *E. coli* serine proteinase inhibitor, by site directed mutagenesis. *FEBS Lett*, **342**: 57-60.
- [13] Pal, G., Szilagyi, L. & Graf, L. (1996) Stable monomeric form of an originally dimeric serine proteinase inhibitor, ecotin, was constructed via site directed mutagenesis. *FEBS Lett*, **385**: 165-70.
- [14] Varallyay, E., Pal, G., Patthy, A., Szilagyi, L. & Graf, L. (1998) Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Comm*, **243**: 56-60.
- [15] Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, **11**: 785-797.
- [16] Nayak, A., Pednekar, L., Reid, K. B. & Kishore, U. (2012) Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule. *Innate immunity*, **18**: 350-63.
- [17] Gal, P., Dobo, J., Zavodszky, P. & Sim, R. B. M. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol Immunol*, **46**: 2745-2752.
- [18] Holers, V. M. (2008) The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev*, **223**: 300-16.
- [19] Kemper, C., Atkinson, J. P. & Hourcade, D. E. (2010) Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Ann Rev Immun*, **28**: 131-55.
- [20] Thiel, S. (2007) Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol*, **44**: 3875-3888.
- [21] Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Intl J Biochem Cell Biol*, **43**: 705-12.
- [22] Hansen, S., Selman, L., Palaniyar, N., Ziegler, K., Brandt, J., Kliem, A., Jonasson, M., Skjoedt, M. O., Nielsen, O., Hartshorn, K., Jorgensen, T. J. D., Skjodt, K. & Holmskov, U. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) Is a MASP-1/3-Associated Plasma Collectin with Microbial-Binding Activity. *J Immunol*, **185**: 6096-6104.

- [23] Degn, S. E., Hansen, A. G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J. C. & Thiel, S. (2009) MAP44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. *J Immunol*, **183**: 7371-7378.
- [24] Skjoedt, M. O., Hummelshoj, T., Palarasah, Y., Honore, C., Koch, C., Skjodt, K. & Garred, P. (2010) A Novel Mannose-binding Lectin/Ficolin-associated Protein Is Highly Expressed in Heart and Skeletal Muscle Tissues and Inhibits Complement Activation. *J Biol Chem*, **285**: 8234-8243.
- [25] Stover, C. M., Thiel, S., Thelen, M., Lynch, N. J., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C. & Schwaeble, W. J. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*, **162**: 3481-90.
- [26] Takahashi, M., Endo, Y., Fujita, T. & Matsushita, M. (1999) A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol*, **11**: 859-63.
- [27] Vorup-Jensen, T., Petersen, S. V., Hansen, A. G., Poulsen, K., Schwaeble, W., Sim, R. B., Reid, K. B., Davis, S. J., Thiel, S. & Jensenius, J. C. (2000) Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol*, **165**: 2093-100.
- [28] Dobo, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyen, E., Zavodszky, P. & Gal, P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol*, **183**: 1207-14.
- [29] Harmat, V., Gal, P., Kardos, J., Szilagyi, K., Ambrus, G., Vegh, B., Naray-Szabo, G. & Zavodszky, P. (2004) The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J Mol Biol*, **342**: 1533-46.
- [30] Schwaeble, W. J., Lynch, N. J., Clark, J. E., Marber, M., Samani, N. J., Ali, Y. M., Dudler, T., Parent, B., Lhotta, K., Wallis, R., Farrar, C. A., Sacks, S., Lee, H., Zhang, M., Iwaki, D., Takahashi, M., Fujita, T., Tedford, C. E. & Stover, C. M. (2011) Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *P Natl Acad Sci U S A*, **108**: 7523-7528.



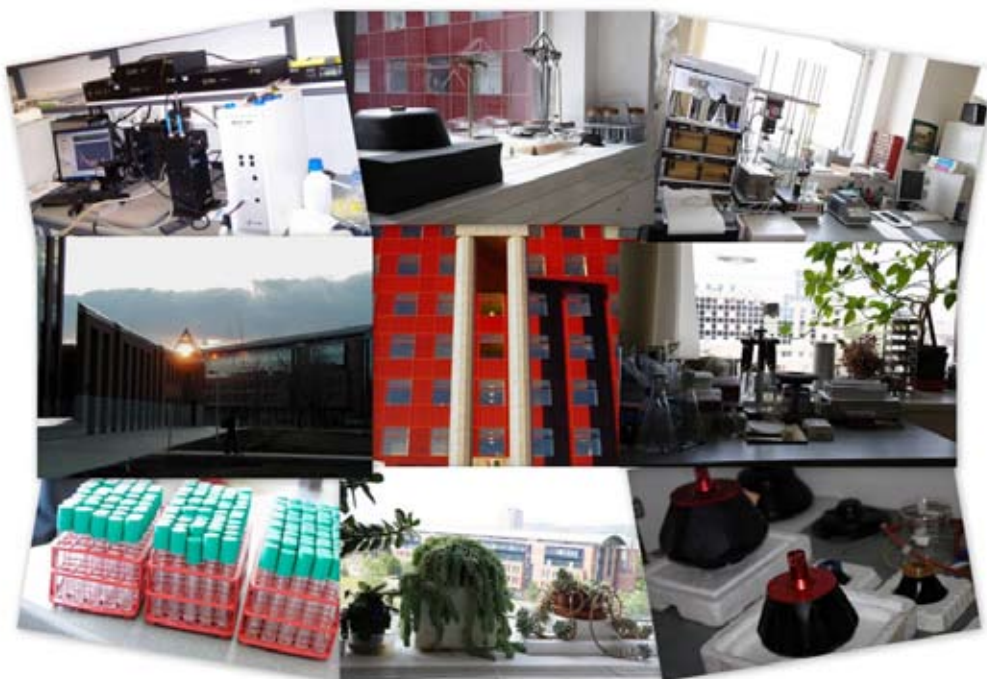
Pál Gábor az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 1990-ben. A PhD fokozatot az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában 1997-ben kapta meg. Ezután a Genentech Inc. (South San Francisco, USA) biotechnológiai cégnél és a Chicagói Egyetemen dolgozott posztdokorként. 2003-ban tért vissza az ELTE Biokémiai Tanszékére, ahol egyetemi docensként saját kurzusokkal vesz részt az oktatás minden szintjén, és vezeti az „Írányított fehérjeevolúció” kutatócsoportot. 2010-ben elnyerte a sanofi-avensis által alapított, az MTA zsűrije által odaítélt Magyar Kutatási Díjat, és ugyanabban az évben az ELTE Kar Kiváló Oktatója kitüntetését is megkapta. 2012-ben elnyerte az ELTE Innovatív Kutatója díjat, és MTA Bolyai-plakett kitüntetésben is részesült.

Tudományos érdeklődése leginkább két, egymással összefüggő területre összpontosul. Az egyik a fehérjék között kialakuló kölcsönhatások törvényszerűségeinek mind alaposabb feltárása. A másik olyan, a természetben nem létező fehérjevariánsok létrehozása, amelyekkel célszerűen lehet beavatkozni terápiás szempontból is fontos fehérje-fehérje kölcsönhatásokba. Mindkét terület középpontjában az irányított fehérjeevolúciós megközelítések állnak.

BEMUTAKOZIK AZ EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR BIOKÉMIAI TANSZÉKE

Tanszékvezető: Dr. Nyitrai László *tanszékvezető docens*

Az ELTE TTK Biokémiai Tanszék 44 éves múltra tekint vissza. A tanszék megalapításának 40. évfordulója alkalmából rendezett emlékülés alkalmából a Biokémia folyóirat olvasói már részben megismerhették a tanszék múltját (lásd *Biokémia* (2008) **32**: 97–98), és tudományos közlemények formájában több kutatócsoportunk eredményeiről is olvashattak (lásd *Biokémia* (2008) **32**: 78–97). A Trefort-kertből 2001-ben költözött a tanszék a jelenlegi helyére, az ELTE TTK Lágymányosi Campusára.



Most ismét ránk került a sor a hazai biokémiai műhelyeket bemutató rovatban, ami részben Gráf László akadémikus 70. születésnapjának is betudható, akit ebben a lapszámban köszöntünk.

A tanszék bemutatkozása során az oktatói és kutatói tevékenységünk és a tanszéki kutatócsoportok rövid összefoglalása után „átadom a tollat” kollégáimnak, akik a jelenleg folyó kutatásaikról számolnak be egy-egy rövid közlemény formájában.

A Biokémiai Tanszék jelenleg az ELTE TTK Biológiai Intézetének egyik legdinamikusabb, a hivatalos szóhasználat szerint Intézeti Tanszéke. A tanszéken nyolc önálló kutatócsoport működik. Az oktatóink létszáma nem túl magas: egy „fél” egyetemi tanár (a tanszékvezető, Ny.L. kinevezése folyamatban van), három docens (Málnási Csizmadia András, Pál Gábor, Venekei István), egy adjunktus (Kardos József), egy tanársegéd (Radnai László). Két kutatócsoportot tudományos főmunkatársak vezetnek (Kovács Mihály és Reményi Attila). Szerencsénkre

aktív oktatói és kutatói munkával segít bennünket három nyugdíjas munkatársunk is. Gráf László, a már említett születésnapból következően, ettől az évtől az egyetem emeritus professzora, de továbbra is aktívan kutat. Hegyi György szintén emeritus professzorként oktat és kutat velünk, sőt a tanszék „örökös főszakácsa”, aki a körülbelül tíz éve rendszeres tavaszi kirándulásainkon a mindig nagy étvággal elfogyasztott bográcsételek szakavatott elkészítője is (nem véletlen, hogy kutatómunkájában is ő a leginvenciózusabb szerves vegyész közöttünk). Az evés mellett a sportolást sem hanyagoljuk el – az ELTE Legsportosabb Tanszéke kupát eddig tízszer nyertük el.



Szilágyi László nyugdíjas docensként kutatói (és oktatói) együttműködést folytat a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem egyik kutatócsoportjával, s rendszeresen dolgoznak az itteni laboratóriumában erdélyi doktoranduszok. A tanszéken korábban Gráf László vezetésével működött egy ELTE-MTA Kutatócsoport. 2012-től „Fehérjék flexibilitásának és enzimatisz tulajdonságainak összefüggései az enzim- és ligandumtervezésben” címmel új kihelyezett akadémiai kutatócsoportot indított Málnási Csizmadia András, s a csoportot erősíti Gráf László professzor is. Kutatócsoportjainkat kiegészíti egy bioanalitikai laboratórium, amelyet Patthy András nyugdíjas tudományos főmunkatársunk működtet. A tanszék négy munkatársa habilitált, öten rendelkeznek MTA doktori címmel. Závodszy Péter, az MTA Enzimológiai Intézet volt vezetője, egyetemünk emeritus professzora számára is fenntartunk egy íróasztalt a tanszék területén, ezzel is jelezve az intézeteink közötti szoros szakmai és oktatási együttműködést – lásd később).

Oktatási feladatainkról dióhéjban. Természetesen a biokémia és molekuláris biológia oktatása a legfőbb feladatunk. Évek óta két szinten oktatjuk a tárgyat, az alapszinten 5 óra előadást és 3 óra szemináriumi gyakorlatot, míg az emelt szinten 7 óra előadást, 3 óra szemináriumi és 6 óra laboratóriumi gyakorlatot jelent, évente kétszáz biológia alapszakos diák számára. A mi feladatunk a Géntechnológia tárgy oktatása is, BSc és MSc szinten, biológus, vegyész és

biofizikus hallgatóknak. Az MSc képzésen keretében a molekuláris biológia szakirányon belül (amelyet az Immunológia és Mikrobiológia Tanszékekkel közösen jegyzünk), kötelező tárgyként oktatunk fehérjetudományt, molekuláris biológiát és a rendszerbiológia alapjait. Számos kötelezően választható és speciális kollégium egészíti ki a képzést. Jelenleg legfontosabb oktatásfejlesztési feladatunk egy, a sokéves oktatási tapasztalataink alapján íródó „Bevezetés a biokémiába” elektronikus elméleti és gyakorlati tankönyv elkészítése (egy TÁMOP oktatásfejlesztési pályázat finanszírozásában). Az újból napirendre került felsőoktatási reform keretében „Fehérjetudomány – Proteins Science” elnevezéssel angol nyelvű speciális mesterszak elindításán dolgozunk. Részt vállalunk a középiskolás tehetséggondozásban is. Nyaranta molekuláris biológia tábort szervezünk, amire a diákokat az „ELTE házhoz megy” program keretében középiskolákban tartott szakmai előadásokhoz kötődő vetélkedőkön válogatjuk ki.

Évente átlagosan öt-tíz BSc és ugyanilyen számú MSc szintű hallgató készít szak- illetve diplomadolgot a tanszéken. Diákjaink rendszeresen nyernek TDK konferenciákon díjakat (az elmúlt három évben hét díjazott, egy Pro Scientia Aranyérmes). Fiataljaink az utóbbi évek konferenciáin (MBKE, FEBS) négy legjobb poszter díjat nyertek el, Gyimesi Máté MBKE díjat kapott 2010-ben.

Az ELTE Biológia Doktori iskola legnagyobb programja, Szerkezeti biokémia néven a tanszékünkhöz köthető. Az indulástól az ideig Gráf László vezette, amelyre a biológus hallgatókon kívül vegyészek, fizikusok, biomérnökök, orvosok is jelentkeznek. A Gráf-korszakban egy híján száz hallgató szerezte meg PhD fokozatát ebben a programban, akik közül harmincketten a tanszéken végeztek kutatómunkájukat. A tanszéken dolgozó PhD hallgatók száma jelenleg meghaladja a húsz főt.

A bemutatkozás elején a tanszékünket az „egyik legdinamikusabb” jelzővel illetttem. Tettem ezt azért, mert köszönhetően Gráf László bölcs előrelátásának, mára egy olyan, az alkotóerejük teljében lévő kutatókból álló közösség állt össze a tanszéken, aminek a sikereit manapság arathatjuk le. Büszkék vagyunk díjazottainkra, komoly nemzetközi kutatási pályázatokat elnyert kollégáinkra, kutatói ösztöndíjasainkra (ABC és nem értéksorrendben): Gráf László 2009-ben a Szilárd Leó Professzori Ösztöndíj nyertese; Hetényi Csaba Talentum díjas (2010) és Bolyai János ösztöndíjas (2009); Kardos József kétszeres Bolyai János ösztöndíjas (2005, 2011); Kovács Mihály Talentum (2009) és Ignatz L. Lieben díjas (2011), 2011-ben Lendület Fiatal Kutató Program nyertese; Málnási Csizmadia András az Európai Kutatási Tanács (ERC) Starting Investigator Grant nyertese (2008); Pál Gábor a Magyar Kutatói díj kitüntetettje (2010), idén az ELTE Innovatív Kutatója és a Bolyai-plakett díjazottja (lásd „Akiire büszkék vagyunk” rovat); Reményi Attila a Wellcome Trust és az EMBO Installation Grant támogatója (2007), Bolyai ösztöndíjas (2009). A szakmai teljesítményünket röviden számokba foglalva: az utóbbi 25 évben 200 publikációt jegyeztek a tanszék munkatársai. A fejlődést jelzi, hogy 2009 óta 60 közleményünk jelent meg, amelyek összesített impakt faktora 425 körül van.

Kutatómunkánk a fehérjetudományon és a szerkezeti biológián belül széles kört

ölel fel, s ma már messze túlmutat a Biokémia Tanszék Bíró- korszakában (1968-1986) művelt izombiokémián és a Gráf-korszakban (1986-2007) dominálót, a szerin-proteázok működését tanulmányozó témákon. A legjobb hagyományok folytatásaként azonban ma is sikeresen kutatjuk mind a motorfehérjéket (3 kutatócsoport), mind a proteázokat és inhibitoraikat (4 kutatócsoport). Műszerparkunk folyamatosan fejlődik. Két műszeregyüttest emelnék ki. A „Nemzeti Kutatási Infrastruktúra Regiszter” része a nemzetközileg is magas színvonalat képviselő gyors-kinetikai és fluoreszcens laboratóriumunk (Málnási Csizmadia András és Kovács Mihály szakmai vezetésével); a megvalósítás fázisába lépett (a Biológiai Intézet *core facility*-jeként) a „Molekuláris kölcsönhatás” laboratórium, amelyben egyelőre egy SPR és egy multifunkciós lemezleolvasó készülék üzemel (Pál Gábor szakmai vezetésével).



Kutatócsoportjaink kiterjedt hazai és nemzetközi együttműködést folytatnak. Stratégiai együttműködő partnerünk az ELTE TTK-n belül a Perczel András vezette szerkezeti kémiai/biológiai kutatócsoport, valamint a Buday László vezette MTA TTK Enzimológiai Intézet. A két említett kutatóval másfél évvel ezelőtt elindítottunk OLPS (Open Laboratory of Proteins Science) néven egy Szent-Györgyi Albert szellemiségének jegyében fogant kezdeményezést, amelyet reményeink szerint a fehérjetudomány iránt érdeklődő kutatók töltönek majd meg tartalommal.

A tanszék bemutatását a kutatócsoportok tagjainak és a legutóbbi évek legfontosabb publikációinak felsorolásával zárom. Az egyes laboratóriumokban folyó munka legizgalmasabb eredményeiről szóljanak az érintettek. Kiemeléssel jeleltük azon szerző nevét, aki az adott csoporthoz tartozik vagy tartozott a cikk írásakor.

1. Szerin-proteáz kutatócsoport

Csoportvezető: **Gráf László** akadémikus. Munkatársak: Molnár Tamás PhD hallgató, Takáts Kornél PhD hallgató

Válogatott publikációk:

Wahlgren W.Y., Pál G., Kardos J., **Porrogi P.**, **Szenste B.**, **Patthy A.**, **Gráf L.**, Katona G. (2011) *J Biol Chem*, **286**: 3587-96

Rauscher A.Á., Simon Z., Szöllősi G.J., **Gráf L.**, Derényi I., Málnási-Csizmadia A. (2011) Temperature dependence of internal friction in enzyme reactions. *FASEB J*, **25**: 2804-13

- Vörös K., Gráf L. Jr, Prohászka Z., **Gráf L.**, Szenthe P., Kaszás E., Böröcz Z., Cseh K., Kalabay L. (2011) Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, **41**: 703-9
- Tárnok K., Szilágyi L., Berki T., Námeth P., **Gráf L.**, Schlett K (2010): Anoxia leads to a rapid translocation of human trypsinogen 4 to the plasma membrane of cultured astrocytes., *J Neurochem*, **115**:314-324
- Gombos L.**, Kardos J, **Patthy A.**, **Medveczky P.**, Szilágyi L, Málnási-Csizmadia A, **Gráf L.** (2008) Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. *Biochemistry*, **47**: 1675-84

2. Fehérje folding és amiloid kutatócsoport

Csoportvezető: **Kardos József** adjunktus. Munkatársak: Micsonai András PhD hallgató, Kernya Linda tud. smts, Bulyáki Éva PhD hallgató, Szabó Eszter asszisztens

Válogatott publikációk:

- Kardos J.**, **Micsonai A.**, **Pál-Gábor H.**, **Petrik É.**, Gráf L., Kovács J., Lee Y.H., Naiki H., Goto Y (2011) Reversible heat-induced dissociation of β 2-microglobulin amyloid fibrils. *Biochemistry*, **50**: 3211-20
- Kovács E., Harmat V., Tóth J., Vértessy B.G., Módos K., **Kardos J.**, Liliom K. (2010) Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions. *FASEB J*, **24**: 3829-39
- Orbán G., Völgyi K., Juhász G., Penke B., Kékesi K.A., **Kardos J.**, Czurkó, A. (2010) Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats. *Brain Research*, **1354**: 227-235
- Pál-Gábor H.**, Gombos L., **Micsonai A.**, Kovács E., **Petrik É.**, Kovács J., Gráf L., Fidy J., Naiki H., Goto Y., Liliom K., **Kardos J.** (2009) Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin in vitro under physiological conditions *Biochemistry*, **48**: 5689-99
- Hajdú I., Szilágyi A., **Kardos J.**, and Závodszy, P. (2009) A link between hinge-bending domain motions and the temperature dependence of catalysis in IPMDH. *Biophys J.*, **96**: 5003-12

3. Motorenzimológia kutatócsoport

Csoportvezető: **Kovács Mihály** tud. főmts (2011-től a Lendület program támogatásával). Munkatársak: Gyimesi Máté, tud. mts (jelenleg Marie Curie ösztöndíjjal külföldön), Sarlós Kata predoktor, Nagy Nikolett predoktor, Kocsis Zsuzsa PhD hallgató, Harami Gábor PhD hallgató, Ferenczi Veronika PhD hallgató, Krajcsi Anikó asszisztens

Válogatott publikációk:

- Ma X.*, **Kovács M.***, Conti M. A., Wang A., Zhang Y., Sellers J. R., Adelstein R. S. (2012) Nonmuscle myosin II exerts tension but does not translocate actin in vertebrate cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 4509-14

Sarlós K., Gyimesi M., Kovács M. (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 9804-9

Gyimesi M., Sarlós K., Derényi I., Kovács M. (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res*, **38**: e102

Takács B., Billington N., **Gyimesi M.,** Kintses B., Málnási-Csizmadia A., Knight P. J., **Kovács M.** (2010) Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 6799-804

Málnási-Csizmadia A., **Kovács M.** (2010) Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke. *Trends Biochem Sci*, **35**: 684-690

4. Molekuláris biológiai és bioinformatikai kutatócsoport

Csoportvezető: **Málnási Csizmadia András** docens (2008-tól ERC támogatással, 2012-től ELTE-MTA kutatócsoport vezetőként is). Munkatársak: Hegyi György emeritus prof., Hetényi Csaba tud. főmts., Jelinek Balázs tud. mts., Rauscher Anna PhD hallgató, Várkuti Boglárka PhD hallgató, Lőrincz István PhD hallgató, Végner László PhD hallgató, Képiró Miklós PhD hallgató, Peragovics Ágnes PhD hallgató, Szegvári Gábor PhD hallgató, Yang Zhenhui predoktor, Ozoróczyné Szász Ilona asszisztens

Válogatott publikációk:

Képiró M., Várkuti B.H., Bodor A., **Hegyi G.,** Drahos L., **Kovács M., Málnási-Csizmadia A.** (2012) Azidoblebbistatin, a photoreactive myosin inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 9402-7

Várkuti B.H., Yang Z., Kintses B., Erdélyi P., Bárdos-Nagy I., Kovács A.L., Hári P., Kellermayer M., Vellai T., **Málnási-Csizmadia A.** (2012) A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. *Nat Struct Mol Biol*, **19**: 299-306

Peragovics A., Simon Z., Brandhuber I., **Jelinek B.,** Hári P., **Hetényi C.,** Czobor P., **Málnási-Csizmadia A.** (2012) Contribution of 2D, 3D structural features of drug molecules in the prediction of Drug Profile Matching. *J Chem Inf Model*, 2012 Jun 14. [Epub ahead of print]

Rauscher A.Á., Simon Z., Szöllősi G.J., Gráf L., Derényi I., **Málnási-Csizmadia A.** (2011) Temperature dependence of internal friction in enzyme reactions. *FASEB J*, **25**: 2804-13

Málnási-Csizmadia A., Kovács M. (2010) Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke. *Trends Biochem Sci*, **35**: 684-690

5. Motorfehérje szerkezeti biológiai kutatócsoport

Csoportvezető: **Nyitrai László** tanszékvezető docens. Munkatársak: Radnai László tanársegéd, Rapali Péter predoktor, Kiss Bence PhD hallgató, Biri Beáta PhD hallgató, Bakos Anita asszisztens

Válogatott publikációk:

Kiss B., Duelli A., **Radnai L.**, Kékesi K.A., Katona G., **Nyitrai L.** (2012) Crystal structure of the S100A4–myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 6048–53

Rapali P., García-Mayoral M.F., Martínez-Moreno M., Tárnok K., Schlett K., Albar J.P., Bruix M., **Nyitrai L.**, Rodríguez-Crespo I. (2011) LC8 Dynein Light Chain (DYNLL1) Binds to the C-terminal Domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and Regulates its Subcellular Localization. *Biochem Biophys Res Comm*, **414**: 493–8

Rapali P., **Szenes A.**, **Radnai L.**, **Bakos A.**, Pál G., **Nyitrai L.** (2011) DYNLL/LC8: A Light Chain Subunit of the Dynein Motor Complex and Beyond. *FEBS J*, **278**: 2980–96

Rapali P., **Radnai L.**, **Süveges D.**, Harmat, V., Tölgyesi, F., Wahlgren, W.Y., Katona, G., **Nyitrai L.**, Pál, G. (2011) Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders interactors in the human proteome. *PLoS One*, **6**: e18818

Radnai L., **Rapali P.**, **Hódi Z.**, **Süveges D.**, **Molnár T.**, **Kiss B.**, Bécsi, B., Erdődi J., Kardos M., Kovács M., **Nyitrai L.** (2010): Affinity, avidity and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain (DYNLL) isoforms. *J Biol Chem*, **285**: 38649–38657

6. Irányított fehérje-evolúció kutatócsoport

Csoportvezető: **Pál Gábor** docens. Munkatársak: Héja Dávid predoktor, Rapali Péter predoktor, Szakács Dávid PhD hallgató, Boros Eszter PhD hallgató

Válogatott publikációk:

Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K.A., Závodszky P., Gál P., **Pál G.** (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J Biol Chem*, **287**: 20290–20300

Héja D., **Kocsis A.**, Dobó J., Szilágyi K., Szász R., Závodszky P., **Pál G.**, Gál P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**:10498–503

Szenes Á., **Pál G.** (2012) Mapping Hidden Potential Identity Elements by Computing the Average Discriminating Power of Individual tRNA Positions. *DNA Res*, **19**: 245–258

Szabó A., Héja D., Szakács D., Zboray K., Kékesi K.A., Radisky E.S., Sahin-Tóth M., Pál G. (2011) High-affinity small protein inhibitors of human chymotrypsin C (CTRC) selected by phage display reveal unusual preference for P4' acidic residues. *J Biol Chem*, **286**: 22535-22545

Kocsis A., Kékesi K.A., Szász R., Végh B.M., Balczer J., Dobó J., Závodszy P., Gál P., Pál G. (2010) Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *J Immunol*, **185**: 4169-4178

7. Fehérje interakció kutatócsoport

Csoportvezető: **Reményi Attila** tud. főmts. Munkatársak: Alexa Anita tud. mts., Garai Ágnes PhD hallgató, Varga János PhD hallgató, Glatz Gábor PhD hallgató, Zeke András PhD hallgató, Rakács Marianna asszisztens

Válogatott publikációk:

Kapp G.T., Liu S., Stein A., Wong D.T., **Reményi A.**, Yeh B.J., Fraser J.S., Taunton J., Lim W.A., Kortemme T. (2012) Control of protein signaling using a computationally designed GTPase/GEF orthogonal pair. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 5277-82

Wojtasz L., Cloutier J., Baumann M., Daniel K., **Varga J.**, Fu J., Anastassiadis K., Stewart A.F., **Reményi A.**, Turner J. and Tóth A. (2012). Meiotic surveillance of asynapsis and a buildup of ATR activity along unsynapsed chromosome axis require HORMAD2. *Genes Dev*, **26**: 958-973

Alexa A., Varga J., Reményi A. (2010) Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *FEBS J*, **272**:4376-82

Mok J., Kim P.M., Lam H.Y., Piccirillo S., Zhou X., Jeschke G.R., Sheridan D.L., Parker S.A., Desai V., Jwa M., Cameroni E., Niu H., Good M., **Reményi A.**, Ma J.L., Sheu Y.J., Sassi H.E., Sopko R., Chan C.S., De Virgilio C., Hollingsworth N.M., Lim W.A., Stern D.F., Stillman B., Andrews B.J., Gerstein M.B., Snyder M., Turk B.E.. (2010) Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci Signal*, **3**: ra12

Zeke A., Lukács M., Lim W.A., Reményi A. (2009) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol*, **19**: 364-374

8. Molekuláris patomechanizmus kutatócsoport

Csoportvezető: Venekei István. Munkatársak: Molnár Szilárd PhD hallgató, Mustafa Massaoud predoktor

Válogatott publikációk:

Felföldi G., Elefterianos I., French-Constant R.H., **Venekei I.**, (2011) A serine proteinase homologue, SPH-3, plays a central role in insect immunity. *J Immunol*, **186**: 4828-4834

Massaoud M. K., Marokházi J., Fodor A., Venekei I. (2010) Proteolytic enzyme production by strains of insect pathogen *Xenorhabdus* and characterization of an early-log-phase-secreted protease as a potential virulence

factor. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 6901-6909

Felföldi G., Marokházi J., Képiró M., Venekei I. (2009) Identification of native target proteins indicates functions of a serralyisin-type protease, PrtA, in anti-immune mechanisms. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 3120-3126

Marokházi J., Mihala N., Hudecz F., Fodor A., Gráf L., **Venekei I.**, (2007) Cleavage site analysis of a serralyisin- like protease, PrtA, from an insect pathogen *Photorhabdus luminescens* and development of a highly sensitive and specific substrate. *FEBS J* **274**: 1946-1956

Marokházi J., Kóczán Gy., Hudecz F., Gráf L., Fodor A., **Venekei I.** (2004) Enzymatic characterization with progress curve analysis of a collagen peptidase from an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens*. *Biochem J*, **379**: 633-640

A KULCSTÓL A BULLDÓZERIG: SZÁRNYAS HÉLIX DOMÉNEK FUNKCIONÁLIS ADAPTÁCIÓJA DNS-KÖTŐ FEHÉRJÉKBEN

Harami Gábor, Gyimesi Máté, Kovács Mihály

*ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék
ELTE-MTA „Lendület” Motorenzimológiai Kutatócsoport
www.mk-lab.org*

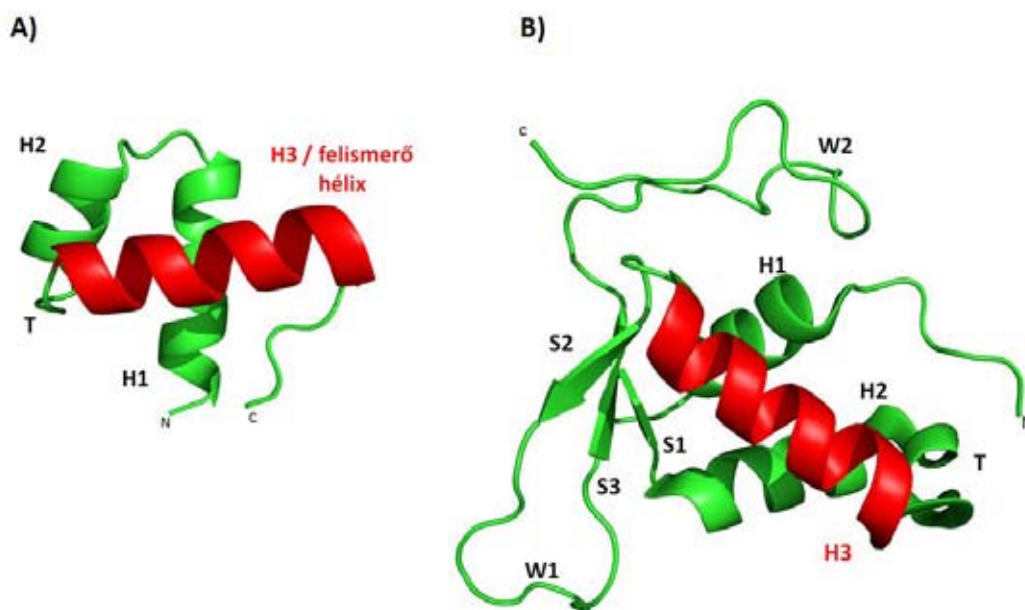
Összefoglalás

Motorenzimológiai kutatócsoportunk egyik fő érdeklődési területe a RecQ családba tartozó DNS-helikázok molekuláris működése és ennek szerepe a genomkarbantartó folyamatokban. A RecQ helikázok nélkülözhetetlen szereplői a DNS-hibák homológ rekombináción (HR) alapuló javításának. E működés alapfeltétele a RecQ helikázok összetett DNS-szerkezetek felismerésére és feldolgozására való képessége. A felismerés és feldolgozás mechanizmusa és szerkezeti alapjai azonban az intenzív vizsgálatok ellenére nagyrészt felderítetlenek. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a sokféle DNS-kötő fehérjében – így a RecQ helikázokban is – megtalálható szárnyas hélix (winged helix, WH) domén kulcsszereplője a DNS-szerkezetek felismerésének. E domén több száz fehérje – főként transzkripciós faktorok – esetében szekvencia-specifikus kettős-szálú (double-stranded, ds) DNS-kötést („kulcs”-funkciót) tesz lehetővé. Közelmúltbeli felfedezések azonban azt sugallják, hogy a WH domén a RecQ helikázokban különböző DNS-száltalálkozások és szálszerkezetek szekvencia-aspecifikus felismerésére és szétválasztására („bulldózer”-funkcióra) adaptálódott. Jelen összefoglalónkban a WH domének szerkezeti sajátosságait a RecQ helikázokban betöltött, mások és magunk által felderített funkcióival összekapcsolva mutatjuk be.

A WH domén felépítése

A hélix-fordulat-hélix (*helix-turn-helix*, HTH) szerkezeti motívumot közel 3000 ismert fehérjében – az azonosított nukleinsav-kötő fehérjék mintegy harmadában – azonosították [1]. A motívumban két α -hélix között egy rövid fordulat található (1A. ábra). A kanonikus HTH motívumban a két α -hélix tengelye egymással mintegy 120°-os szöveget zár be. E hélixekhez (H_2 és H_3) a legegyszerűbb HTH motívumok esetében is legalább egy további (az említettekhez képest N-terminálisan elhelyezkedő) α -hélix (H_1) csatlakozik, rendszerint egy hurokrégiónt keresztül. A fordulatot követő hélix (H_3) történeti okokból a felismerő (*recognition*) hélix nevet kapta, mivel számos fehérjében közvetlenül a szekvencia-specifikus nukleinsav-felismerésben játszik szerepet. A HTH motívum mindkét irányban további másodlagos szerkezeti elemekkel bővíthet. A járulékos elemek alapján számos HTH-altípust azonosítottak [1]. Egy addig ismeretlen HTH-variációt tartalmazó DNS-kötő domént fedeztek fel a hepatocita nukleáris faktor 3 (HNF-3) máj-specifikus transzkripciós faktor család egyik tagjában 1993-ban [2]. A HNF-3 γ fehérje DNS-kötő doménje három α -hélixből (amelyek közül a fordulat

a H_2 és H_3 elemek között található), három β -szálból (S_1 - S_3) és két viszonylag nagy méretű hurokból (W_1 és W_2) épül fel H_1 - S_1 - H_2 - T - H_3 - S_2 - W_1 - S_3 - W_2 sorrendben (1B. ábra). A szerzők e szerkezetet – a H_3 felismerő hélixet mintegy „szárnyként” (*wing*) ölelő hurkok (W_1 és W_2) konformációjától inspiráltnak – szárnyas hélix doménnek nevezték el [2]. A HNF-3 γ WH doménjének felfedezését követően számos, hasonló domént tartalmazó fehérjét azonosítottak. A WH-ként, illetve egyes esetekben wHTH (*winged helix-turn-helix*) néven besorolt domének közül sok esetében hiányzik a W_2 elem, illetve előfordulnak további szerkezeti variációk is [3]. E különbségek alapján a SCOP adatbázisban jelenleg 84 különböző WH doméntípust tartanak számon [1,3].

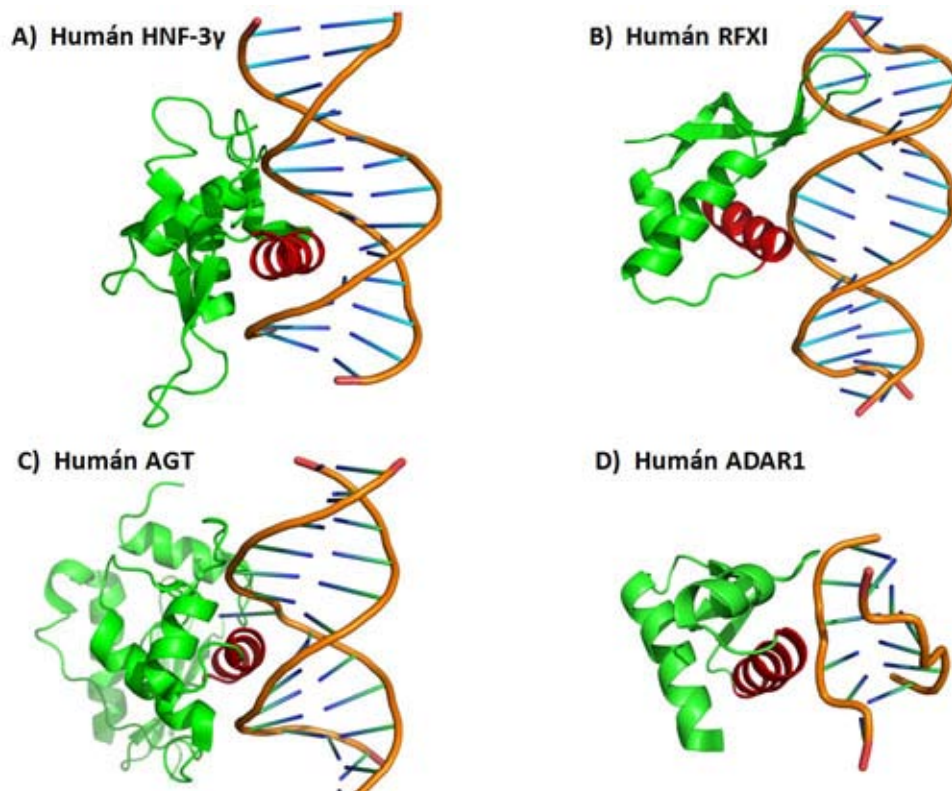


1. ábra. A HTH motívum (A) és a WH domén (B) felépítése. (A) A humán Pax5 transzkripció faktor kristályszerkezetében (1k78) megfigyelhető, három α -hélixet (H_1 - H_3) tartalmazó HTH (helix-turn-helix) motívum. A C-terminális α -hélix (piros, H_3) szekvencia-specifikus dsDNS-felismerésben betöltött szerepe alapján a „felismerő hélix” nevet kapta. A HTH motívumra jellemző fordulat (T) a felismerő hélixet előzi meg. (B) A humán HNF-3 γ transzkripció faktor szárnyas hélix doménjének kristályszerkezete (1vtn). A szerkezetben megtalálható hurkokat „szárnyak” (*wing*, W_1 és W_2) nevezték el.

A WH domén adaptációja: a kulcstól...

A WH domént funkcionálisan először szekvencia-specifikus dsDNS-kötő szerkezeti elemként azonosították. A HNF-3 γ transzkripció faktor esetében a specificitás a WH domén felismerő (H_3) hélixének töltéssel rendelkező aminosav-oldalláncai és a DNS-bázisok nagy árok felőli csoportjai közötti kölcsönhatások révén valósul meg (2A. ábra). A W_2 – és feltehetőleg a W_1 – szárny további DNS-kötő felületet alkot azáltal, hogy képes a kis árokhoz illeszkedve kötéseket létesíteni a DNS cukorfoszfát-gerincével [2]. A felismerő hélix és a nagy árok közötti kölcsönhatás kanonikusnak tekinthető a szekvencia-specifikus dsDNS-felismerést végző WH-doménes fehérjék körében [3].

A fenti kanonikus DNS-kötési móddal szemben az RFX1 transzkripciós faktorban a W_1 szárny lép kapcsolatba a DNS nagy árkával, míg a felismerő hélix – eredeti nevével ellentétben – nem járul hozzá a szekvencia-specifikus dsDNS-felismeréshez, hanem a kis árokkal létesít gyenge kölcsönhatást (2B. ábra) [4].



2. ábra. WH domének DNS-kötési módjai. (A) „Kanonikus” DNS-kötési mód figyelhető meg a humán HNF-3 γ transzkripciós faktor WH doménjének dsDNS-sel alkotott komplexében (1vtn). A felismerő hélix (piros) a DNS nagy árkába köt. A W_1 és W_2 szárnyak további kötőfelszínt alkotnak. (B) A humán RFX1 transzkripciós faktor (1dp7) a HNF-3 γ -étől eltérő DNS-kötési módot mutat: a szekvencia-specifikus dsDNS-felismerés a W_1 szárny és a DNS nagy árkának kölcsönhatása révén valósul meg. (C) A humán AGT fehérje az alkilált guanin bázisokat ismeri fel. Az AGT WH doménjének felismerő hélice a DNS kis árkába köt (1t38). (D) A humán ADAR1 fehérje $Z\alpha$ WH doménje Z-DNS-hez köt (1qbj). A felismerő hélix és a W_1 szárny a Z-DNS cukorfoszfát-gerincével alakít ki kapcsolatokat.

Egy további DNS-kötési módozat figyelhető meg az AGT (O_6 -alkilguanin-DNS metiltranszferáz) fehérjékben, amelyek a DNS alkilált guanin bázisait ismerik fel, és az alkilcsoport irreverzibilis eltávolítását végzik [5]. Az AGT-k esetében a katalitikus oldalláncokat hordozó felismerő hélix a kis árokba fekszik és azzal gyenge kölcsönhatást létesít (2C. ábra). A DNS-sel létesített kölcsönhatások nagy részét a felismerő hélixet szekvenciálisan megelőző és követő hélixeknek a DNS cukorfoszfát-gerincével alkotott kapcsolataik teszik ki [5].

A WH domén funkcionális adaptációjának szélsőséges módjával találkozunk a humán ADAR1 (dsRNS adenozin dezamináz) fehérje $Z\alpha$ doménjének esetében [6]. Az ADAR1 a mRNS információ-tartalmát módosítja az adenin bázisok oxidatív

dezaminálása (inozinná alakítása) révén. A feltehetőleg toborzó funkciójú Za WH domén specifikusan kötődik a balmenetes Z-DNS-szakaszokhoz, amelyek az RNS-polimeráz aktivitása során keletkezhetnek az mRNS-átírás helyén [6,7]. A Za domén felismerő hélice és W_1 szárnya főként a Z-DNS cukorfoszfát-gerincével lép kölcsönhatásba (2D. ábra); az egyetlen bázis-specifikus kölcsönhatás egy Z-DNS-specifikus *syn* konfigurációjú guaninnal jön létre.

A WH domén nukleinsav-kötő funkciója mellett szerepet játszik intra- és intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is. Az E2F4-DP2 heterodimer transzkripciós fehérjekomplex mindkét alegységének felismerő hélice (H_3) a kanonikus (HNF-3 γ típusú) DNS-kötés mellett kapcsolatba lép a másik alegység H_1 hélixével, lehetővé téve a dimerizációt [8]. A Fok1 endonukleázban három, egymást követő WH domén található, amelyek közül az N-terminális felőli két WH domén kanonikus (HNF-3 γ) típusú, szekvencia-specifikus dsDNS-kötést valósít meg [9]. Ezzel szemben a C-terminális WH domén a DNS-től távolabb helyezkedik el és feltehetőleg az intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában jut szerephez. A humán RPA (replikációs protein A, egyszálú DNS-kötő fehérje) heterotrimer 32 kDa-os alegységében található WH domén eddigi ismereteink alapján nem lép kapcsolatba a DNS-sel; ehelyett kölcsönható felszín biztosít számos partnerfehérje számára [10].

A fenti példák alátámasztják, hogy a WH domén szerkezete a funkcionális adaptáció szekvencia- illetve szerkezet-specifikus DNS-kötéstől a fehérje-fehérje kölcsönhatásokig terjedő széles spektrumát tette lehetővé. Az alábbiakban látni fogjuk, hogy a fentieken túlmenően e doméntípus a helikáz enzimek DNS-szerkezetátalakító mechanokémiai működésében is hasznos alkatrésznek bizonyul.

...a bulldózerig

A helikázok az ATP-hidrolízisből származó szabadentalpiát a kettősszálú nukleinsav-szakaszok szálainak – önmagában energetikailag kedvezőtlen – szétválasztására hasznosítják. A szálszétválasztó aktivitás az egyszerűbb DNS-szerkezetek (pl. tompa végű vagy egyszálú (*single-stranded*, ss) túlnyúlást tartalmazó dsDNS) mellett *in vivo* gyakran bonyolultabb struktúrák, például HR-köztitermékek – háromszálú D-hurok és négyszálú Holliday-kereszt szerkezetek – feldolgozását teszi lehetővé.

A helikázok hatodik szupercsaládjába tartozó RuvB enzim két hexamer gyűrűje a RuvA és RuvC fehérjékkel együtt alkotja a Holliday-kereszt szerkezeteket mozgató (*branch migration*) és feloldó (*resolution*) rezolváz komplexet [11]. A RuvB helikázban az N-terminális, AAA+ típusú motordomént egy WH domén követi [12]. Mutációs vizsgálatok alapján a WH domén nélkülözhetetlen szerepet játszik a Holliday-szerkezetek felismerésében, jóllehet izolált formában nem képes DNS kötésére [13]. A RuvB DNS-kötött kristályszerkezete ismeretlen, ám a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a RuvABC holoenzim WH doménjei a Holliday-kereszt két átellenes szárát alkotó dsDNS-ágakkal lépnek kölcsönhatásba. A RuvB WH domén felismerő hélixének és W_1 szárnyának elektrosztatikus sajátosságai alapján feltételezhető, hogy a WH domén kanonikus módon, de szekvencia-aspecifikusan kötődik a dsDNS-régiókhöz és ezáltal „szálvezető”

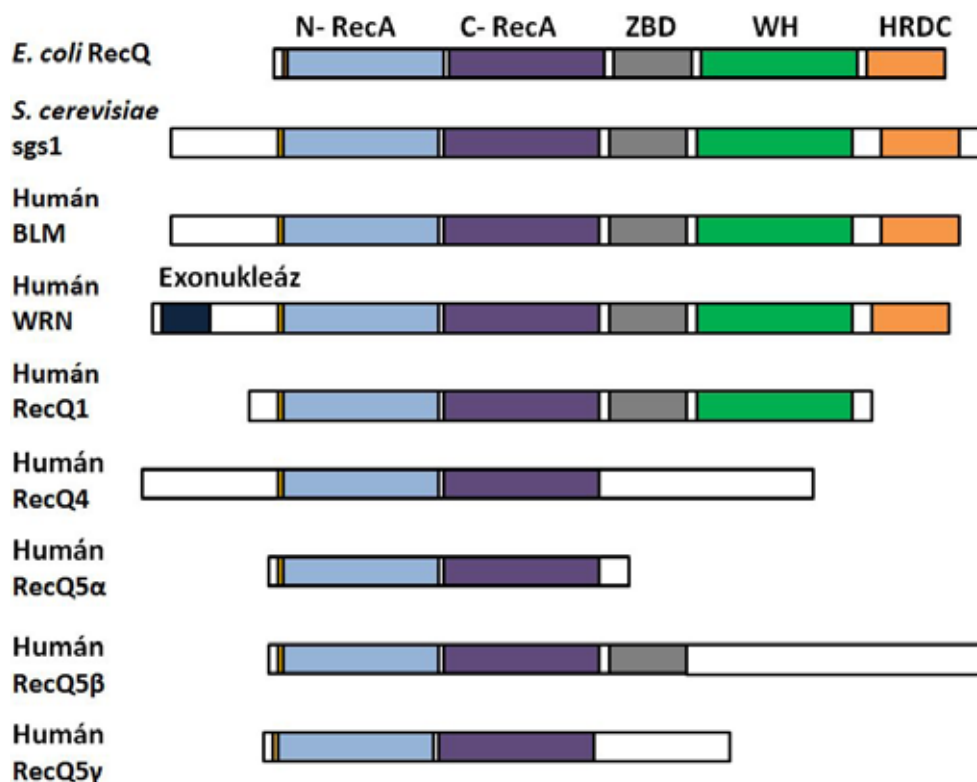
funkciót tölt be [12].

A második helikáz szupercsaládba tartozó RecQ család tagjai minden élő szervezetben megtalálhatók, és központi szerepet töltenek be a DNS-károsodások HR-n alapuló hibamentes javításában [14]. Az emberi genom öt RecQ helikáz kódol: a RecQ1, BLM, WRN, RecQ4 és RecQ5 enzimeket. A RecQ helikázok DNS-hibajavításban betöltött központi szerepét tükrözi, hogy az öt paralóg közül háromnak a mutációihoz súlyos klinikai tünetegyüttesek társíthatók. A BLM helikáz mutációi a Bloom szindrómát, a WRN-é a Werner szindrómát, míg a RecQ4-é a Rothmund-Thomson szindrómát okozzák. E betegségek jellegzetes tünetei között szerepel a felgyorsult öregedés és a különböző ráktípusokra való fokozott hajlam [15].

DNS-hibajavító működésüket a RecQ helikázok sokrétű molekuláris aktivitásaik révén fejtik ki. A dsDNS szálainak szétválasztása mellett ezen aktivitások között szerepel az egyszálú DNS-túlnyúlások létrehozásához szükséges nukleolitikus folyamat (*resection*) elősegítése [16-18], a rekombináz nukleoprotein-szálak szétbontása [19], illetve ezek szálcserélő aktivitásának elősegítése [20], a D-hurkok felbontása [21], ssDNS-szakaszok párosítása [22], illetve a kettős Holliday-szerkezetek megoldásához (*dissolution*) vezető, topoizomerázokkal együttműködésben végzett konvergens hídmozgatás (*convergent branch migration*) is [23]. E sokrétű aktivitások végrehajtása komplex fehérje-architektúrát igényel, ami a RecQ helikázok doménszerkezetében is tükröződik. Valamennyi RecQ enzim tartalmazza a két tandem RecA-típusú doménből álló helikáz magrégiót, amely az ATP-hidrolitikus kémiai reakciót az ssDNS-szálon történő egyirányú tovahaladás (transzlokáció) mechanikai eseményéhez kapcsolja. A RecA doméneket a család tagjainak nagy részében ZBD (*zinc-binding domain*, Zn²⁺-kötő domén), WH és HRDC (helikáz és RNázD C-terminális) domének követik (**3. ábra**) [24]. A ZBD nélkülözhetetlen a RecQ helikázok megfelelő feltekeredéséhez, és feltehetőleg szerepet játszik a DNS kötésében is [19,25,26]. A HRDC domén funkciójáról kevés ismerettel rendelkezünk. Az *E. coli* RecQ enzim HRDC doménje képes kötődni az ssDNS-hez; feltételezések szerint e domén szerepet játszik a szálszétválasztás során felszabaduló ssDNS-szálak újrapárosodásának meggátolásában [27]. A WRN és BLM helikázok esetében a HRDC domén DNS-szerkezet-felismerő funkcióját is kimutatták [28].

Más HR-fehérjékhez hasonlóan a RecQ helikázok is nagy affinitással kötődnek komplex szerkezetű HR-köztitermékekhez és hibajavítási célstruktúrákhoz: D-hurkokhoz, Holliday-keresztekhez, replikációs villákhoz és G-tetraplexekhez [14]. E DNS-szerkezetek felismerésének mechanizmusa azonban a RecQ helikázok 1983-as felfedezése óta még mindig jórészt felderítetlen [24]. Az utóbbi években publikált adatok arra utalnak, hogy a család legtöbb tagjában megtalálható WH doménnek sajátos szerepe van a DNS-szubsztrátok szálszerkezet-specifikus felismerésében és átalakításában. Ez alapján a funkcionális adaptáció különleges példájának képe kezd kirajzolódni.

A RecQ helikázok WH doménjének másodlagos szerkezeti elemei valamennyi ismert esetben H₁-H₂-H₃-T-H₄-S₁-W₁-S₂-H₅ sorrendben követik egymást: a szer-



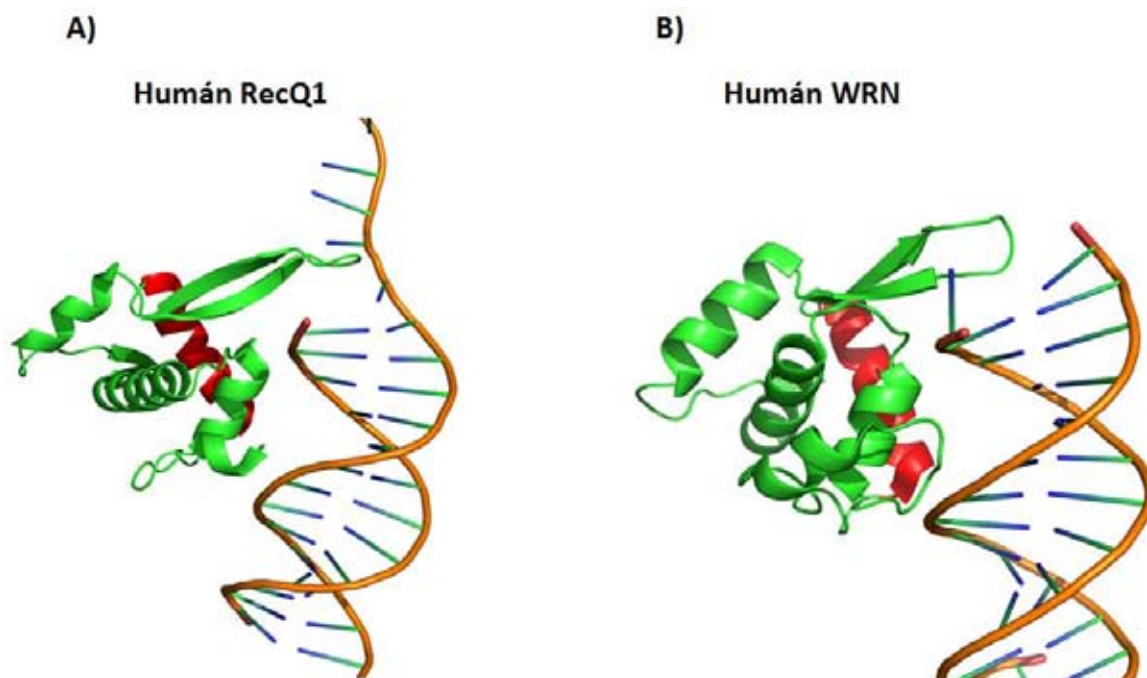
3. ábra. A RecQ család tagjainak sematikus (nem hosszarányos) doméntérképe.

A két RecA domén (világoskék és sötétkék) alkotja a helikáz magrégiót. A család tagjainak többsége tartalmaz ZBD (zinc-binding domain, Zn²⁺ kötő domén, szürke), WH (winged helix, szárnyas hélix, zöld) és HRDC (helikáz és RNázD C-terminális domén, narancs) doméneket. A RecQ családban egyedülálló módon a humán WRN fehérje N-terminális exonukleáz domént is tartalmaz. A humán RecQ5 fehérjének három splice-formája (α , β , γ) ismert.

kezetből a HNF-3 γ típusú transzkripciós faktoroknál megfigyelhető W₂ szárny hiányzik. E konzervált felépítés ellenére a RecQ-családbeli WH domének aminosav-szekvenciája alacsony fokú konzerváltságot mutat a RecA motordoménéhez képest [24]. Az öt humán RecQ-homológ különböző élettani folyamatokban vesz részt, amelyek során az egyes enzimek különféle komplex DNS-szerkezetek feloldozását végzik [29,30]. Hipotézisünk alapján a WH domének szekvenciális és finomszerkezeti különbségei hozzájárulhatnak a RecQ enzimek funkcionális diverzitásához. A WH domén szerkezet-specifikus DNS-felismerésben betöltött szerepét támasztja alá, hogy a humán BLM helikáz izolált ZBD + WH régiója hasonló affinitással kötődik G-tetraplex szubsztrátokhoz, mint a teljes hosszúságú fehérje [31]. A humán RecQ5 β helikázról, amelyből természetes módon hiányoznak a WH és HRDC domének (3. ábra), kimutatták, hogy az csak egyszerű DNS szerkezetek felbontására képes [32].

A WH domén meglepő DNS-kölcsönhatási módja figyelhető meg a humán RecQ1 helikáz RecA + ZBD + WH régiójának ssDNS-túlnyúlással rendelkező dsDNS jelenlétében megoldott kristályszerkezetében (4A. ábra) [33].

A szerkezetben a WH domén β -hajtú eleme (S₁-W₁-S₂) az ssDNS-dsDNS csatlakozási ponthoz nyúlik, miközben a hajtú csúcsán elhelyezkedő tirozil oldallánc a

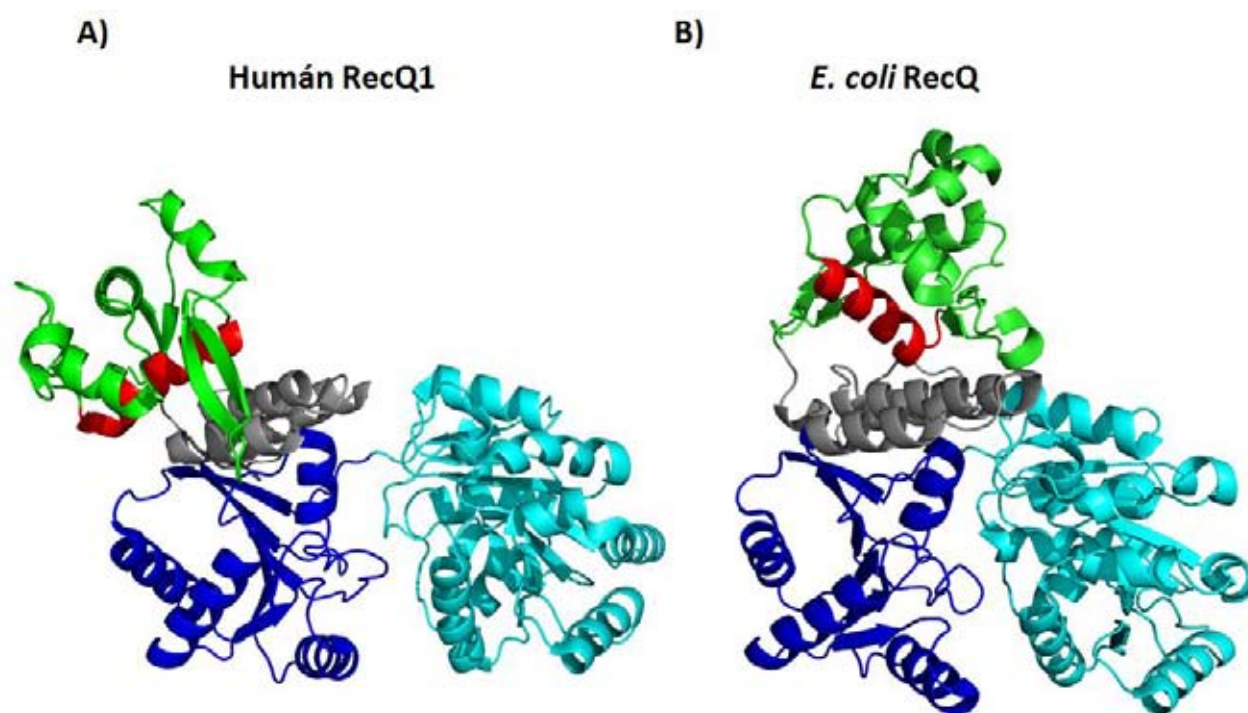


4. ábra. A humán RecQ1 (2wwy, A) és WRN (3aaf, B) helikázok WH doménjének kölcsönhatása dsDNS-sel. A RecQ1 és WRN helikázokban megtalálható, a transzkripciós faktorok felismerő hélixével azonos pozícióban lévő H_4 hélix (piros) a DNS-től távolabb helyezkedik el. A WH-DNS kölcsönhatás a W_1 szárnyon keresztül jön létre. A dsDNS utolsó bázispárja mindkét fehérje esetében szétválik a W_1 szárny dsDNS-hez történő kötésének hatására. E szerkezeti megfigyelések alátámasztják a WRN és RecQ1 helikázok WH doménjének dsDNS-szálszétválasztásban betöltött elengedhetetlen szerepét.

dsDNS 5'-végi bázispárját mintegy „tolólapátként” kifordítja a kettős hélixből. Hasonló kölcsönhatás figyelhető meg a humán WRN helikáz izolált WH doménjének dsDNS jelenlétében megoldott kristályszerkezetében is (4B. ábra) [34]. A felismerő hélix a RecQ1 szerkezetben a ZBD és RecA domének közelében (5A. ábra), illetve – mind RecQ1, mind WRN esetében – a DNS-től távolabb helyezkedik el. A W_1 szárnyak a RecQ1 helikáz DNS-szálszétválasztó működésében betöltött szerepét pontmutációs analízissel is igazolták: a szárny végén elhelyezkedő tirozin alaninra cserélése a szálszétválasztó aktivitás elvesztését okozta [33]. A WRN helikáz WH domént érintő különböző deléciói is a szálszétválasztó aktivitás csökkenését eredményeztek [35].

A WRN és RecQ1 helikázok WH doménjének fenti „tolólapát”-funkciója mindazonáltal nem általánosítható a teljes RecQ család esetében. Az *E. coli* RecQ enzim RecA + ZBD + WH régiójának kristályszerkezetében (5B. ábra) a W_1 szárny csúcsán nem található aromás aminosav [36], illetve a szárnyrégió mutációi sem okozzák a dsDNS-szálszétválasztó aktivitás jelentős csökkenését [33]. A részben laboratóriumunkban kidolgozott DNS-szerkezetátalakító és nukleoproteinlebontó aktivitás-vizsgálatok [37 -39] révén kimutattuk, hogy egy, a WH domént nem tartalmazó csonka humán BLM helikáz konstrukció megőrzi az említett aktivitásokat [19]. A WH domén eltávolítása azonban jelentősen csökkentette az összetett DNS-szerkezetek feldolgozásának hatékonyságát, amely megfigyelés jelenleg folyó részletesebb vizsgálataink alapját képezi (publikálatlan adatok).

A fenti eredmények érdekes összefüggést láttatnak a W_1 -régió konformációja és a szárnynak a DNS-szálszétválasztásban betöltött szerepe között. A RecQ1 és WRN helikázokban, amelyekben a W_1 a szétválasztáshoz elengedhetetlenül szükséges tolólapátként funkcionál, a szárny jelentős hosszúságban β -hajtú konformációt vesz fel, míg a szárny nélkül is aktív *E. coli* RecQ helikáz szerkezetében a hajtú lényegesen rövidebb β -szálakat tartalmaz (5. ábra). Ezzel összhangban megfigyelhető, hogy a RecQ családon kívül számos más, első és második szupercsaládba tartozó helikázban található jelentős méretű β -hajtú szerkezet, amely tolólapát-szerepet játszik a DNS-szálak szétválasztásában. Az első szupercsalád tagjaiban, melyekben a motormagot az SF2 helikázokhoz hasonlóan két RecA-homológ domén alkotja, a tolólapát – a transzlokáció irányultságával összefüggésben – az első vagy második RecA doménben helyezkedik el [40].



5. ábra. A humán RecQ1 (2v1x, A) és *E. coli* RecQ (1oyw, B) helikázok WH doménjeinek eltérő konformációi. A két fehérje motorrégiója (RecA domének, világoskék és sötétkék) és ZBD doménje (szürke) nagymértékű szerkezeti hasonlóságot mutat, azonban a WH domén (zöld) szerkezete és orientációja eltérő. A humán RecQ1 helikáz WH doménjében található H_4 hélix (piros) temetetlen helyezkedik el. Az *E. coli* RecQ helikáz H_4 hélice felszíni pozíciót vesz fel, a β -hajtú elem (S_1 - W_1 - S_2 , az ábrán a H_4 mögött látszik) viszont jóval rövidebb, mint a humán RecQ1 helikázban (az ábrán a H_4 hélix előtt) megfigyelhető.

További érdekes megfigyelés, hogy a WH domén az enzim többi doménjéhez viszonyítva jelentősen eltérő orientációban mutatkozik az *E. coli* RecQ és humán RecQ1 fehérjék kristályszerkezeteiben [33,36] (5. ábra). Az eddigi szerkezeti vizsgálatokban a WH domén orientációját az enzimekhez kötött ligandumok jelenléte nem befolyásolta (az *E. coli* RecQ szerkezetét ligandummentes és ATP γ S (ATP-analóg) -kötött, míg a humán RecQ1-ét ADP- illetve DNS-kötött állapotban sikerült meghatározni). Az *E. coli* RecQ enzim WH doménjében a felismerő hélix felszíni pozícióban, míg a RecQ1-ben eltemetetlen helyezkedik el. Teljesen fel-

derítetlen probléma, hogy az ismert eltérő konformációk vajon a RecQ helikázok enzimek mechanizmusának különböző szerkezeti köztiállapotait képviselik, vagy pedig a konformációs különbségek izoforma-specifikusak, és a WH domén nem végez jelentős mozgást a helikáz működés során. E kérdés megválaszolására jelenleg folytatunk kísérleteket, amelyekben a WH és RecA doménekre helyezett pirén excimer fluoreszcens szenzorok segítségével kívánunk információt nyerni az enzimek konformációs mozgásairól, amelyekről jelenleg semmilyen adat nem áll rendelkezésre.

A teljesség kedvéért megemlítendő, hogy DNS-kötés mellett a RecQ helikázok WH doménjei fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására is képesek. Az *E. coli* RecQ helikáz kölcsönhatása az SSB (*single-stranded DNA binding*, ssDNS-kötő) fehérjével a WH doménon keresztül jön létre [41]. Számos, a WH doménon keresztül kölcsönható kötőpartnert azonosítottak a humán WRN és BLM helikázok esetében is [42,43].

Kitekintés

A konzervált felépítésű WH domén számos funkció ellátására adaptálódott az evolúció során. Szerkezeti sajátosságai egyaránt lehetővé teszik a nukleinsavakkal és fehérjékkel való kölcsönhatást. A WH domén szerepe a RecQ helikázok genomkarbantartó működésében az utóbbi időben került az érdeklődés homlokterébe. A rendelkezésünkre álló adatok arra utalnak, hogy a WH domén a RecQ helikázokban az elágazó (széttartó) DNS-szálszerkezetek specifikus felismerését, az enzimek ilyen elemeket tartalmazó DNS-szubsztrátokhoz (HR-köztitermékekhez) való toborzását és e DNS-szerkezetek biológiailag hatékony feldolgozását teszi lehetővé. A WH domének szerkezetében és DNS-szálszétválasztásban betöltött funkciójában mutatkozó különbségek részben magyarázhatják a RecQ család tagjainak eltérő biológiai specificitásait. Elképzelésünk szerint a RecQ helikáz család tagjai két csoportra oszthatóak a WH domén DNS-szálszétválasztásban betöltött szerepe alapján. Az első csoportba a humán WRN és RecQ1 enzimek tartoznak, amelyekben a WH domén szárnya esszenciális tolólapátként funkcionál. A második csoport tagjai közé soroljuk a humán BLM és az *E. coli* RecQ helikázokat, amelyek alapvető szálszétválasztó aktivitásához a WH domén nélkülözhető, viszont e domén elősegíti a bonyolultabb DNS-szerkezetek hatékony felbontását. Csoportunkban jelenleg az *E. coli* RecQ és humán BLM helikázok WH doménjeinek szerepét vizsgáljuk enzimkinetikai és egyedi molekula-biofizikai módszerekkel. Reményeink szerint a WH domének sajátosságainak megismerése új nézőpontokkal fogja gazdagítani mind a genomkarbantartó folyamatok, mind a fehérje-nukleinsav kölcsönhatások megértését.

Irodalomjegyzék

- [1] Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, **29(2)**: 231-262.
- [2] Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364(6436)**: 412-420.

- [3] Gajiwala, K.S., Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10(1)**: 110-116.
- [4] Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B., Burley, S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403(6772)**: 916-921.
- [5] Daniels, D.S., Woo, T.T., Luu, K.X., Noll, D.M., Clarke, N.D., Pegg, A.E., Tainer, J.A. (2004) DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*, **11(8)**: 714-720.
- [6] Schwartz, T., Rould, M.A., Lowenhaupt, K., Herbert, A., Rich, A. (1999) Crystal structure of the Zalpha domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*, **284(5421)**: 1841-1845.
- [7] Wang, G., Vasquez, K.M. (2007) Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci*, **12**: 4424-4438.
- [8] Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C.O., Pavletich, N.P. (1999) Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev*, **13(6)**: 666-674.
- [9] Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., Aggarwal, A.K. (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature*, **388(6637)**: 97-100.
- [10] Deng, X., Habel, J.E., Kabaleeswaran, V., Snell, E.H., Wold, M.S., Borgstahl, G.E.O. (2007) Structure of the full-length human RPA14/32 complex gives insights into the mechanism of DNA binding and complex formation. *J Mol Biol*, **374(4)**: 865-876.
- [11] Dickman, M.J., Ingleston, S.M., Sedelnikova, S.E., Rafferty, J.B., Lloyd, R.G., Grasby, J.A., Hornby, D.P. (2002) The RuvABC resolvosome. *Eur J Biochem*, **269(22)**: 5492-5501.
- [12] Putnam, C.D., Clancy, S.B., Tsuruta, H., Gonzalez, S., Wetmur, J.G., Tainer, J.A. (2001) Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol*, **311(2)**: 297-310.
- [13] Ohnishi, T., Hishida, T., Harada, Y., Iwasaki, H., Shinagawa, H. (2005) Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J Biol Chem*, **280(34)**: 30504-30510.
- [14] Bernstein, K.A., Gangloff, S., Rothstein, R. (2010) The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu Rev Genet*, **44**: 393-417.
- [15] Bohr, V.A. (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci*, **33(12)**: 609-620.
- [16] Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., Jackson, S.P. (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev*, **22(20)**: 2767-2772.
- [17] Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., Kowalczykowski, S.C. (2010) DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, **467(7311)**: 112-116.
- [18] Nimmonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., Kowalczykowski, S.C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*, **25(4)**: 350-362.
- [19] Gyimesi, M., Harami, G.M., Sarlós, K., Hazai, E., Bikádi, Z., Kovács, M. (2012) Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core

- region comprising the RecA and Zn-binding domains. *Nucleic Acids Res*, **40(9)**: 3952-3963.
- [20] Bugreev, D.V., Mazina, O.M., Mazin, A.V. (2009) Bloom syndrome helicase stimulates RAD51 DNA strand exchange activity through a novel mechanism. *J Biol Chem*, **284(39)**: 26349-26359.
- [21] Bachrati, C.Z., Borts, R.H., Hickson, I.D. (2006) Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res*, **34(8)**: 2269-2279.
- [22] Cheok, C.F., Wu, L., Garcia, P.L., Janscak, P., Hickson, I.D. (2005) The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **33(12)**: 3932-3941.
- [23] Plank, J.L., Wu, J., Hsieh, T.S. (2006) Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103(30)**: 11118-11123.
- [24] Vindigni, A., Marino, F., Gileadi, O. (2010) Probing the structural basis of RecQ helicase function. *Biophys Chem*, **149(3)**: 67-77.
- [25] Guo, R.B., Rigolet, P., Zargarian, L., Fermandjian, S., Xi, X.G. (2005) Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res*, **33(10)**: 3109-3124.
- [26] Liu, J.L., Rigolet, P., Dou, S.X., Wang, P.Y., Xi, X.G. (2004) The zinc finger motif of Escherichia coli RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J Biol Chem*, **279(41)**: 42794-42802.
- [27] Bernstein, D.A., Keck, J.L. (2005) Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure*, **13(8)**: 1173-1182.
- [28] Samanta, S., Karmakar, P. (2012) Recruitment of HRDC domain of WRN and BLM to the sites of DNA damage induced by mytomyacin C and methyl methanesulfonate. *Cell Biol Int*,
- [29] Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D. (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res*, **29(13)**: 2843-2849.
- [30] Popuri, V., Bachrati, C.Z., Muzzolini, L., Mosedale, G., Costantini, S., Giacomini, E., Hickson, I.D., Vindigni, A. (2008) The Human RecQ helicases, BLM and RECQ1, display distinct DNA substrate specificities. *J Biol Chem*, **283(26)**: 17766-17776.
- [31] Huber, M.D., Duquette, M.L., Shiels, J.C., Maizels, N. (2006) A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J Mol Biol*, **358(4)**: 1071-1080.
- [32] Garcia, P.L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S.C., Janscak, P. (2004) Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *EMBO J*, **23(14)**: 2882-2891.
- [33] Pike, A.C.W., Shrestha, B., Popuri, V., Burgess-Brown, N., Muzzolini, L., Costantini, S., Vindigni, A., Gileadi, O. (2009) Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106(4)**: 1039-1044.
- [34] Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. (2010) Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure*, **18(2)**: 177-187.
- [35] von Kobbe, C., Thomä, N.H., Czyzewski, B.K., Pavletich, N.P., Bohr, V.A. (2003) Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J Biol Chem*, **278(52)**: 52997-53006.

- [36] Bernstein, D.A., Zittel, M.C., Keck, J.L. (2003) High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic core. *EMBO J*, **22(19)**: 4910-4921.
- [37] Gyimesi, M., Sarlós, K., Derényi, I., Kovács, M. (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **38(13)**:4401-4414.
- [38] Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*,
- [39] Gyimesi, M., Sarlós, K., Derényi, I., Kovács, M. (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res*, **38(7)**:e102.
- [40] Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P., Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, **20(3)**:313-324.
- [41] Shereda, R.D., Reiter, N.J., Butcher, S.E., Keck, J.L. (2009) Identification of the SSB binding site on E. coli RecQ reveals a conserved surface for binding SSB's C terminus. *J Mol Biol*, **386(3)**:612-625.
- [42] Lee, J.W., Harrigan, J., Opresko, P.L., Bohr, V.A. (2005) Pathways and functions of the Werner syndrome protein. *Mech Ageing Dev*, **126(1)**:79-86.
- [43] Sharma, S., Sommers, J.A., Wu, L., Bohr, V.A., Hickson, I.D., Brosh, R.M. (2004) Stimulation of flap endonuclease-1 by the Bloom's syndrome protein. *J Biol Chem*, **279(11)**:9847-9856.



Harami Gábor az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 2010-ben. Tanulmányait az ELTE Szerkezeti Biokémia PhD program keretei között folytatja, jelenleg másodéves hallgató. Munkáját Kovács Mihály kutatócsoportjában végzi. Fő kutatási területe a RecQ helikázok működési mechanizmusának felderítése szerkezet-funkció összefüggések vizsgálatával.



Gyimesi Máté az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 2004-ben. Tanulmányait az ELTE Biokémiai tanszékén folytatta, ahol a Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában, Málnási-Csizmadia András kutatócsoportjában 2008-ban szerzett PhD fokozatot. Munkáját 2012-ig a Kovács Mihály által vezetett Motorenzimológiai Kutatócsoportban folytatta az ELTE-n. Jelenleg a University of California (Davis) egyetemen dolgozik egy Marie Curie ösztöndíj támogatásával. Fő érdeklődési területe a genomkarbantartó funkciókat végző motorenzimek, ezen belül a DNS-hibajavításban szerepet játszó enzimek vizsgálata, továbbá a kromatinstruktúrát átalakító enzimek hatásmechanizmusának felderítése.



Kovács Mihály az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 1998-ban. Tanulmányait az ELTE-n és a Leicesteri Egyetemen folytatta, 2002-ben kapott PhD fokozatot. Ezután három évig az USA-beli National Institutes of Health-ben dolgozott posztdoktorként. Jelenleg az ELTE Biokémiai Tanszékén az ELTE-MTA „Lendület” Motorenzimológiai Kutatócsoportot vezeti (www.mk-lab.org). Fő érdeklődési területe különböző biológiai motorok (aktomiozin rendszerek, DNS helikázok) működési és szabályozási mechanizmusainak, valamint mechanikai erők enzim-működésre gyakorolt hatásainak vizsgálata.

A KUPLUNG FELENGEDÉSE: AZ S100A4 – MIOZIN IIA KÖLCSÖNHATÁS ÉS A SEJTMIGRÁCIÓ

Kiss Bence és Nyitray László

ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Összefoglalás

Az S100A4 (metasztazin) egy, a Ca²⁺-kötő S100 fehérjecsaládba tartozó, gerinces-specifikus homodimer fehérje, mely összefüggésbe hozható számos ráktípus áttétképző hajlamával és több más, megnövekedett sejtmigrációval járó betegséggel. Ca²⁺-függő módon kötődik a nem-izom sejtekre jellemző miozin IIA (NMIIA) motorfehérjéhez. A kölcsönhatás következtében a miozin filamentumok depolimerizálnak, a sejtek motilitása fokozódik. Meghatároztuk az S100A4 – NMIIA komplex atomi felbontású szerkezetét, és mechanisztikus magyarázatot adunk a filamentumok szétesésének molekuláris hátterére. A három gerinces NMII izoforma kötési szelektivitását vizsgálva kimutattuk, hogy az S100A4 az NMIIA-hoz hasonló affinitással kötődik az NMIIIC izoformához is, amely tény segíthet az NMIIIC eddig kevésbé ismert *in vivo* szerepének feltárásában. Az S100A4 – NMIIA komplex szerkezete merőben új típusú, aszimmetrikus kölcsönhatásra világít rá az S100 családban: egyetlen, zömében α -helikális miozin peptid körülöleli az S100A4 homodimert, elfoglalván mindkét „kanonikus” kötőzsebet. Kísérleteink alapján a filamentumok depolimerizációja a következő mechanizmussal megy végbe: az S100A4 dimerek megkötik a miozin nehézlánc C-terminális random-coil régióját, majd magukra tekerik a szomszédos coiled-coil régiót. Ezzel tönkreteszik a dimerizációért és a filamentumok kialakulásáért felelős ún. assembly competence domént, a miozin filamentum szétesésnek, így a retrográd aktin áramlásért felelős miozin gátlódik, s az aktin polimerizáció erőhatása a sejtet előre tudja mozgatni. Nem kerülte el a figyelmünket, hogy a komplex szerkezetének ismerete elősegítheti terápiás célú S100A4 inhibitorok fejlesztését is.

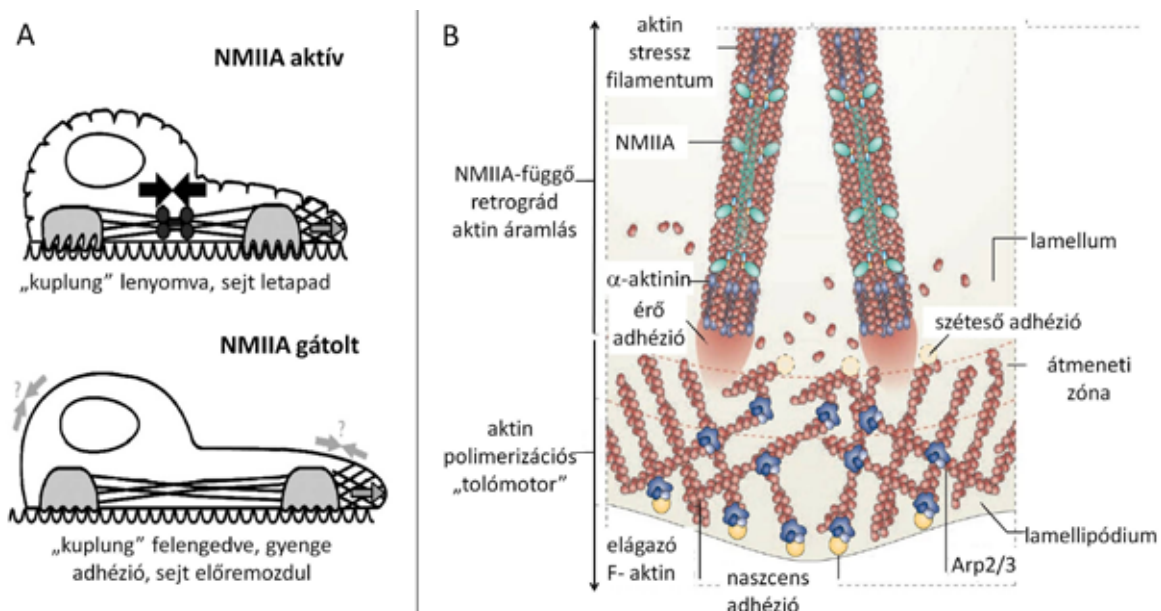
Bevezetés

A Ca²⁺-kötő EF-kéz szupercsaládba tartozó S100 fehérjék az evolúció során a gerincesekben jelentek meg, és több mint 20 paralógjuk változatos szerepet tölt be a Ca²⁺-homeosztázis, a sejtciklus, a sejtnövekedés, a sejdifferenciáció, az apoptózis és a sejtmigráció szabályozásában. Érdekes módon az extracelluláris térbe is kikerülnek, és ott oligomerizálódva citokin-szerű funkcióval rendelkeznek. Túlműködésük számos patológiás állapot kiváltója és/vagy velejárója lehet, kezdve a rákaktól, neurodegeneratív és kardiomiopátiás betegségeken át az övsömörig és más gyulladáshoz vezető megbetegedésekig [1]. Nevüket arról a tulajdonságukról kapták, hogy 100%-os telítettségű ammónium-szulfát oldattal sem lehet őket kisózni.

Az S100A4 (korábbi nevén metastztazin) megnövekedett expressziója összefüggésbe hozható számos ráktípus megnövekedett áttétképző hajlamával, il-

letve több más, megnövekedett sejtmigrációval járó betegséggel, így például a reumás ízületi gyulladással is. Fiziológiásan a migrációra képes sejtekben, így fibroblasztokban, makrofágokban, illetve limfocitákban expresszálódik, és az egyedfejlődés során serkenti az ún. epitheliális-mezenchimális átalakulást [1]. A sejtek motilitásának, illetve a metasztázáló képességének fokozásához az intra-, és az extracelluláris formája is hozzájárul. Extracellulárisan az annexin-2A-hoz kötve a szöveti plazminogén aktivációját serkenti, mely mátrix metalloproteázok aktivációjához, végül az extracelluláris mátrix átépüléséhez vezet, megkönnyítve a motilis sejtek vándorlását. Az S100A4 oligomerek (amelyek szerkezetét kevéssé ismerjük) feltételezhetően mintázat-felismerő receptorokhoz (pl. RAGE) kötve gyulladást kiváltó gének expresszióját váltják ki [2].

Az S100A4 legjobban jellemzett sejten belüli kötőpartnere a nem-izom miozin IIA motorfehérje (NMIIA) [3-6]. A nem-izom típusú konvencionális miozinnak a gerincesekben három, expressziós mintázatában, sejten belüli lokalizációjában és részben működésében eltérő izoformája ismert (*Biokémia* (2008) **32**: 78-81). Míg az NMIIA izoforma jellemzően a migráló sejtek vezető élén lokalizálódik és funkciójának gátlása (nehézlánc foszforiláció, illetve S100A4 kötődés) a sejtek megnövekedett motilitásához vezet, addig az NMIIIB a hátsó végén és a mikrotubulus organizáló centrumban található meg és az S100A4 nem kötődik hozzá. Az NMIIIC izoformáról keveset tudunk. A Ca^{2+} -kötött S100A4 jelenlétében a miozin minifilamentumok (az izmoktól eltérően a nem-izom miozinon csak egy-két tucat molekulából álló bipoláris filamamentumot képeznek) szétesnek illetve a miozin polimerizációja gátlódik. Ezt a hatást *in vivo* is sikerült kimutatni [7]. A filamentumok depolimerizációja gátolja a motor működését, mivel az NMIIA nem processzív, hanem ún. „csoportos motor”, az izom miozinokhoz hasonlóan.



1. ábra. Egy polarizált, migrációra képes sejt vázlatos képe oldalnézetben (A) és a vezető él fő szerkezeti elemei és fő fehérjekomponensei felülnézetben (B). A „kuplung” hipotézis magyarázza a két erőgeneráló komponens (elágazó aktin polimerizáció a lamellipódiumban és aktomiozin kontrakció a lamellumban) és az extracelluláris mátrixra, mint szubsztrátumra történő erőátvitel szabályozott voltát. A módosított ábrák forrása [8, 9].

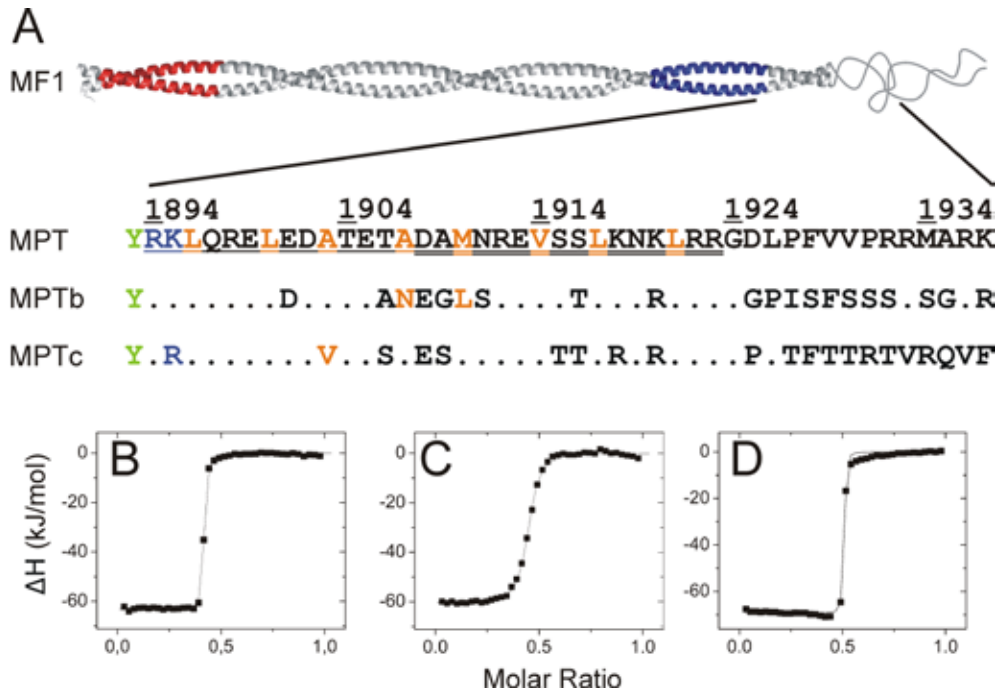
Hogyan növekszik a sejtek motilitása a miozin motor gátlásának hatására? Az erre a kérdésre adandó válaszhoz először röviden tekintsük át, hogy mit tudunk a sejt migráció „motorikus” hátteréről, az erőgenerálásról és az erőátvitelről (1. ábra) [8, 9].

A polarizált sejt vezető élén, a lamellipódiumban az elágazó aktin szálak polimerizációja felelős a membrán kitüremkedésekért. A vezető él disztális részén, a lamella régióban viszont az aktin szálak kötegekké állnak össze (stressz filamentumok), amelyeket az NMIIA minifilamentumok keresztkötnék és motorként az ún. retrográd aktin áramlást váltják ki. A két ellentétes erő eredője szabja meg, hogy a sejt elmozdul vagy helyben marad. A szubsztrátra történő erőátvitelt a citoskeleton, a sejtadhéziós molekulák és az extracelluláris mátrix közötti dinamikus kapcsolat (fokális adhézió) biztosítja, amelynek szabályozását gyakran egy kuplung működéséhez hasonlítják. Ha az NMIIA aktív, a kuplung ki van nyomva, az erős adhézió következtében a sejt áll; ha a miozint gátoljuk (akár az ATP-áz aktivitását a kismolekula inhibitor blebisztatinnal, akár a filamentumok kialakulását S100A4-gyel), a kuplungot felengedtük, a sejt előremozdulhat. A retrográd áramlás mértékének, az adhéziós komplexek kialakulásának és szétesésének molekuláris szintű mechanikai szabályozását még nem ismerjük, bár azt tudjuk, hogy az aktomiozin kontrakció a naszcens adhéziók fokális komplexszééréséhez nélkülözhetetlen.

Az S100A4 kötőhely az NMIIA nehézlánc C-terminusa közelében található, ám a kölcsönhatás részletei ez ideig ismeretlenek voltak, sőt az ezzel foglalkozó irodalomban ellentmondásos eredmények születtek a kölcsönhatás sztöchiometriájáról és erősségéről is. Munkánk fő célja volt, hogy fényt derítsünk az S100A4 – NMIIA interakció szerkezeti részleteire, s feltárjuk az S100A4 sejt migrációra gyakorolt hatásának molekuláris hátterét, legalábbis annak első lépését.

Eredmények és megvitatásuk Az S100A4 kötőhely revíziója

Az S100A4 kötőhelyét korábban az NMII nehézlánc *coiled-coil* szerkezetű „rúd” régiójának C-terminusa közelében, az ún. *assembly competence* domén (ACD) szomszédságában azonosították. Az ACD egy „ragadós” *coiled-coil* régió, amely sóhidakon keresztül a miozin molekulák asszociációjáért, azaz a filamentumok kialakulásáért felelős, mint azt legelőször vázizom miozin nehézláncok limitált proteolízisével, sok évvel ezelőtt bizonyítottuk [10]. Az első kísérleteink során az irodalomból ismert 16 tagú ún. minimális kötőpeptid affinitását határoztuk meg izotermális titráló kalorimetria (ITC) segítségével. Megmutattuk, párhuzamosan egy másik kutatócsoporttal [11], hogy a rövid peptid korábban publikált μM -os affinitásához nagyban hozzájárult a hozzá kapcsolt fluoreszcen csoport. A peptidet C-terminális irányba kiterjesztve már valóban μM -os affinitású ligandumot kaptunk, ám az NMIIA egy hosszabb, *coiled-coil* fragmentuma jóval erősebb affinitást jósolt. Az eredeti peptidet az N-terminális irányba is kiterjesztve, végül a teljes lineáris kötőrégió egyik 45 aminosav hosszúságú NMIIA fragmentum bizonyult (2A ábra).

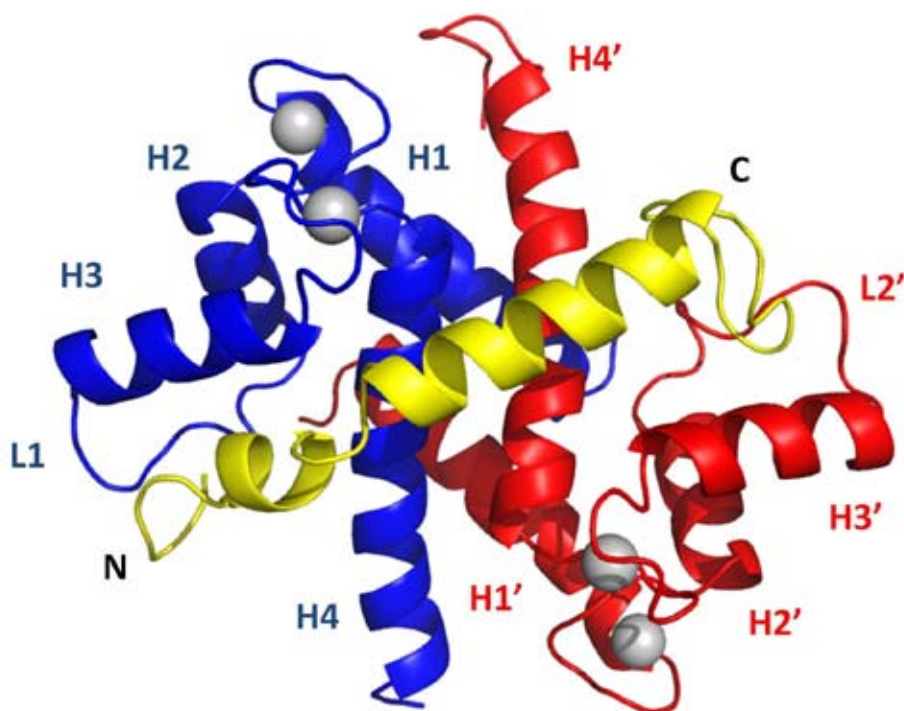


2. ábra. A kísérletekhez használt dimer és monomer NMII fragmentumok sematikusabban ábrázolva. (A) Az NMIIA nehézlánc 250 aminosav hosszú C-terminális darabja tartalmazza a filamentum képződésben fontos szerepet játszó negatív (piros) és zömmel pozitív (kék) töltést hordozó régiókat, utóbbi az ún. ACD. Az S100A4 kötőhelyen belül a coiled-coil régiót aláhúzással jelöltük, a hidrofób varratot kialakító aminosavak narancsszínűek. Az irodalom alapján korábban „minimális kötőhely”-nek tekintett régiót kettős aláhúzással emeltük ki. (B-D) Az NMIIA, B és C izoformák S100A4-gyel történő kölcsönhatását ITC-vel vizsgáltuk 25°C-on. Az NMIIA és C (B,D) izoforma affinitása nM-os, míg az NMIIIB (C) esetében a $K_d=125$ nM.

Ennek a peptidnek az affinitása az S100 családban eddig példátlanul erős, nanomólos tartományban található (ez az ITC mérések érzékenységi határa), míg a kötés sztöchiometriája is rendhagyó, miszerint a homodimer S100A4 csupán egyetlen miozin nehézláncot köt (2B ábra). A kötés kinetikáját *stopped-flow* módszerrel tanulmányozva a K_d értékét az asszociációs és disszociációs sebességi állandókból is meghatároztuk, ami még erősebbnek, 0,1 nM-nak adódott. Megvizsgáltuk az S100A4 kötőhellyel homológ szekvenciák affinitását az NMIIIB és NMIIIC izoformáknál is. Azt tapasztaltuk, hogy az NMIIIB affinitása 3 nagyságrenddel gyengébb (2C ábra), mint az NMIIA kötése, viszont az NMIIIC izoforma szintén nM-os affinitást mutat az S100A4-hez (2D ábra) [12]. Az utóbbi eredmény meglepő, de jó lehetőséget kínál a nemrégiben felfedezett NMIIIC izoforma funkciójának pontosabb megértéséhez.

Az első, atomi felbontású S100A4-célfehérje komplex szerkezete

Az általunk minimális kötőmotívumnak meghatározott NMIIA fragmentumot különböző S100A4 variánsokkal próbáltunk kristályosítani. Egy olyan S100A4 mutánsal értünk végül célba, amelyben három reaktív, felszíni Cys oldalláncot Ser-re cseréltünk. Katona Gergely csoportjával (Göteborgi Egyetem) együttműködve a röntgendiffrakciós adatokból molekuláris helyettesítés segítségével (a Ca^{2+} -kötött S100A4 szerkezetből kiindulva; pdb: 3C1V) sikerült a komplex 1,94 Å felbontású szerkezetét meghatároznunk (pdb: 3ZWH) (3. ábra) [12].



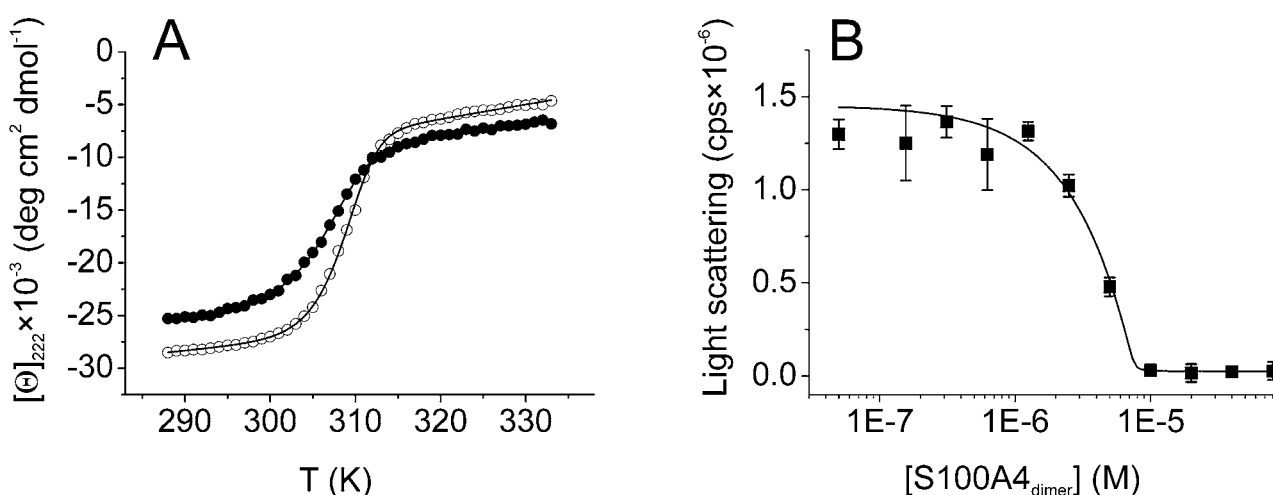
3. ábra. Az S100A4-NMIIA peptid komplexének térszerkezete (pdb: 3ZWH). Szürke szín jelzi a két-két EF-kéz motívumhoz kötődő Ca^{2+} -ot. A homodimer két azonos alegysége kék és piros, az NMIIA peptid sárga. Jelöltük a peptid terminálisait, valamint az S100A4 fő másodlagos szerkezeti elemeit.

A szerkezeti modell az S100 szupercsaládban egy teljesen új típusú kölcsönhatást tár elénk. A zömében α -helikális szerkezetű, 45 aminosav hosszúságú NMIIA nehézlánc peptid körülöleli a homodimer S100A4-et, kitöltvén a két alegységben Ca^{2+} -kötés hatására megjelenő két azonos kötőzsebet. A szerkezet érdekessége, hogy az eredetileg teljesen szimmetrikus homodimer egy-egy alegysége a kötőpartner ellentétes felével hat kölcsön, aminek következtében aszimmetria ébred az S100A4-ben. Ez egyfelől tetten érhető a két kötőrégió kissé különböző konformációjában, a két kölcsönhatás természetében (a peptid N-terminális fele sok poláros interakciót alakít ki, a C-terminális fele viszont alapvetően apoláros S100A4 oldalláncokkal lép kölcsönhatásba), és a krisztallográfiai B-faktorokban is (amelyek az adott fehérjerégió mobilitásáról nyújtanak információt). A globuláris homodimer fehérjék világában meglehetősen ritka az ilyen aszimmetrikus fehérje-fehérje kölcsönhatás. Ilyen szerkezetű a cAMP-dependens protein-kináz komplexe az AKAP fehérjével [13], de ebben a példában kisebb a ligandum kötés kiváltotta aszimmetria, mint a mi komplexünkben. A munkákkal párhuzamosan Elliott és munkatársai meghatározták vad-típusú S100A4 és az NMIIA kötőpeptid komplexének oldatbeli szerkezetét többdimenziós NMR spektroszkópiával, mely jó egyezést mutat a mi szerkezetünkkel [14].

S100A4 kölcsönhatása dimer NMIIA fragmentumokkal

Hogyan magyarázhatjuk az S100A4 kötés drasztikus hatását a miozin minifilamentumokra? CD spektroszkópiával és fényszórásos kísérletekkel vizsgáltuk ionerő függő módon filamentumot képző dimer NMIIA fragmentumok

S100A4-gyel történő kölcsönhatását. Magas ionerő mellett a miozin dimerek nem asszociálnak, így a fehérje másodlagos szerkezete jól vizsgálható. Kimutattuk, hogy a *coiled-coil* fragmentumok hélixtartalma jelentős mértékben csökken S100A4 kötés hatására, míg hődenaturációs kísérletekben a *coiled-coil* letekeredés kooperatív mivolta csökken (4A. ábra), azaz az S100A4-hez kötődés gyengíti, destabilizálja a *coiled-coil* szerkezet egy részét (számításaink szerint ez 12-15 aminosavat érint).



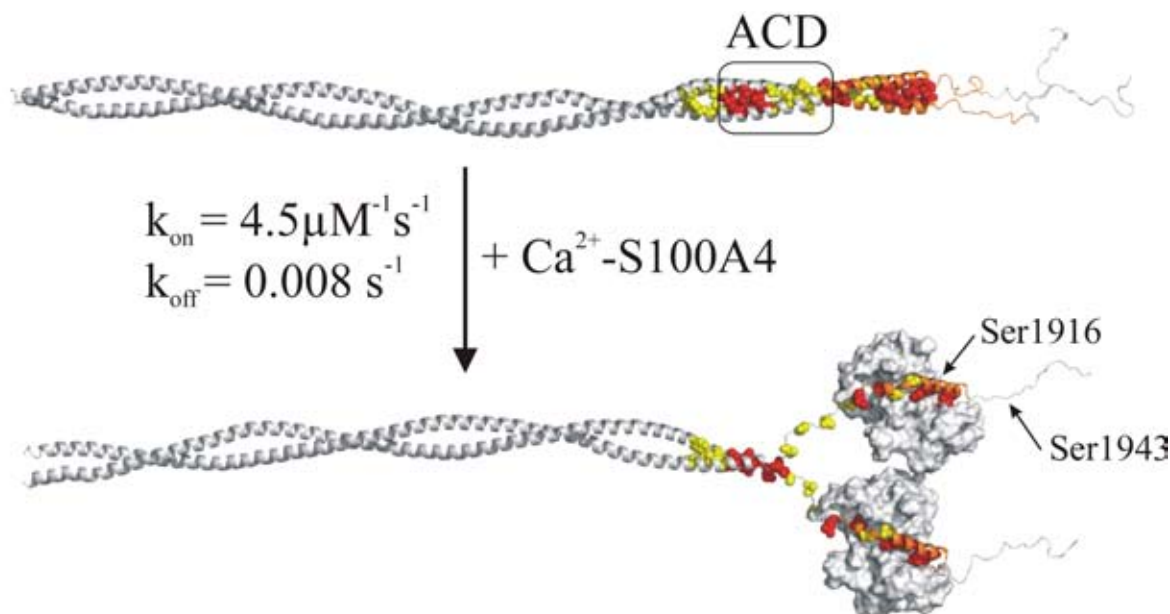
4. ábra. Az S100A4 interakciója az MF1 dimer fragmentummal. (A) A *coiled-coil* NMIIA fragmentum hődenaturációja CD spektroszkópiával követve. S100A4 nélkül az NMIIA dimer kooperatív letekeredést mutat (fehér). Telítési S100A4 koncentráció mellett (fekete) csökken a *coiled-coil* hélixtartalma, az „olvadási hőmérséklet és a letekeredés kooperativitása. (B) Az oldat fény szórását követve vizsgáltuk az S100A4 MF1 (10 μ M) „filamentumokra” gyakorolt hatását. Egyszerű kötődési mechanizmust feltételezve a látszólagos $K_d \sim 10$ nM.

Fiziológias ionerőn viszont végbemehet a filamentumok kialakulása, mely folyamatot jól lehet követni a miozin oldat fény szórását vizsgálva. A filamentumot képző MF1 NMIIA rúd fragmentumot S100A4-gyel titrálva arra a következtetésre jutottunk, hogy egy S100A4 dimer/miozin lánc arány képes teljesen disszociálni a *coiled-coil* fragmentumokat, mely sztöchiometria megegyezik a monomer miozin peptiddel mérttel (sőt, a számolt látszólagos K_d a közvetlen kötési tesztekhez hasonlítható értéket adott) (4B. ábra). Az S100A4-gyel telített dimer NMIIA fragmentumot (~ 250 aminosav) a 45 aminosav hosszúságú kötőpeptiddel titrálva pedig elmondható, hogy a monomer fragmentum jó kompetitora a hosszú *coiled-coil* dimernek (nem közölt ábra) [12].

Az NMIIA filamentumok szétesésének molekuláris mechanizmusa

Az S100A4 – NMIIA interakció kinetikai paramétereit, mint fentebb már jeleztük, *stopped-flow* fluoreszcens spektroszkópiával is vizsgáltuk. Ehhez az S100A4 molekula kötőzsebében található fenilalanint (Phe45) Trp-ra cseréltük, a reakciót pedig a triptofán fluoreszcencia növekedésén keresztül detektáltuk. Az ITC mérések alapján tudjuk, hogy a nagy affinitásért az α -helikális N-terminális régió felelős, viszont a *random coil* C-terminális régió asszociációs sebességi állandója magasabb, azaz valószínűleg a miozin dimerhez való kötődés során

ennek a régiónak „primer” (dokkoló) szerepe lehet. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a kötőhely N-terminális régiója el van temetve a *coiled-coil*-ban, míg a C-terminális *random-coil* régió szabadon hozzáférhető. Összefoglalván, a mechanisztikus modellünk szerint az S100A4 először a *random-coil* „rúdvéghez” kötődik, majd maga köré tekeri az eredetileg *coiled-coil* szerkezetű α -helikális kötőrégiót, mely az ACD destabilizációjához vezet (5. ábra).



5. ábra. A kristályszerkezet, valamint a dimer MF1 fragmentummal végzett CD mérések alapján javasolt S100A4-NMIIA interakciós modell (homológia modell).

A *coiled-coil* heptád ismétlődés hidrofób varratot kialakító pozícióit (a és d) a *coiled-coil* stabilitásához való hozzájárulás szerint színeztük az S100A4 kötőrégióban: pirossal az erősebb, sárgával a gyengébb a-d párok láthatók. A narancssárga szín jelzi az S100A4 kötőrégiót jelzi. Az ábra a komplex kialakulásának kinetikai paramétereit (k_{on} és k_{off}) is ábrázolja.

Az S100A4 dimerek sztérikusan is gátolhatják a miozin rudak ionerő függő párhuzamos és antiparallel egymás mellé rendeződését, ami a filamentumok kialakulásának előfeltétele. Az NMIIA működését a nehézlánc Ser1916-os (protein-kináz C) és a Ser1943-as oldallánc (kazein-kináz 2) foszforilációja szabályozza. A Ser1916 foszforilációja nem befolyásolja az S100A4 kötését, mivel ez az oldallánc az oldat felé néz. Ezzel szemben az S1943 módosítása gátolja a kötést, ami meglepő, hiszen ez az oldallánc az S100A4 kötőmotívumon kívül található. Az érdekes szabályozás szerkezeti hátterének feltárása jelenleg folyik.

Az S100A4 mint terápiás célfehérje

Nem kerülte el a figyelmünket, hogy a komplex szerkezetének ismeretében racionálisan tervezhető olyan kismolekula, ami az S100A4- specifikus interakciós felszínét kihasználva szelektíven gátolhatja a túlermelődéséből fakadó patológias hatású fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Megjegyzendő, hogy ismert az S100A4-hez kötődő kismolekula (trifluoperazin), ami pl. a NMIIA-re gyakorolt hatását kivédi, de más EF-kéz molekulákhoz, így a kalmodulinhoz is kötődik, s az affinitása is mérsékelt [15]. Ezen kívül van rá esély, hogy a nagy affinitású kompetitív miozin peptiddel az S100A4 extracelluláris funkcióit, elsősorban

a sejtmigrációra és a sejtinvázióra gyakorolt hatását gátolni lehet, feltehetően az oligomer forma visszaszorításán keresztül [16]. Az ilyen jellegű *in vivo* sejt-kultúrás kísérleteket megkezdtük, míg a peptid inhibitor affinitásának további fokozását *in vitro* evolúciós kísérletekkel, Pál Gábor kutatócsoportjával együttműködésben kíséreljük meg a jövőben.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Annette Duellinek és Katona Gergelynek (University of Gothenburg)) a röntgendiffrakciós munkáért, Dr. Majer Zsuzsának (ELTE Kémiai Intézet), Kardos Józsefnek (ELTE Biokémiai Tanszék), Tölgyesi Ferencnek (SE Biofizikai Intézet) és Patthy Andrásnak (ELTE Biokémiai Tanszék) a CD és ITC méréseknél nyújtott segítségért, valamint a peptidszintézisért.

Irodalomjegyzék

- [1] Garrett, S.C., Varney, K.M., Weber, D.J., and Bresnick, A.R. (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*, **281**: 677-80
- [2] Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**: 637-68.
- [3] Ford, H.L., Silver, D.L., Kachar, B., Sellers, J.R., and Zain, S.B. (1997) Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry*, **36**: 16321-7.
- [4] Kriajevska, M.V., Cardenas, M.N., Grigorian, M.S., Ambartsumian, N.S., Georgiev, G.P., and Lukanidin, E.M. (2004) Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem*, **269**: 19679-82.
- [5] Li, Z.H., Spektor, A., Varlamova, O., and Bresnick, A.R. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA (2003) *Biochemistry*, **42**: 14258-66.
- [6] Malashkevich, V.N., Varney, K.M., Garrett, S.C., Wilder, P.T., Knight, D. Charpentier, T.H., Ramagopal, U.A., Almo, S.C., Weber, D.J., and Bresnick, A.R. (2008) Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*, **47**: 5111-26.
- [7] Li, Z.H. and Bresnick, A.R. (2006) The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res*, **66**: 5173-80.
- [8] Fournier, M.F., Sauser, R., Ambrosi, D., Meister, J.J., and Verkhovsky, A.B. (2010) Force transmission in migrating cells. *J Cell Biol*, **188**: 287-97.
- [9] Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**: 778-90.
- [10] Nyitray, L., Mócz, G. Szilágyi, L., Bálint, M., Lu, R.C., Wong, A., and Gergely, J. (1983) The proteolytic substructure of light meromyosin. Localization of a region responsible for the low ionic strength insolubility of myosin. *J Biol Chem*, **258**: 13213-20.
- [11] Badyal, S.K., Basran, J., Bhanji, N., Kim, J.H., Chavda, A.P., Jung, H.S., Craig, R., Elliott, P.R., Irvine, A.F., Barsukov, I.L., Kriajevska, M., and Bagshaw, C.R. (2011) Mechanism of the Ca(2+)-dependent interaction between S100A4 and tail fragments of nonmuscle myosin heavy chain IIA. *J Mol Biol*, **405**: 1004-26.

- [12] Kiss, B., Duelli, A., Radnai, L., Kékesi, K.A., Katona, G., and Nyitray, L. (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 6048-53.
- [13] Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Carr, D.W., Westphal, R., Scott, J.D., and Jennings, P.A. (2001) A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO J*, **20**: 1651-62.
- [14] Elliott, P.R., Irvine, A.F., Jung, H.S., Tozawa, K., Pastok, M.W., Picone, R., Badyal, S.K., Basran, J., Rudland, P.S., Barraclough, R., Lian, L.Y., Bagshaw, C.R., Kriaevska, M., and Barsukov, I.L. (2012) Asymmetric mode of Ca²⁺-S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling. *Structure*, **20**: 654-66.
- [15] Malashkevich, V.N., Dulyaninova, N.G., Ramagopal, U.A., Liriano, M.A., Varney, K.M., Knight, D., Brenowitz, M., Weber, D.J., Almo, S.C., and Bresnick, A.R. (2010) Phenothiazines inhibit S100A4 function by inducing protein oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 8605-10.
- [16] Ambartsumian, N., Klingelhofer, J., Grigorian, M., Christensen, C., Kriaevska, M., Tulchinsky, E., Georgiev, G., Berezin, V., Bock, E., Rygaard, J., Cao, R., Cao, Y., and Lukanidin, E. (2001) The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, **20**: 4685-95.



Nyitray László az ELTE TTK biológus szakán végzett 1981-ben. Azóta a 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. 1997-2004 között Széchenyi professzori ösztöndíjas volt. 2010-től az MTA doktora. Fő érdeklődési területe a motorfehérjék molekuláris és szerkezeti biológiája, fehérje-fehérje kölcsönhatások valamint coiled-coil és egyszálú fehérje szerkezeti elemek vizsgálata.



Kiss Bence 2007-ben kapott diplomát az ELTE biológus szakán molekuláris biológia szakirányon. PhD hallgatóként Nyitray László csoportjában, a Biokémiai Tanszéken helyezkedett el. Csoportjuk fő profilja különböző, motorfehérjéket szabályozó fehérjék vizsgálata biokémiai-biofizikai módszerekkel. Érdeklődési köre az S100A4 Ca²⁺-kötő fehérje protein-protein interakcióinak szerkezet-funkció vizsgálata, illetve a jövőben sikeresen alkalmazható terápiás S100A4 gátlószerek fejlesztése.

GYÓGYSZERPROFIL-ÖSSZELETÉS: A POLIFARMAKOLÓGIA LEHETŐSÉGEI

Simon Zoltán², Peragovics Ágnes¹, Málnási-Csizmadia András^{1,2}

¹ ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék; ²Drugmotif Kft.

Összefoglalás

A gyógyszerek és gyógyszerjelöltek teljes hatásprofiljának előrejelzése eddig nem volt lehetséges. A cikkben bemutatott Drug Profile Matching (Gyógyszerprofil-összevetés, DPM) módszer alapját az a hipotézis képezi, hogy komplex molekuláris tulajdonságkészletek, mint amilyen egy kötési mintázat, korrelációt mutatnak a hatásprofilok ismert elemeivel, és ezáltal prediktív erővel rendelkeznek a teljes profil előállítására felé. Módszerünk nem vizsgálja a kismolekulák kémiai hasonlóságát. Ehelyett olyan kölcsönhatási eredményekre épül, melyek kísérletesen nem, vagy csak nehézkesen mutathatók ki, mivel nem célfehérjéhez történő kölcsönhatásokat írnak le. A DPM gyors és szisztematikus eljárás, mellyel ismert gyógyszerek új indikációi és biztonsági kockázatai deríthetők fel, továbbá alkalmazható a gyógyszerjelöltek hatásprofiljának predikciójára, s ezáltal a vezérmolekula-tervezés és optimalizáció terén is hatékony eszköz lehet. Ezzel segítséget nyújt például új antipszichotikumok fejlesztésében: a módszer segítségével olyan újrapozicionálási lehetőségekre derülhet fény, melyek hagyományos keresési eljárásokkal nem kerülnének előtérbe – nem beszélve a kémiai új gyógyszerjelöltekről, melyek nem a már meglévő, ismert hatóanyagok származékai. Jelen közleményünk a „Dopaminerg antipszichotikumok kutatása és fejlesztése” című, a Moravcsik Alapítvány által kiadott egyetemi jegyzet „Gyógyszerprofil-összevetés: az *in silico* farmakológia lehetőségei” című fejezetének rövidített változata.

A gyógyszerek teljes bioaktivitás profiljának feltárása a gyógyszerkutatás egyik nagy kihívása. Jelen cikkben az *in silico* farmakológia egyik legújabb fejezetét, az affinitásprofilozási technikákat vesszük górcső alá, különös tekintettel egy hazai fejlesztésű módszerre, a Gyógyszerprofil-összevetésre (*Drug Profile Matching*, DPM) [1, 2]. Ezek az újabb megközelítések abból a felismerésből indulnak ki, hogy egy gyógyszer hatásprofilja szükségszerűen komplex tulajdonság, mely a gyógyszer és a szervezet különböző fehérjei kölcsönhatásainak összességéből ered, ahogy a polifarmakológiai teória állítja [3-5]. Az, hogy egy gyógyszer nem egy, hanem több célfehérjén hatva fejti ki aktivitását, sok esetben eszenciális a terápiás hatékonysághoz, pl. a pszichiátriai szerek körében [6]. A korábbi, egyetlen célfehérjére összpontosító megközelítések feltehetően ezért nem bizonyultak kellően hatékonyak a teljes hatásprofil feltárására [7]. Az újabb, szisztematikus predikciós eljárások [8-10], köztük a DPM módszer, ellenben növelhetik a gyógyszerfejlesztés hatékonyságát és biztonságát.

A kiindulási hipotézis a rendszerelmélet egyik alapvetése, miszerint ahhoz, hogy egy gyógyszer valamilyen tulajdonságkészletéből releváns információt nyerhessünk ki pl. a hatásprofilra vonatkozóan, a tulajdonságkészletnek a hatásprofilhoz

hasonló komplexitással kell rendelkeznie [7]. A mi esetünkben ez a tulajdonságkészlet egy interakciós adatokat tartalmazó adatbázis, amely a gyógyszerek kölcsönhatási mintázatát írja le egy referencia fehérjekészlettel szemben. Feltételezzük, hogy a polifarmakológiai megközelítés helytálló, és két gyógyszer hasonló kölcsönhatási mintázata hasonló hatásprofilal jár együtt. Ebben az esetben a tudományos kihívás a hatás-előrejelzéshez szükséges információ kinyerése a komplex tulajdonságkészletből.

Polifarmakológia

Az *Ehrlich* által kifejtett terápiás szemlélet, mely szerint a gyógyszerek általában egyetlen fehérje funkcióinak módosításával fejtik ki hatásukat [11], évtizedekre meghatározta a gyógyszeripar fejlődését. Ez a redukcionista megközelítés nagyban növelte a gyógyszerek engedélyeztetési teszteken történő elbukásának arányát. Napjainkban egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy az egy célfehérjét eltaláló „mágikus lövedék” koncepciója nem állja meg a helyét. Több bizonyíték utal rá, hogy számos gyógyszer egyszerre több fehérjét befolyásolva fejt ki terápiás hatását. A benzodiazepinek például nem csak a GABAerg ioncsatornákra, de mitokondriális receptorokra is hatnak [12], ahogy a metadon a GPCR-típusú μ -opioid receptorok mellett az NMDA receptoron is (ami egy ioncsatorna) [13]. A szerotonerg gyógyszereknél is hasonló promiszkuitást figyeltek meg [6, 14]. *Roth és mtsai* leírták, hogy az effajta viselkedés, a „szelektív nonszelektivitás” számos esetben nagyobb hatékonyságú, mint az egyfehérjés szerek terápiás hatása, főleg a központi idegrendszeri gyógyszerek esetében [6]. Az egyik legfrissebb sikertörténet, a rákellenes hatású *imatinib mesylate* is ideillő példa: eredetileg egycélpontos szerként fejlesztették, de kiderült, hogy két másik célpontra is hat, és épp ez szükséges a tapasztalt nagy hatékonysághoz [7]. A valproatról az utóbbi években írták le, hogy célpontjai között szerepel a GSK3 kináz, a HDAC1 hiszton-deacetiláz, a GABA transzamináz-prolil-oligopeptidáz [15] és a ciklooxigenáz [16]. Ennek megfelelően a valproat olyan különböző betegségek kezelésében játszik szerepet, mint az epilepszia, a bipoláris zavar, az Alzheimer-kór és bizonyos tumorok. Kiderült továbbá, hogy a szer adjuvánsként hatékony az AIDS-terápiában is [15].

A tény, hogy számos gyógyszer több célpontra fejt ki hatását, polifarmakológia néven ismert [3, 5]. A polifarmakológia a korábbi szemlélethez képest egyfajta holisztikus nézőpontot hozhat a gyógyszerfejlesztésbe: a jövő gyógyszereinek fehérjehálózatokra kell hatniuk, nem pedig egyes fehérjékre. Ahogy korábban említettük, a problémának és a megoldásnak hasonló komplexitásúnak kell lennie. Komplex betegségeket, mint amilyenek a mentális károsodások vagy az öregedéssel kapcsolatos betegségek, valószínűleg csak hasonlóan komplex gyógymóddal lehet kezelni. A polifarmakológiát már több esetben alkalmazták sikeresen: *Bolognesi* csoportja kifejlesztette a *memoquit*, egy *multitarget* típusú Alzheimer-gyógyszert [17, 18], míg *Apsel és mtsai* több kináz közös inhibitorait írták le [19]. Mindazonáltal a gyógyszeripar még ódzkodik a polifarmakológia bevonásától [7]. Az egyetlen terület, amelyre komoly hatással volt, az a gyógyszer-újrapozicionálás, tehát ismert gyógyszerek új, eddig le nem írt terápiás alkalmazási lehetőségeinek felkutatása. Ez a fajta kutatás különösen gyümölcsöző tud lenni, mivel – ismert hatóanyagról lévén szó – a fejlesztési idő és a költségek

jelentősen redukálhatók. Nincs szükség toxicitási vizsgálatokra, lényegében csak azt kell bizonyítani, hogy a szer új terápiás alkalmazása kellő hatékonyságú. (Ez történt például a fentebb említett valproattal.)

Ha a gyógyszerfejlesztésnek nem is lett szorosan vett része, az akadémiai kutatásokban több olyan polifarmakológián alapuló megoldás született, mely képes a gyógyszerek új terápiás hatásainak felkutatására. *Campillos* a gyógyszerek mellékhatás-adatait hozta összefüggésbe annak a valószínűségével, hogy a szerek közös célfehérjén osztoznak [8]. A mellékhatás-adatokat a gyógyszerek hivatalos címkéiről gyűjtötték össze, majd standardizálták a szinonimák kiszűrése érdekében. Ezután minden gyógyszerpárra mellékhatás-hasonlósági és kémiai hasonlósági pontszámokat határoztak meg, végül pedig ezt a két mérőszámot egy értékkel kombinálták. A gyógyszer-fehérje interakciók adatait három különböző adatbázisból gyűjtötték össze. A szerzők egyértelmű korrelációt mutattak ki a mellékhatások és a célfehérjék közötti átfedés között, míg a kémiai hasonlóság jóval kisebb korrelációt adott. A módszer használatával 754 új, eddig le nem írt gyógyszer-célfehérje párt azonosítottak, melyekből 20-at *in vitro* teszteltek. 13 kölcsönhatást sikerült validálni 10 μM -nál kisebb K_i értékkel. Ez az eredmény azért is figyelemreméltó, mert a mellékhatások adatai rendkívül zajosak, és az antagonisztikus jellegű mellékhatások együttes előfordulása maszkírozhatja a célfehérjék közötti átfedéseket. (A terápiás hatásokkal való korreláció kiküszöbölné ezeket a nehézségeket, és feltehetően jobb eredményeket adna.)

Keiser és mtsai egy kémiai hasonlóságon alapuló, szisztematikus predikciós eljárást fejlesztettek ki [10]. 65241 kismolekula és 246 fehérje kölcsönhatási adataiból és a kismolekulák kémiai hasonlóságából kiindulva bevezettek egy hasonlósági metrikát, a SEA-t (*Single Ensemble Approach*). Ennek alapján meghatározták azt, hogy az egyes receptorokhoz tartozó ligandumkészletek milyen mértékben hasonlítanak egymásra. Az adatok felhasználásával a receptorokat csoportokba soroló, biológiailag releváns fát sikerült szerkeszteni, ami azért jelentős, mert a receptorokra vonatkozó közvetlen biológiai információ nem volt a rendszerben. A módszer predikcióra is használható: egy molekulakészlet elemzése után megállapítható, hogy milyen mértékben van átfedésben a használt 246 referenciakészlettel, melyek mindegyike egy-egy célfehérjéhez rendelhető, így megjósolhatóak a várható célfehérjék, ezeken keresztül pedig a terápiás hatások. A szerzők ezzel a módszerrel 3832 predikciót állítottak elő az ismert gyógyszerek körében. 184-et választottak ki alaposabb tesztelésre, melyből 42-re találtak korábbi irodalmi adatot. 30 másik előrejelzést teszteltek, melyből 23-at sikerült kísérletesen igazolni, egyet *knock-out* egérben is. *Keiser* vizsgálatának fontosságát az adja, hogy kétdimenziós kémiai hasonlósági adatokat kapcsol össze a közös célfehérjék meglétével, tehát a ligandumok atomi szintű információit a kötési affinitásprofilokkal.

A polifarmakológián alapuló gyógyszerfejlesztés egyik speciális ágát akár „polifarmakofór” fejlesztésnek is nevezhetnénk. Ennek lényege, hogy két különböző farmakofórt kapcsolunk össze valamiféle linker régióval, vagy átfedő farmakofórokat hozunk létre [20].

A profil alapú gyógyszerfejlesztés másik különleges esete a gyógyszerkombinációk használata. Az amoxicillin és a klavulánsav esete az egyik legtipikusabb példa: az előbbi a sejtfaleszintézist gátolja, az utóbbi pedig a β -laktamázt, mely az amoxicillin biotranszformációjáért és eliminációjáért felel. Ezáltal a klavulanát gondoskodik az amoxicillin sejtfaleszintézis koncentrációjának szinten tartásáról. Megjegyezzük, hogy a mellékhatások várhatóan nagyobb száma miatt a gyógyszeripar jelenleg ódzkodik a kombinációk széles körű alkalmazásától, bár ez a veszély nem feltétlenül áll fenn. Egy szinergisztikus hatású kombináció például lehetővé tenné a komponensek kisebb egyedi dózisban történő használatát [21]. A kombinációk várható hatásainak előrejelzése azonban még inkább gyerekcipőben jár, mint az egyedi szereké.

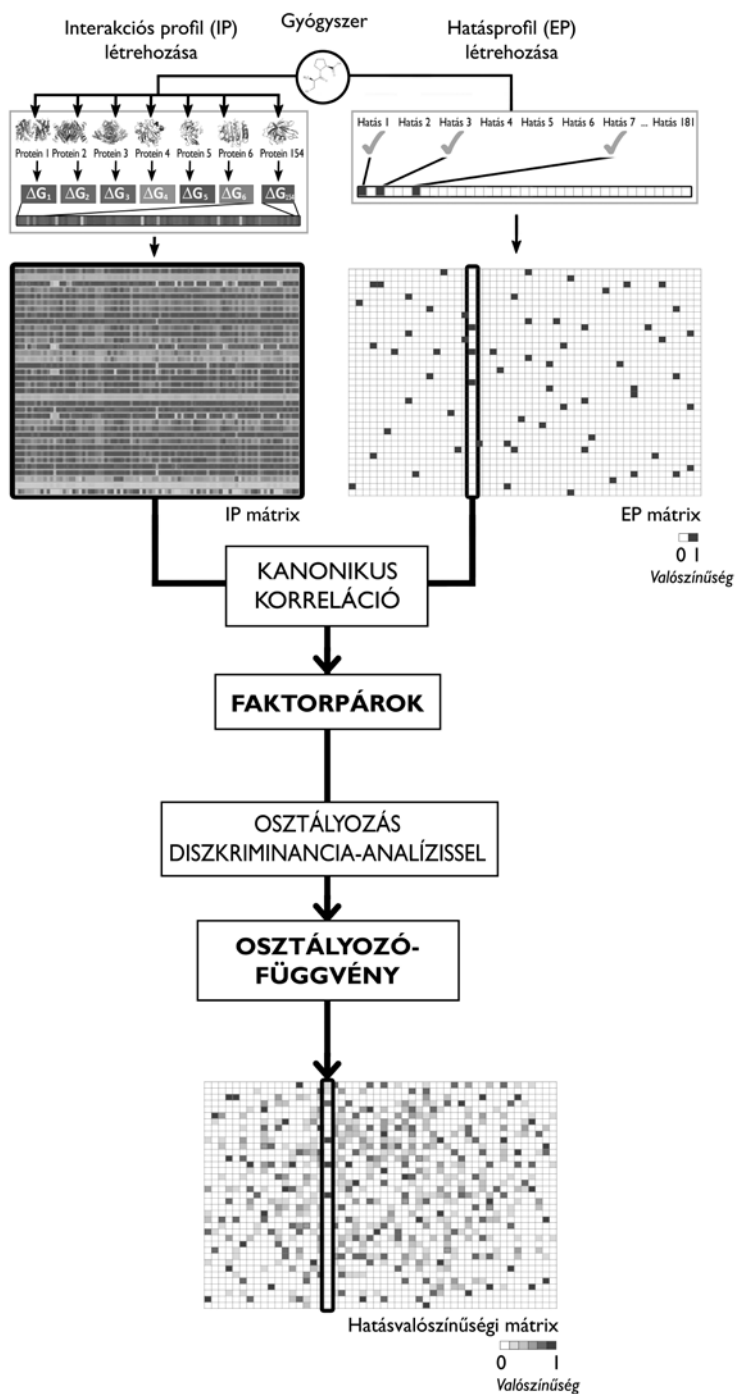
Gyógyszerprofil-összevetés (drug profile matching)

A farmakológiában az információk három szintje különböztethető meg:

- » atomi szintű információ: a ligandumok/fehérjék kémiai szerkezete és fizikokémiai tulajdonságai;
- » kötési affinitás: a ligandumok aktivitásértékei a különböző fehérjéken;
- » bioaktivitás: a farmakokinetikai és farmakodinamiai tulajdonságok, hatás és mellékhatás információk.

A gyógyszerek viselkedése több szinten értelmezhető. Ha egy gyógyszer bekerül a szervezetbe, erős és gyenge kölcsönhatásokat alakít ki a proteommal, ezáltal válogatva, diszkriminálva közöttük. Másfelől a proteom szintén válogat a szervezetbe került xenobiotikumok között. Ennek a kétoldalú interakciónak a következménye a kötési mintázat, a kötési profil, amely a szervezet szintjén a bioaktivitási profilban nyilvánul meg: a hatásokban és a mellékhatásokban. Ebből a nézőpontból nincs különbség hatás és mellékhatás között: a kívánt bioaktivitást nevezük hatásnak, a nem kívánatosat pedig mellékhatásnak. Ezek a kategóriák átjárhatóak, az újrapozicionálás során megeshet, hogy egy mellékhatásból hatás lesz.

A Gyógyszerprofil-összevetés két egyetem (Eötvös Loránd Tudományegyetem és Semmelweis Egyetem), valamint egy magyar vállalkozás (Drugmotif Kft.) által kifejlesztett szisztematikus *in silico* hatáspredikciós eljárás, mellyel létező gyógyszermolekulák és új gyógyszerjelöltek teljes hatásprofilját állíthatjuk elő. A korábban ismertetett Campillos-féle módszer a három szint közül az első kettőt kapcsolta össze. *Fliri* csoportja az 1. és a 3. szint közötti kapcsolatot mutatta be, ám eljárása nehezen ágyazható be a gyógyszerfejlesztési folyamatba. Ugyanakkor az a felismerésük, hogy hasonló kötési mintázatok hasonló bioaktivitásra utalnak [22, 23], adaptálható az *in silico* kötési profilokra is. Ebből következően a DPM eljárás a kismolekulás gyógyszerek atomi szintű információit hozza összefüggésbe a gyógyszerek hatásprofiljaival, a Hetényi-féle MIF megközelítésre alapozva [24]. Az alkalmazott metodika különbségei miatt a DPM kapcsán a kötési mintázatokra a MIF kifejezés helyett az Interakciós Profil (IP) megjelölést használjuk, a gyógyszerek hatásprofiljaira pedig a továbbiakban Effektprofil (EP) néven hivatkozunk. Az IP tehát egy sor *in silico* előállított kötési affinitásérték, melyet egy gyógyszernek egy fehérjékészlet tagjaival való kölcsönhatásából számítunk. Ez a profil a kismolekula interakciós tulajdonságait jellemzi. Az



1. ábra. A DPM módszer: az atomi szerkezetektől a hatásvalószínűségi mátrixig. Egy gyógyszermolekulát dokkolunk a 154 fehérjéből álló készlet minden tagjához. A számolt legalacsonyabb kötési energiaértékek sorvektorokban, Interakciós Profilokban (IP) vannak tárolva, melyek összessége alkotja az IP mátrixot. Az ábra kódolt formában mutatja az energiaértékeket: sötét árnyalat jelöli az erősebb, világos a gyengébb kölcsönhatást. A hatásadatokat az EP mátrix tárolja: teli cella jelzi az adott hatás meglétét, üres cella a hiányát. Ezután kanonikus korreláció történik azon erősen korreláló faktorpárok előállítására érdekében, melyek a lineáris diszkriminancia-analízis bemenetét képezik. Ezáltal minden hatáshoz egy-egy osztályozófüggvényt állítunk elő, mely megadja, hogy az egyes szerek milyen valószínűséggel váltják ki az adott hatást. A 181 osztályozófüggvény segítségével állítható elő a hatásvalószínűségi mátrix, amely már folytonos értékeket tartalmaz.

EP egy molekula bioaktivitási tulajdonságainak interpretációja, esetünkben egy bináris ujjlenyomat: 181 db igen–nem állású változó a vizsgált 181 hatásra. A Gyógyszerprofil-összevetés lényege az IP–EP kapcsolat megtalálása és leírása.

A DPM megközelítés előnyei:

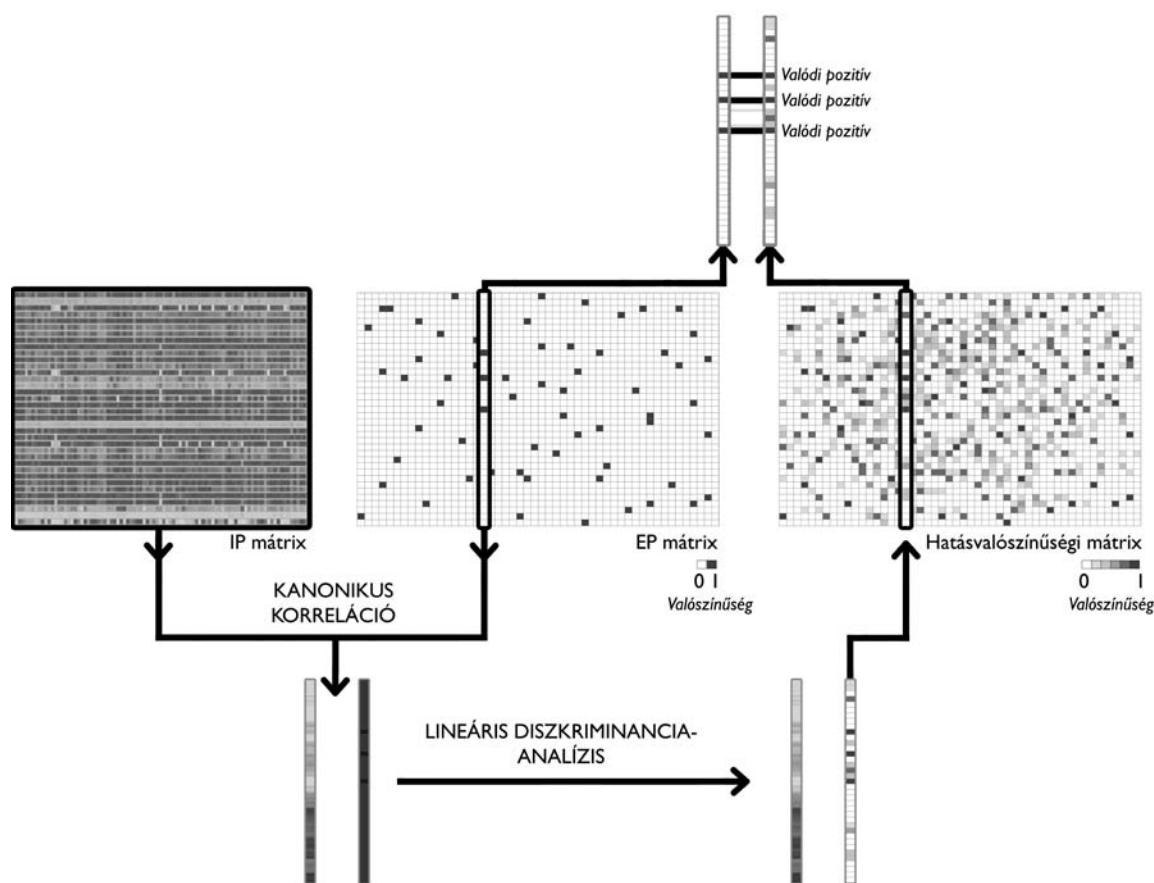
- » a kötési mintázat gyorsan és olcsón előállítható a kismolekulák szerkezeti adatainak ismeretében, egyéb információ nem szükséges hozzá;
- » az interakciók azonos kezelése elérhető az azonos dokkolási paraméterek beállításával. A dokkolásra kijelölt térrész az adott fehérjére jellemző és megegyezik minden kismolekula számára, így uniform diszkriminátor-felszín állítható elő. Célfehérje ismeretére nincs szükség az előrejelzésekhez [9, 23];
- » mivel a kölcsönhatási mintázat a bioaktivitási mintázatra utal, tetszőleges (diverz) fehérjekészlet használható.

Az EP és IP adatok 1226 FDA által elfogadott kismolekulás gyógyszerhatóanyag szerkezeti és farmakológiai információin alapszanak. Az EP adatok kinyerése a Drugbank adatbázisból [25] történt. Az adatok manuális tisztításon és szűrésen estek át pl. a szinonimák eltávolítása érdekében. A következő lépésben a DrugBank eredeti hatáslistáit kiegészítettük néhány hiányzó tulajdonsággal. Az EP-k tárolása sorvektorokban történik, melyek bináris formában rögzítik, hogy az adott szer kiváltja-e a 181 összegyűjtött hatás valamelyikét (1. ábra).

Az IP-k előállítása egy 154 darabos fehérjekészlet segítségével történt, melyeket a Protein Data Bank adatbázisból vontunk ki [26]. A kiválasztás alapját a dokkolási számításokra való alkalmasság képezte, farmakológiai megfontolások nem játszottak közre, ahogy az egy korábbi publikációban szerepelt, melynek a fehérjekészlet diverzitásvizsgálata volt a tárgya [27]. Az 1226*154 gyógyszer-fehérje komplex szerkezetének előállítása az elterjedt AutoDock4 szoftverrel történt [28, 29]. A kötési szabadentalpia-értékek meghatározását X-SCORE és AutoDock4 pontozófüggvényekkel végeztük [28, 30, 31]. A legalacsonyabb kötési energiaértékeket IP vektorokká alakítottuk. Az IP és EP vektorok által alkotott mátrixok képezik a predikciós rendszer bemeneti adatait (1. ábra).

A DPM módszer sarokpontját az IP–EP kapcsolat feltárása jelenti. A komplex mintázatok megfeleltetésének első lépésében kanonikus korrelációt végeztünk a mátrixok között, és azonosítottuk azokat a faktorpárokat, melyek maximális korrelációt teremtenek a két adatkészlet között. Ezen IP és EP faktorpárok alkalmazásával, lineáris diszkriminancia-analízissel kiszámítható annak valószínűsége, hogy melyik gyógyszer milyen valószínűséggel fejti ki az egyes hatásokat (lásd a 2. ábrán).

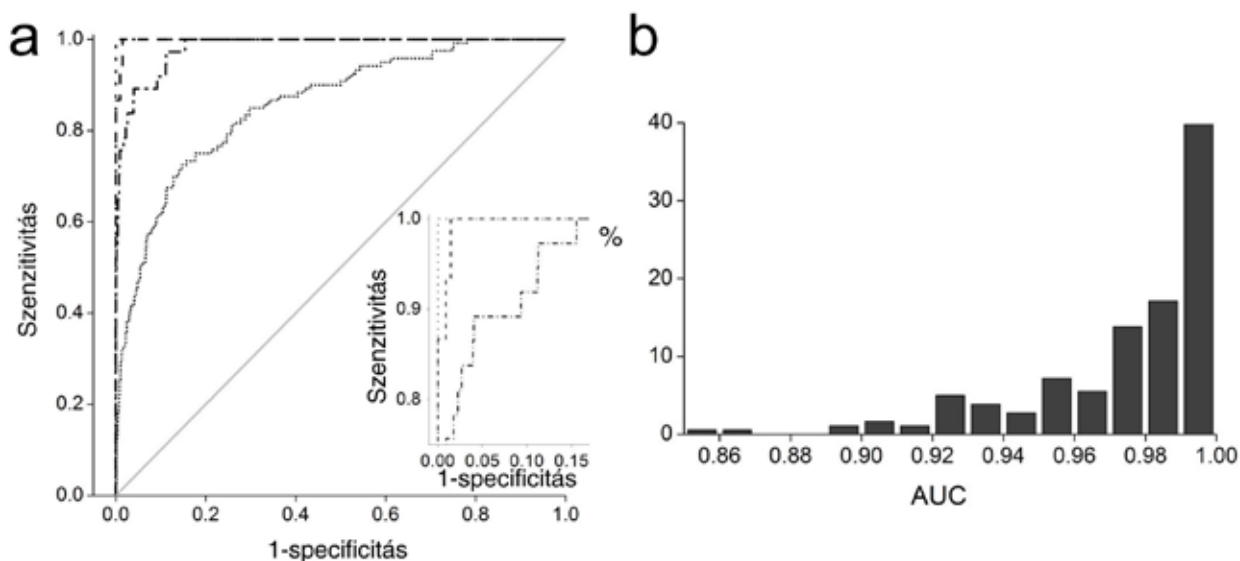
A kapott hatásvalószínűségi értékek jelentőségének vizsgálata ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analízissel történt, mely az osztályozás pontosságát vizsgálja a specificitás és a szelektivitás függvényében (3. ábra). Az ROC görbék segítségével ezen két paraméterre hangolható az osztályozás. Az osztályozási



2. ábra. A hatáspredikció menete. Az első lépésben kanonikus korrelációt végzünk az IP mátrixon és egy kiválasztott hatáskategórián. Ennek eredménye egy vektorpár, melynek tagjai az eredeti mátrix, illetve a hatásvektor lineáris kombinációjával jöttek létre és maximális korrelációt mutatnak egymással. Ezután lineáris diszkriminancia-analízist végzünk, mellyel előállítható az az osztályozófüggvény, ami megadja, hogy milyen valószínűséggel váltja ki az adott gyógyszer a vizsgált hatást. Ezt az eljárást megismételjük mind a 181 hatásra és előállítjuk a hatásvalószínűségi mátrixot. Az eredeti és a számolt hatásvektor összehasonlítása megadja a valódi pozitív találatokat (fent jobbra; egyezések, feketével kiemelve) és a „hamis” pozitívokat, melyek predikciókként kezelhetők (eltérések, nincs kiemelés).

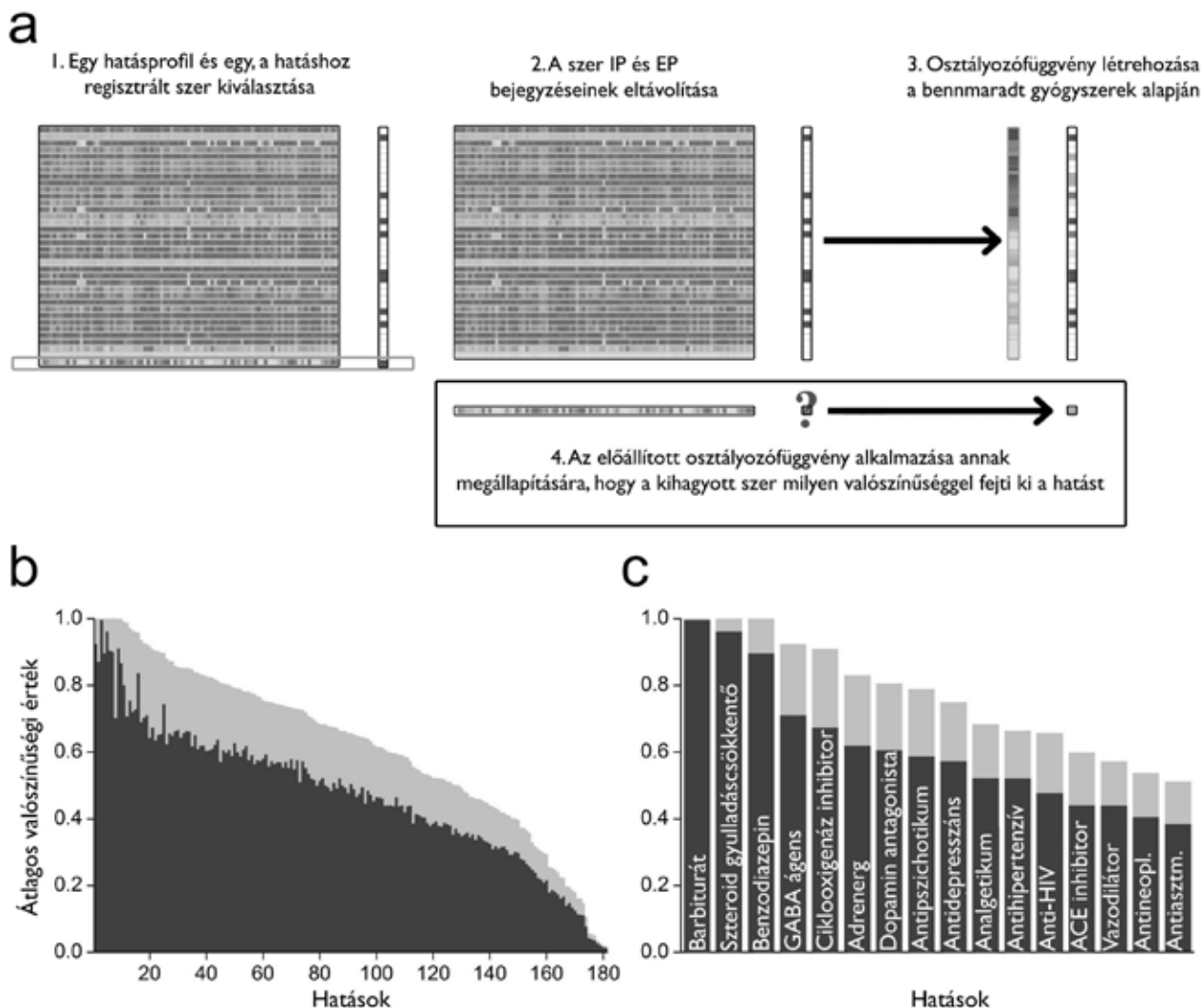
pontosság az AUC, a görbe alatti terület nagyságával jellemezhető (*Area Under the Curve*). Az 1-hez közeli AUC érték (tehát egy gyorsan emelkedő ROC görbe) nagy pontosságot jelent, míg a véletlenszerű osztályozás AUC-je 0,5 – ekkor az ROC görbe a négyzet átlójában halad (3/A ábra).

Ez praktikusán azt jelenti, hogy minden valódi pozitív találatra egy negatív találat esik, tehát információtartalma egyenértékű az érmefeldobással. Az 1-hez közelítő terület ugyanakkor azt jelzi, hogy a pozitív találatok nagy részét meg lehet találni úgy, hogy csak nagyon kevés eredetileg negatívnak bejegyzett elem kerül pozitív besorolásba. A 3/B ábra az AUC értékek eloszlását mutatja a teljes adatbázisra. A vizsgált hatások 82%-ában az AUC meghaladta a 0,95-ös értéket, ami kiváló osztályozási pontosságra utal, és felülmúlja az irodalomban közölt hasonló eljárásokat.



3. ábra. Reprezentatív ROC görbék és az AUC értékek eloszlása. Az **A)** panelen az osztályozás pontosságát jellemző ROC görbék láthatók néhány kiválasztott hatásra: „Tetracycline” (pontozott vonal; itt kaptuk a legjobb osztályozást), „ACE inhibitor” (szaggatott vonal), „COX inhibitor” (pont-vonal) és „Antineoplastic agent” (rövid pontozott vonal; a legkevésbé hatékony osztályozás). Az átlós szürke vonal a véletlenszerű osztályozás elméleti görbéje. A **B)** panel az AUC hisztogramot ábrázolja, tehát az AUC értékek eloszlását a 181 vizsgált hatáscsoportra. Az eredmények a legtöbb esetben majdnem tökéletes osztályozást mutatnak.

Az osztályozási pontosság további vizsgálata érdekében keresztvalidációt végeztünk a közismert *leave-one-out* eljárás segítségével. Ennek lényege annak a kérdésnek az eldöntése, hogy előállítható-e egy gyógyszer hatásprofilja úgy, hogy a predikcióhoz csak a vizsgált hatáshoz bejegyzett többi szeret használjuk, és a kérdéses molekulának csak az IP adatait vesszük figyelembe, tehát az EP bejegyzéseit kihagyjuk a tanításból (4/A ábra). Ezáltal minden hatáshoz meghatározható egy úgynevezett átlagos valószínűségi érték, egy mérőszám, mely megadja, hogy az adott hatáshoz bejegyzett szerek milyen valószínűséggel jósolhatók vissza a hatáshoz bejegyzett többi szer adatai alapján. Nagy átlagos valószínűségi érték az adott hatás előrejelzésének robusztusságára utal, tehát az információvesztéssel szembeni ellenálló képességére. Ilyen információvesztést szimulálunk azzal, hogy egy-egy molekulát kihagyunk a vizsgálatból. A gyógyszerekről való hiányos ismereteink ugyanilyen információvesztést jelentenek, ezért fontos ennek a validációnak az eredménye (4/B–C ábrák). A 4/B–C ábrák az átlagos valószínűségi értékeket mutatják a 181 vizsgált hatásra (4/B) és néhány kiemelt elemre (4/C). A vizsgált hatások többsége – 51,9 %-a – 0,5 fölötti átlagos valószínűségi értéket kapott. Ez átlagosan 25,1-szeres növekedés egy véletlenszerű osztályozáshoz képest (ami a 181 hatásféle előzetes előfordulási gyakoriságából számolható ki). Megfigyelhető, hogy bizonyos hatáscsoportokban a regisztrált szerek egy része alacsony valószínűséget kapott, ami arra utal, hogy ezeken belül további alcsoportok különíthetők el. A 4/B–C ábrákon ezért minden hatásra megadjuk a hozzá regisztrált gyógyszerek felső 75 %-ához tartozó átlagos valószínűségi értéket is. Erre az alkészletre a hatások 71 %-ának volt 0,5-et meghaladó átlagos valószínűségi értéke.



4. ábra. A leave-one-out validáció menete. A) Első lépésben eltávolítjuk egy molekula IP-jét és a vizsgált hatáshoz tartozó EP-bejegyzését. Ezután előállítjuk az osztályozófüggvényeket a korábban bemutatott módon, a csökkentett adatkészlet felhasználásával. Végül ezt az osztályozófüggvényt használjuk a kihagyott molekula EP-bejegyzésének jóslására. Ezt megismételjük az adott hatáshoz bejegyzett minden szerre, és kiszámoljuk az átlagos valószínűségi (tehát visszajóslási) értéket. **B)** rész az átlagos valószínűségi értékek eloszlását mutatja az adott hatáshoz tartozó teljes gyógyszerkészletre (fekete) és a felső 75 %-ra (szürke). Az átlagos valószínűségi érték a teljes készletre 0,47, míg egy randomizált EP-n alapuló osztályozás 0,026-ot adna. **C)** panel néhány kiemelt hatáscsoport validációs eredményeit tartalmazza.

Az átlagos valószínűségi értékek vizsgálatával megállapítható, hogy a legmagasabb értékeket olyan hatáscsoportok kapták, melyek esetében a regisztrált szerek nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak, pl. a barbiturátok (0,995), a benzodiazepinek (0,895) és a szteroid gyulladáscsökkentők (0,961). Magas értéket kaptak ugyanakkor azok a hatások is, melyek egy-egy közös célfehérjén alapszanak, mint amilyen a ciklooxygenáz-inhibitoroké (0,673) vagy a dopamin antagonistáké (0,605). Ez annak ellenére történt, hogy az ide sorolt szerek kémiai hasonlósága nem számottevő. Végezetül, az általános hatáscsoportok, melyek több különböző mechanizmusú szert fognak össze, mérsékelt eredmé-

nyeket adtak, pl. antipszichotikumok (0,587), antidepresszánsok (0,573) és antihipertenzív szerek (0,520).

Bár a korábbi irodalmi eredmények valószínűtlenné teszik, mégis elképzelhető lehet, hogy az osztályozási függvényeket az egyes hatásokhoz tartozó célfehérjék jelenléte eltorzította, és a valóságban nem a kölcsönhatási profilból, hanem csak egy tagjának kölcsönhatási eredményeiből születik a pontos osztályozás. Esetünkben összesen két célfehérje szerepelt, és az osztályozófüggvényekben egyikük sem játszott nagyobb szerepet, mint a többi fehérje. A kétféle pontozófüggvénynek szintén nem volt jelentős hatása az eredményekre.

Összességében elmondható, hogy a DPM módszer pontos és robusztus eljárás a kismolekulák kölcsönhatási mintázatának és hatásprofiljának korreláltatására. Ennek következményeként érdemes a kapott osztályozófüggvényekkel előállított hatásvalószínűségi mátrix „hamis pozitív” elemeit, tehát azokat a gyógyszer-hatás párokat, melyek a kiindulási EP adatbázisban nem szerepeltek, további vizsgálatoknak alávetni. Ezek ugyanis rejtett, eddig le nem írt hatásokat jelezhetnek, tehát gyógyszer-újrapozicionálási lehetőségekre hívhatják fel a figyelmet.

Összefoglalás

A polifarmakológia újszerű megközelítés, mely a gyógyszerek hatásmechanizmusának általánosan megfigyelt komplexitására reflektál, azonban eddig nem történt meg széles körű alkalmazása a gyógyszerfejlesztésben. Ebből következően a gyógyszerek és gyógyszerjelöltek teljes hatásprofiljának predikciója nem volt lehetséges. A jelen fejezetben bemutatott DPM módszer alapját az a hipotézis képezi, hogy komplex molekuláris tulajdonságkészletek, amilyen egy kötési mintázat, korrelációt mutatnak a hatásprofilok ismert elemeivel, és ezáltal prediktív erővel rendelkeznek a teljes profil előállítására. A módszer nem vizsgálja a kismolekulák kémiai hasonlóságát, ezért az eddigiektől eltérő szemmel néz körül. Olyan kölcsönhatási eredményekre épül, melyek kísérletesen nem, vagy csak nehézkesen mutathatók ki, mivel nem célfehérjéhez történő, erős kölcsönhatásokat írnak le.

A DPM számos módon alkalmazható a gyógyszerfejlesztésben. Mindenekelőtt egy gyors és szisztematikus eljárás, mellyel ismert gyógyszerek új indikációi és biztonsági kockázatai deríthetők fel, továbbá alkalmazható a gyógyszerjelöltek hatásprofiljának predikciójára, s ezáltal a vezérmolekula-tervezés és optimalizáció terén is hatékony eszköz lehet. Ezzel hatékony segítséget nyújt új antipszichotikumok fejlesztésében is: a módszer segítségével olyan repozíciós lehetőségekre derülhet fény, melyek hagyományos keresési eljárásokkal nem kerülnének előtérbe – nem beszélve a kémiai új gyógyszerjelöltekről, melyek nem a már meglévő, ismert hatóanyagok származékai. A teljes hatásprofil predikciója információt ad a várható receptorkötési mintázatról, ami a korszerű antipszichotikumok tervezésekor kiemelkedő jelentőségű információ.

A DPM lehetőségeinek kiaknázására 2011 elején egy weboldal jött létre (www.drugpredict.com), ahol a felhasználók tallózhatnak az ismert gyógyszerek adatbázisában újrapozicionálási lehetőségek után kutatva, illetve vizsgálhatják

150.000 további gyógyszereszerű kismolekula prediktált tulajdonságait is. Az oldalon lehetőséget biztosítunk saját molekulák és nagyobb molekulakészletek feltöltésére, melyek DPM analízisét a rendszer automatikusan elvégzi és jelzi a szerek várható fiziológiás hatásait. A DrugPredict a DPM eljárás mellett két másik predikációs rendszernek is otthont ad, melyek együttes alkalmazásával nagyobb megbízhatóságú predikciók állíthatók elő.

Irodalomjegyzék

- [1] Simon, Z., Peragovics, A., Vigh-Smeller, M., Csukly, G., Tombor, L., Yang, Z., Zahoranszky-Kohalmi, G., Vegner, L., Jelinek, B., Hari, P., Hetenyi, C., Bitter, I., Czobor, P., Malnasi-Csizmadia, A. (2012) Drug effect prediction by polypharmacology-based interaction profiling. *J Chem Inf Model* **52**: 134-45.
- [2] Peragovics, A., Simon, Z., Brandhuber, I., Jelinek, B., Hari, P., Hetenyi, C., Czobor, P., Malnasi-Csizmadia, A. (2012) Contribution of 2D, 3D structural features of drug molecules in the prediction of Drug Profile Matching. *J Chem Inf Model*. (epub ahead of print)
- [3] Hopkins, A. L. (2007) Network pharmacology. *Nat Biotechnol* **25**: 1110-1.
- [4] Hopkins, A. L. (2008) Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* **4**: 682-90.
- [5] Hopkins, A. L., Mason, J. S., Overington, J. P. (2006) Can we rationally design promiscuous drugs? *Curr Opin Struct Biol* **16**: 127-36.
- [6] Roth, B. L., Sheffler, D. J., Kroeze, W. K. (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 353-9.
- [7] Pujol, A., Mosca, R., Farres, J., Aloy, P. (2010) Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **31**: 115-23.
- [8] Campillos, M., Kuhn, M., Gavin, A. C., Jensen, L. J., Bork, P. (2008) Drug target identification using side-effect similarity. *Science* **321**: 263-6.
- [9] Fliri, A. F., Loging, W. T., Thadeio, P. F., Volkmann, R. A. (2005) Biospectra analysis: model proteome characterizations for linking molecular structure and biological response. *J Med Chem* **48**: 6918-25.
- [10] Keiser, M. J., Roth, B. L., Armbruster, B. N., Ernsberger, P., Irwin, J. J., Shoichet, B. K. (2007) Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol* **25**: 197-206.
- [11] Ehrlich, P. (1911) The theory and practice of chemotherapy. *Folia Serologica* **7**: 697-714.
- [12] Krueger, K. E. (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepines. *Neuropsychopharmacology* **4**: 237-44.
- [13] Ebert, B., Andersen, S., Krosgaard-Larsen, P. (1995) Ketobemidone, methadone and pethidine are non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists in the rat cortex and spinal cord. *Neurosci Lett* **187**: 165-8.
- [14] Kroeze, W. K., Kristiansen, K., Roth, B. L. (2002) Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* **2**: 507-28.
- [15] Terbach, N., Williams, R. S. (2009) Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans* **37**: 1126-32.

- [16] Bosetti, F., Weerasinghe, G. R., Rosenberger, T. A., Rapoport, S. I. (2003) Valproic acid down-regulates the conversion of arachidonic acid to eicosanoids via cyclooxygenase-1 and -2 in rat brain. *J Neurochem* **85**: 690-6.
- [17] Bolognesi, M. L., Cavalli, A., Melchiorre, C. (2009) Memoquin: a multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **6**: 152-62.
- [18] Bolognesi, M. L., Rosini, M., Andrisano, V., Bartolini, M., Minarini, A., Tumiatti, V., Melchiorre, C. (2009) MTDL design strategy in the context of Alzheimer's disease: from lipocrine to memoquin and beyond. *Curr Pharm Des* **15**: 601-13.
- [19] Apsel, B., Blair, J. A., Gonzalez, B., Nazif, T. M., Feldman, M. E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R. L., Shokat, K. M., Knight, Z. A. (2008) Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat Chem Biol* **4**: 691-9.
- [20] Morphy, R., Rankovic, Z. (2005) Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* **48**: 6523-43.
- [21] Zimmermann, G. R., Lehar, J., Keith, C. T. (2007) Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today* **12**: 34-42.
- [22] Fliri, A. F., Loging, W. T., Thadeio, P. F., Volkmann, R. A. (2005) Analysis of drug-induced effect patterns to link structure and side effects of medicines. *Nat Chem Biol* **1**: 389-97.
- [23] Fliri, A. F., Loging, W. T., Thadeio, P. F., Volkmann, R. A. (2005) Biological spectra analysis: Linking biological activity profiles to molecular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 261-6.
- [24] Hetenyi, C., Maran, U., Karelson, M. (2003) A comprehensive docking study on the selectivity of binding of aromatic compounds to proteins. *J Chem Inf Comput Sci* **43**: 1576-83.
- [25] Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., Hassanali, M. (2008) DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* **36**: D901-6.
- [26] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**: 235-42.
- [27] Simon, Z., Vigh-Smeller, M., Peragovics, A., Csukly, G., Zahoranszky-Kohalmi, G., Rauscher, A. A., Jelinek, B., Hari, P., Bitter, I., Malnasi-Csizmadia, A., Czobor, P. (2010) Relating the shape of protein binding sites to binding affinity profiles: is there an association? *BMC Struct Biol* **10**: 32.
- [28] Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Goodsell, D. S. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* **28**: 1145-52.
- [29] Park, H., Lee, J., Lee, S. (2006) Critical assessment of the automated AutoDock as a new docking tool for virtual screening. *Proteins* **65**: 549-54.
- [30] Jiang, X., Kumar, K., Hu, X., Wallqvist, A., Reifman, J. (2008) DOVIS 2.0: an efficient and easy to use parallel virtual screening tool based on AutoDock 4.0. *Chem Cent J* **2**: 18.
- [31] Wang, R., Lai, L., Wang, S. (2002) Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des* **16**: 11-26.



Simon Zoltán 2005-ben kapott biológus diplomát az ELTE TTK-n. A doktori fokozatot 2012-ben nyerte el az ELTE Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia programjában. Legfontosabb doktori kutatási témája a mintázatalapú gyógyszerfejlesztési módszerek vizsgálata volt. Jelenleg a Drugmotif Kft. egyik alapítójaként a cég kutatás-fejlesztési munkájában veszek részt.



*Peragovics Ágnes 2009-ben végzett vegyész-mérnök-ként a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Karán. Jelenleg az ELTE Biológia Doktori Iskolájának végzős doktorandusz hallgatója vagyok. Érdeklődési területem az *in silico* gyógyszerkutatás és gyógyszerfejlesztés.*



Málnási-Csizmadia András biológusként végzett az ELTE-n 1999-ben. Jelenleg egyetemi docens az ELTE Biokémiai Tanszékén. Elsőként 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 témái: motorenzimekben kialakuló intramolekuláris erők hatása az enzimreakciókra, s az általa alapított és vezetett bioinformatikai csoporttal több önálló, gyógyszerfejlesztéssel kapcsolatos projekten is dolgozik. Egyetemi beosztása mellett alapítója a Drugmotif Kft.-nek.

MITOGÉN-AKTIVÁLT PROTEIN KINÁZ KÖTŐ LINEÁRIS MOTÍVUMOK AZONOSÍTÁSA SZERKEZETI ALAPON

Zeke András, Garai Ágnes, Reményi Attila
ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Összefoglaló

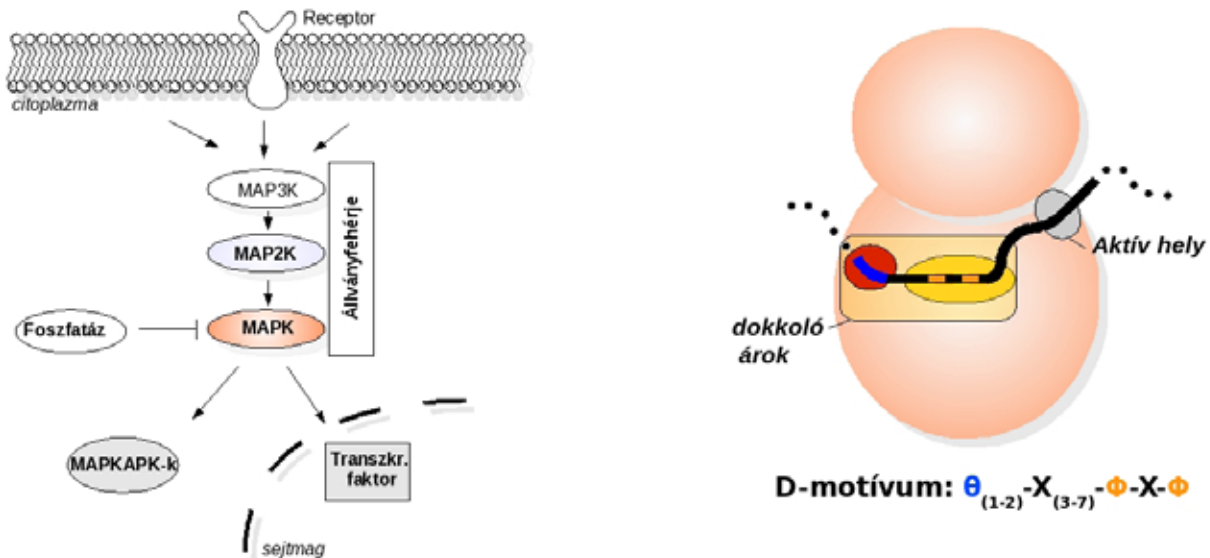
Az eukarióta mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalak a sejt környezeti ingerekre adott válaszainak talán az egyik legősibb és legszélesebb körben használt szabályozó rendszerei. Cikkünkben bemutatjuk, hogy MAPK-ok partner fehérjékkel alkotott komplexeinek atomi felbontású szerkezetei hogyan járulhatnak hozzá, hogy felderíthessük ennek az ősi jelátviteli rendszernek az organizmus szintű szerveződését, de akár az evolúcióját is.

Bevezetés

A reverzibilis fehérje foszforiláció mai ismereteink szerint a legfontosabb mechanizmus, amelynek segítségével a sejtek képesek a környezeti ingerek által adott jeleket közvetlen biológiai hatásra „átfordítani”. Az emberi genom több mint 450 különféle protein-kináz enzimet kódol. Számos alcsalád ezen belül nagymértékű szekvencia hasonlóságot és konzervált felépítést mutat: ilyenek az ún. mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK). A család a nevét az emlősökben elsőként felfedezett tagjának (ERK1) elsődleges funkciójáról kapta. Ezen fehérje nagy jelentőséggel bír a növekedési faktorok osztódást kiváltó hatásának közvetítésében. Ma már tudjuk, hogy a MAPK család egyes tagjai nemcsak az osztódás szabályozásában, hanem különféle abiotikus környezeti stresszhatásokhoz való alkalmazkodásban töltenek be fontos szerepet (pl. kiszáradás, hősokk, ozmotikus stressz, éhezés, fertőzés, stb) [1-2].

Emberben mintegy tucatnyi különféle MAPK fehérje található (pl. ERK, p38 és JNK kinázok). Mint a legtöbb Ser/Thr protein-kináz enzim, ezek is mindenekelőtt a fehérjék flexibilis, másodlagos szerkezet nélküli régióiban található szerin vagy treonin oldalláncait foszforilálják. A családba tartozó enzimekre általában jellemző, hogy szubsztrátjaikat nem a konvencionális módon, a katalitikus hely közelében lévő aminosav-oldalláncok segítségével ismerik fel. A katalitikus (aktív) helyük ugyanis túlságosan „megengedő”: minden olyan fehérjelánc foszforilálódhatna, amelyben a szerin vagy treonin oldalláncokat valamely kis aminosav (Gly, Ser, Ala, Thr, Pro, különösen a legutóbbi) követi. Ilyen szakaszok viszont túlságosan gyakoriak a fehérjékben. E helyett a MAP kinázok az oldalukon lévő járulékos, ún. dokkoló kötőárkot használják a legtöbb szubsztrát célzott felismerésére [3]. Tehát csak akkor lesz egy fehérje „jó” MAPK szubsztrát, ha rendelkezik egy olyan speciális aminosav összetételű kötő motívummal a fehérje bármely rendezetlen szakaszán, amelyben néhány pozitívan töltött aminosavat általában hidrofób aminosavak követnek egy adott mintázat szerint (D [dokkoló]-motívum).

Érdekes azonban, hogy D-motívumok nemcsak szubsztrát fehérjékben, hanem az őket aktiváló MAPK kinázokban (MAP2K), deaktiváló foszfatázokban, illetve állványfehérjékben is megtalálhatóak [3-4] (1. ábra).



1. ábra. MAP kinázok jelátviteli partnerei és a dokkoló kölcsönhatás szerkezeti alapjai. A MAPK jelátviteli modulok jellemző módon egy-egy háromszintű kináz kaszkádba rendeződnek. A MAPK-ok közvetlenül kölcsönható partnerei az őket aktiváló MAP2K-ok (pl. MKK6), deaktiváló foszfatázok (pl. HePTP), állványfehérjék (pl. JIP1), illetve szubsztrátok: MAPK aktivált protein kinázok, MAPKAP-k, (pl. RSK1, MNK1, és MK2) vagy transzkripció faktorok (pl. MEF2A és NFAT4). A jobboldali panel a MAPK dokkoló árok és az aktív hely elhelyezkedését mutatja sematikusán egy MAPK szubsztrát fehérjével kölcsönhatásban. A feketével jelölt polipeptidlánc katalitikus helyhez való hozzáférést a rajta található dokkoló motívum biztosítja, ami pozitívan töltött, illetve hidrofób aminosavakat tartalmaz megfelelő elrendezésben. A MAPK dokkoló árok egyrészt áll egy negatív töltésű CD-árokából (Common Docking, piros) és egy hidrofób felszínből (φ x φ árok, narancssárga). A D-motívumok pozitív töltésű aminosavai (θ) az előbbit, míg a hidrofób aminosavak az utóbbihoz kötnek (θ : arginin vagy lizin, φ : leucin, izoleucin, valin vagy ritkán prolin, x: bármely aminosav.)

Összefoglalva elmondható, hogy a MAPK-ok partner fehérjékhez lineáris D-motívumok révén kötnek. Egy olyan módszer kidolgozása tehát, melynek segítségével megbízható módon tudnánk szekvencia alapján lineáris D-motívumokat azonosítani különböző organizmusok fehérje állományában, lehetőséget adna MAPK foszforiláció révén szabályozott jelátviteli rendszerek hálózat szintű evolúciójának a feltárására is. Ehhez természetesen a MAPK-dokkoló peptid kölcsönhatások fizikai hátterének részletes vizsgálatai szükségesek.

MAPK-dokkoló peptid kölcsönhatások szerkezeti alapjainak feltárása

Annak ellenére, hogy a MAPK sejtes jelátviteli útvonalairól rengeteget tudunk, és szinte nincs olyan élettani folyamat, melyben ne játszanának valamilyen szerepet, meglepően kevés szubsztrátjukat írták le eddig. A legtöbbet tanulmányozott ERK2 enzimnek például mindössze néhány tucat célfehérjéjét ismerjük, s ezen szubsztrátok jelentős része tartalmaz D-motívumot is. Mindezeket túlnyomórészt szerencsés véletlenek folytán találták meg, szisztematikus MAPK-

szubsztrát keresésre eddig kevés kísérlet történt. Mivel azonban a MAPK-ok a célfehérjék többségét a D-motívumok révén találják meg, kézenfekvőnek tűnik az elképzelés, hogy a D-motívumok jelenléte által jósoljuk meg egy-egy fehérjéről, mégpedig a szekvenciája alapján, hogy lehet-e MAPK szubsztrát vagy nem, illetve hogy kialakít-e kapcsolatokat MAP kinázokkal vagy sem.

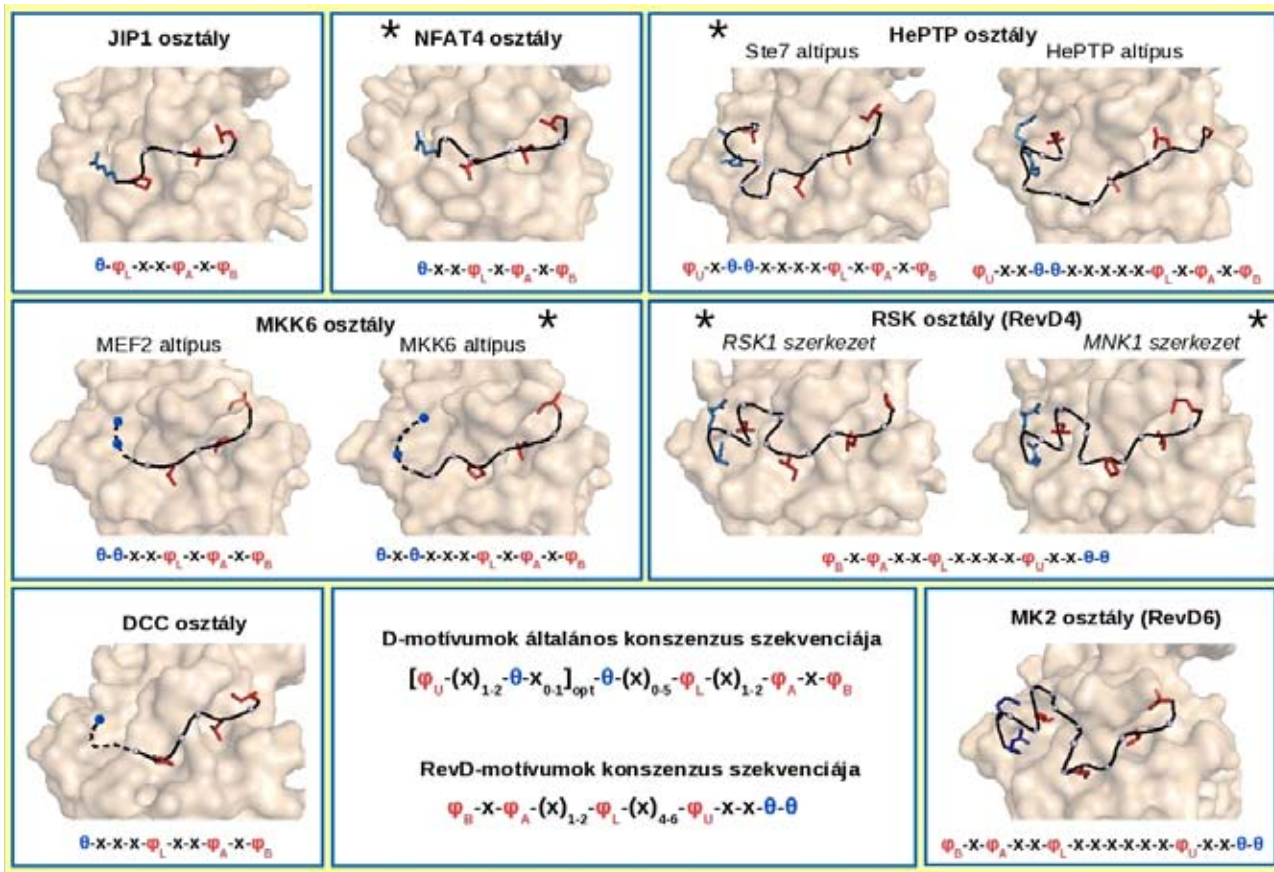
A D-motívumok megkeresése azonban korántsem egyszerű feladat. Ugyanis ezek a rövid, rendezetlen szerkezetű peptidláncok csak „laza” konszenzus szekvenciával bírnak, mivel a jelátvitel szempontjából releváns mikromólos affinitású fehérje-peptid típusú kölcsönhatások csupán néhány kontakt pontot igényelnek a motívum és a kölcsönható fehérje felszín között. Ezek miatt a pusztán szekvencia alapú keresési eljárások már csak a véletlen egyezések miatt is túlságosan sok hamis pozitív találatot adnak. Olyan lineáris motívumok azonosítása pedig, melyek egy-egy MAPK-t specifikus módon kötnek, még nagyobb kihívás. A helyzet sokban hasonlít arra a feladványra, mikor az SH2, SH3 vagy PDZ doménekhez kapcsolódó fehérjét szeretnénk azonosítani [5-6]. Ezek a domének szintén lineáris motívumokhoz kötődnek (az SH3 domének például PxxP és rokon motívumokhoz.) A probléma nehézsége két fontos tényezőtől adódik. Egyrészt, viszonylag nagyszámú, egymáshoz hasonló rokon felismerő domén van az emberi fehérjeállományban. Másrészt pedig egy-egy domén kötőárka általában nem csak egyféle elrendeződésben képes kötni a célfehérjék motívumait. Vagyis a motívumok alosztályokra tagolhatók, minden alosztály csak a kötő domének egy jól meghatározott csoportjával képes kapcsolatot teremteni, de ugyanakkor a doméneknek is van egy jellemző szelektivitási profilja.

Kutatócsoportunkban az utóbbi években a különböző lineáris motívumok MAPK kötődési profiljai mögött rejlő fizikai determinánsokat próbáltuk felderíteni szerkezeti biokémiai módszerekkel. A munka során megoldottuk több mint féltucat dokkoló peptid szerkezetét három különböző MAP kinázzal (ERK2, JNK1, p38α) komplexben. További korábról ismert, számos MAPK-dokkoló peptid komplex bevonása révén végül 10 különböző dokkoló peptid főlánc konformációs megoldást azonosítottunk, melyek mindegyike összeférhető legalább egy, a három vizsgált MAPK-on lévő különböző dokkoló árkok egyikével (2. ábra).

Keresési algoritmus MAPK-partner fehérjék felkutatására

A MAPK-dokkoló peptid kötődési „megoldások” száma tehát nem végtelenül nagy, és az ismert motívumok nagy része beilleszthető 10 csoportba. Egy-egy ilyen csoporton belül a peptidok specifikitási profilja és kötőmódja nagyon hasonló, de a legfontosabb, hogy a szekvenciájuk is közeli rokonságot mutat. Egy-egy csoporton belül az ismert példák a rögzített aminosavak miatt már elég jó „konszenzus motívummal” rendelkeznek. Ennek alapján a motívumok bioinformatikai módszerekkel megtalálhatóak, sőt jósolhatóak is fehérje szekvencia adatbázisok felhasználásával.

A dokkoló peptidok kereséséhez további ismereteket is fel lehet használni. Lényeges például hangsúlyozni, hogy ezen motívumok szinte kizárólag a fehérjék rendezetlen régióiban fordulnak elő; vagyis nincs eredendő, rögzített konformációjuk. Ezt csak a kötődési esemény közben nyerik el, így biztosítva a peptid



2. ábra. Különböző MAPK dokkoló peptid főlánc konformációs osztályok az eddig ismert fehérje-peptid szerkezetek alapján. Kékkel jelöltük a motívumokban a pozitívan töltött aminosavakat (θ), pirossal a hidrofób aminosavakat (φ). Az alsó indexek az utóbbiaknál a MAPK kötőzsebeit jelölik (U, L, A, illetve B: U: felső (upper) zseb; L: alsó (lower) zseb; A és B: a $\varphi x \varphi$ árok két pozíciója). A köztes aminosavak (x) lánc fekete színű, és szürke gyöngyök jelölik az alfa szénatomokat. A szerkezetekben a kevésbé jól definiált régiókat szaggatott vonal jelzi. Az egyes osztályok az adott motívumot hordozó fehérjék nevei alapján lettek elnevezve. JIP1 és NFAT4: JNK kötő állványfehérje, illetve transzkripciós faktor; HePTP, MKK6 és DCC: p38 és ERK2 kötő foszfatáz, MAP2K, illetve membrán receptor fehérjék; RSK és MK2: ERK-hez és p38-hoz specifikusan kötődő MAPK szubsztrát kinázok. A szerkezeti osztályok mindenekelőtt a töltött és hidrofób aminosavak elrendeződésében és az összekötő régiók hosszában különböznek. Néhány osztályban a köztes régiók változatossága miatt további alosztályokat is elkülöníthetünk. A csoportunk által meghatározott szerkezeteket *-gal jelöltük.

precíz, indukált illeszkedést a MAPK dokkoló felszínéhez. Szerencsére a rendezetlen régiókat ma már egyre pontosabban meg tudjuk jósolni a fehérje szekvenciája ismeretében. Ezen kívül arra is képesek vagyunk, hogy a helyi aminosav összetétel birtokában kiszűrjük azokat a polipeptidlánc-darabokat, amelyek energetikailag „nagyot nyerhetnének” akkor, ha egy másik fehérje arra alkalmas doménjéhez tudnának kötődni. Ha mindezeket az ismereteket összekötjük, egy egyszerű, szám jellegű paramétert kaphatunk az illető fehérjerégió más fehérjedomének irányába mutatott viselkedéséről. Erre a pontozásra képes az ANCHOR program, amely az IUPRED nevű rendezetlenség-jósló algoritmusra épül [7-8].

Bár az ANCHOR algoritmus képes kiszűrni a kötődésre nagyobb valószínűséggel képes peptidszakaszokat, de a valódi kötési energiát nem lehet vele pontosan

megbecsülni (mivel „általános” fehérje-felszínekkal számol). Ehhez szerkezeti modellezésre van szükség. Korábbi saját és mások szerkezeti munkájának köszönhetően azonban rendelkezünk legalább egy-egy atomi felbontású szerkezettel az eddig ismert motívum osztályokra. Így a motívumkeresés, illetve egyéb sejten belüli lokalizációra vonatkozó szűrések és az ANCHOR együttes alkalmazása után a fennmaradó találatok MAPK kötődését modellezhetjük a meglévő szerkezetek aminosavainak modellbeli átépítésével [9-10]. Ezután egy becsült kötési energiát kapunk, ami az újonnan azonosított lineáris motívum adott főlánc konformációban való dokkoló árokhoz való illeszkedését/összeférhetőségét jellemzi. Az egyes motívumosztályokon belüli rangsorolás után aztán következhet a találatok „élesben” történő tesztelése.

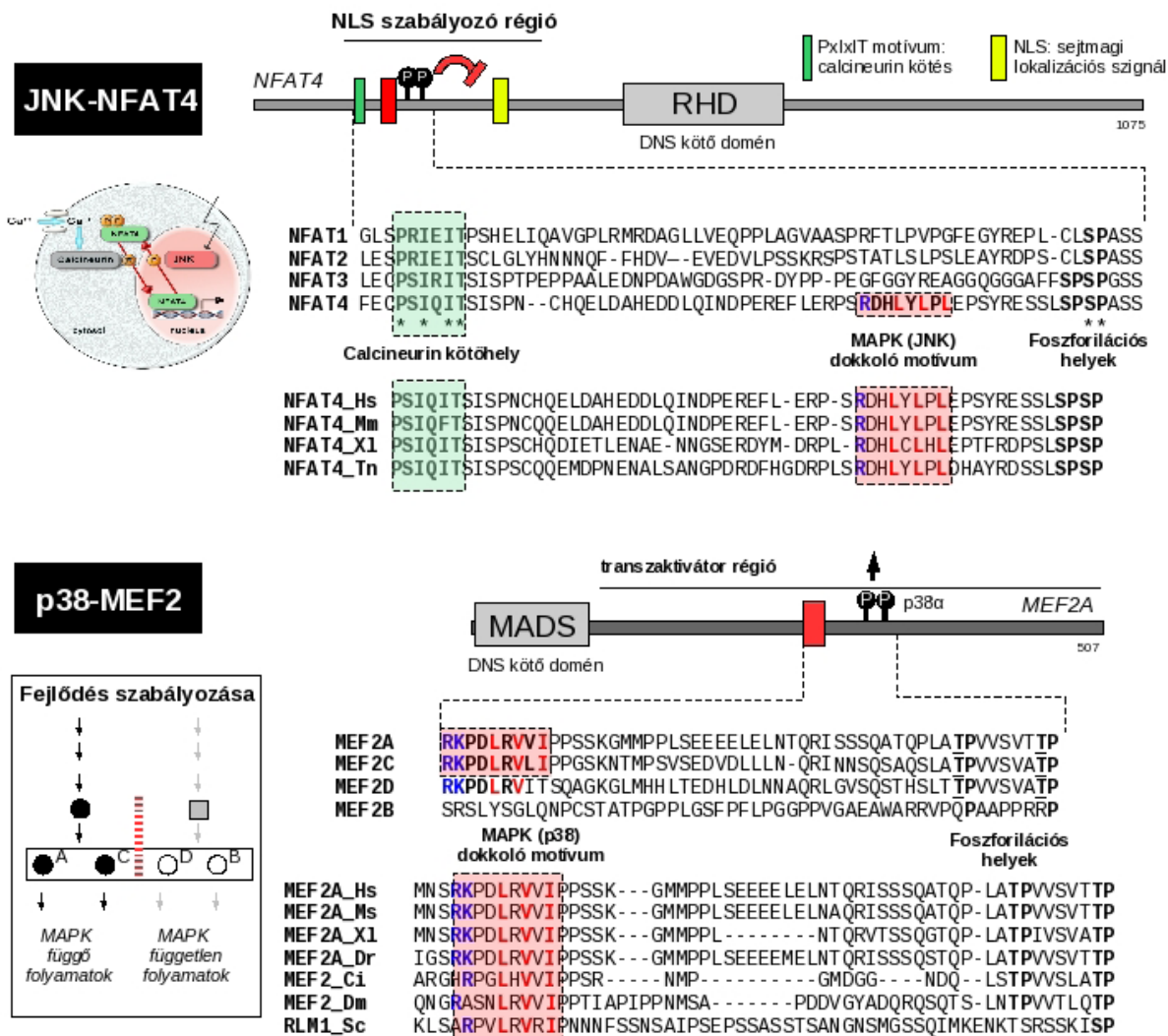
A találatok kísérleti tesztelése

Az eljárásunk végén magas pontszámot kapott motívumoknak megfelelő peptidszakaszokat szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő, majd a peptidok MAPK kötődését kvantitatív *in vitro* esszében vizsgáltuk. A szintetizált peptidokkal fluoreszcencia polarizációs titrálást hajtottunk végre megfelelő fluoreszcens festékkel jelölt kontroll peptidok ellenében. A módszer lényege, hogy az ismert MAPK dokkoló árokhoz kapcsolódó kontroll peptid kötődéséből származó fluoreszcens jel polarizációja lecsökken, ha azt az ismeretlen peptid a kötőhelyéről leszorítja. Így egy kísérletben határozhattuk meg az új dokkoló motívumot tartalmazó peptid kötődési affinitását adott MAPK-hoz, és egyben igazolhattuk a dokkoló árokba való kötődését is.

Bár a kötési affinitást jósló módszerek pontatlansága miatt nem minden magas pontszámú peptid adott mérhető ($K_d < 100 \mu\text{M}$) kötődési erősséget, mégis számos új MAPK kötő motívumot sikerült azonosítanunk. A kis számú mintából felfedezett, új partner fehérjék között találunk olyanokat, amelyek feltehetően különféle élettani folyamatok MAPK függő szabályozásában játszanak szerepet. ATG4D proteáz rendezetlen C-terminálisán található revD motívum talán a MAPK pályák és az autofágia közötti fizikai kapcsoltságot biztosíthatja, az SRFBP1 MK2-típusú p38-specifikus motívuma pedig a p38 által közvetített stresszválaszban lehet fontos. Az AMPK- $\gamma 2$ -ben azonosított MEF2-típusú motívum az éhezés/energiahiány érzékelése és a p38, illetve ERK utak között teremthet egy közvetlen MAPK foszforiláció alapú kapcsoltságot, míg ugyanezen MAPK-ok a ciklin-T2 motívumán keresztül pedig a fehérjeszintézis hatékonyságát befolyásolhatják. Továbbá azonosítottunk egy MKK6-típusú motívumot a KSR2 MAPK állványfehérjében is, amely talán egyes MAPK útvonalak aktiválásában közvetlenül játszhat szerepet. Természetesen megkezdjük a motívumok jelentőségének tesztelését *in vivo* sejtes rendszerekben is.

Evolúciós megfontolások

Az újonnan felfedezett motívumok különböző fehérjékben való eloszlása egy organizmuson belül, illetve különböző organizmusok között evolúciós szempontból is egyaránt rendkívül érdekes. Mivel a MAPK rendszer rendkívül ősi, a MAPK szubsztrátok egy része is rendkívül konzervált (például a humán MEF2A élesztő megfelelője is hordozza a D-motívumot). Példáinkon keresztül a fehérje-fehérje kapcsolatok dinamikus fejlődése is tetten érhető: sok motívum csak gerincesek-



3. ábra. MAPK kölcsönhatások evolúciója lineáris motívumok megjelenése és eltűnése révén. NFAT és MEF2 transzkripciós faktorok jó példaként szolgálnak arra, hogy lineáris kötő motívumok hogyan szabályozhatnak komplex folyamatokat. Mindkét transzkripciós faktor családnak emberben négy paralógja van. Ezek lineáris kötő motívum kompozíciója MAPK kötés szempontjából alapvetően eltér. Az NFAT fehérjék közül csupán az NFAT4 hordozza a JNK-t kötő dokkoló motívumot. Ez a calcineurin foszfatáz ellenében hatva gátolja a fehérje magi lokalizációját foszforiláció és így az NLS motívum maszkolása révén (NLS: sejtmagi lokalizációs motívum). A calcineurin foszfatáz az NLS-t defoszforilálja és ezáltal importinok számára válik hozzáférhetővé. Érdekes, hogy a calcineurin kötésért felelős PxlIT motívum minden NFAT homológban megtalálható. A JNK kináz pedig környezeti ingerektől függő módon szabályozhatja az NFAT4 transzkripciós aktivitását, de a többi paralóg szabályozásában így nem vesz részt. Mivel a dokkoló motívum az eddig ismert összes gerinces NFAT4 ortológban megtalálható, közvetlenül az ősi NFAT gén duplikációja után alakulhatott ki. A MEF2 transzkripciós faktorok evolúciója fordított folyamatot tükröz: Itt egy ősi motívum génduplikáció utáni részleges elvesztéséről van szó. A négy emlős fehérje közül két paralógban a már élesztőgombában is megtalálható, ősi motívum részben vagy teljesen hiányzik. A MEF2 faktorok esetében a motívum megléte (MEF2A és MEF2C) vagy hiánya (MEF2B és MEF2D) az ERK és p38 MAP kinázok általi szabályozástól teszi függővé vagy éppen függetlenné a sejt differenciálódás folyamatát. (Hs: Homo sapiens, Mm: Mus musculus, XI: Xenopus laevis, Dr: Danio rerio, Tn: Tetraodon nigroviridis, Ci: Ciona intestinalis, Dm: Drosophila melanogaster, Sc: Saccharomyces cerevisiae.)

ben mutatható ki, sőt vannak egészen újak is. Az ATG4D például csak a magasabb rendű emlősökben tartalmazza a reverz D motívumot. Továbbá jellemző hogy a dokkoló peptidek sokszor csak egy-egy paralógban jelennek meg. Az NFAT1/2/3-ban nincsen MAPK-felismerő D-motívum, csak az NFAT4-ben, vagy a motívumok akár el is tűnhetnek, ahogy a MEF2B-ben és MEF2D-ben elveszett az ős-MEF-ben még meglévő motívum (3. ábra). Sőt arra is van példa, hogy csak bizonyos splicing izoformák tartalmazzák a MAPK-kötő motívumot: ilyen például az AMPK- γ 2.

Összefoglalás

Elmondhatjuk, hogy lineáris motívum alapú jelátviteli kapcsolatok feltérképezéséhez gondosan kiválasztott fehérje-peptid komplexek szerkezeteinek megoldása nemcsak a konszenzus motívumok felismerésében, illetve pontosításában elengedhetetlenek, de mint bemutattuk, hozzájárulhatnak új motívumok genom szintű azonosításához is. Szerkezeti információk tehát felhasználhatók „laza” konszenzus motívum szekvenciák alapján azonosított több száz vagy akár ezer találat hatékony szűkítésére és az „igazi” találati arány lényeges növelésére. Ez pedig a jövőben hasznos segédeszköz lehet majd fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok akár teljes körű feltérképezéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani Patthy Andrásnak (ELTE) a kiváló minőségű peptidszintéziséért, Szántai-Kis Csabának (Vichem Kft.) a fluoreszcencia polarizációs, illetve Erdődi Ferencnek (DOTE) az SPR alapú kölcsönhatás vizsgálatainkban nyújtott segítségükért. Szintén köszönettel tartozunk Pálinkás Gábornak és Kardos Juliannának, hogy támogatásukkal a munka egy része az MTA KK Fehérje Laboratóriumában is folyhatott. Továbbá a bioinformatikai alapú szűrés ötletének megvalósítása nem jöhetett volna létre együttműködő munkatársaink támogatása és munkája nélkül: Olga Kalinina (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken), illetve Mészáros Bálint és Dosztányi Zsuzsa (MTA TTK).

Irodalomjegyzék

- [1] Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**:1911-2.
- [2] Cargnello, M., Roux, P.P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **75**:50-83.
- [3] Reményi, A., Good, M.C., Lim, W.A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol.*, **16**:676-85.
- [4] Zeke, A., Lukács, M., Lim, W.A., Reményi, A. (2009) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol.*, **19**:364-74.
- [5] Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S. L., Currell, B., Yeh, J. H., Reva, B., Held, H. A., Appleton, B. A., Evangelista, M., Wu, Y., Xin, X., Chan, A. C., Seshagiri, S., Lasky, L. A., Sander, C., Boone, C., Bader, G. D., Sidhu, S. S. (2008) A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol.*, **6**:e239.

- [6] Kaneko, T., Huang, H., Zhao., B., Li, L., Liu, H., Voss, C. K., Wu, C., Schiller, M. R. and Li, S. S. C. (2010) Loops Govern SH2 Domain Specificity by Controlling Access to Binding Pockets. *Sci. Signal.*, **3**: ra34
- [7] Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P., Simon, I. (2005) The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins. *J. Mol. Biol.*, **347**: 827-839.
- [8] Mészáros, B. Simon, I., Dosztányi, Z. (2009) Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLoS Comput Biol*, **5**: e1000376
- [9] Sánchez, I. E., Beltrao, P., Stricher, F., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Rousseau, F., Serrano, L. (2008) Genome-wide prediction of SH2 domain targets using structural information and the FoldX algorithm. *PLoS Comput Biol.*, **4**:e1000052.
- [10] London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., Schueler-Furman, O. (2011) Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, **39**:W249-53.



Zeke András diplomáját 2005-ben szerezte a SOTE ÁOK-n. A gyógyszeriparban, a klinikai gyógyszerkutatás területén eltöltött évek után, 2009-ben kezdte meg doktori tanulmányait az ELTE szerkezeti biokémia iskolájában, Reményi Attila kutatócsoportjában. Fő érdeklődési területeik a mitogén-aktivált protein kinázok protein-protein kölcsönhatásai, partner- és szubsztrát felismerő mechanizmusai és ennek szerkezeti háttere, valamint ezen ismeretek lehetséges felhasználásai.



Garai Ágnes diplomáját 2010-ben kapta az ELTE biológus szakán. Doktori tanulmányait a Biokémiai Tanszék Szerkezeti Biokémia programjában folytatja Reményi Attila kutatócsoportjában. Laboratóriumuk jelátviteli pályák molekuláris logikájával foglalkozik. Ezen belül fő érdeklődési területük a MAPK-ok fehérje-fehérje, illetve -peptid típusú interakciói, valamint ezek szerkezeti háttere és esetleges gyakorlati felhasználása.



Reményi Attila 1997-ben diplomázott az ELTE biológus szakán. Egyetemi diplomamunkáját a Bristol Egyetemen Angliában, míg PhD munkáját az Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumban végezte Heidelbergben és Hamburgban. 2002 és 2007 között a Kaliforniai Egyetemen San Francisco-ban posztdoktori ösztöndíjasként élesztő jelátviteli pályák molekuláris logikájának felderítésén dolgozott. 2007-től az ELTE Biokémiai Tanszéken tudományos főmunkatárs és csoportjávall humán protein kinázok szerkezetét és kölcsönhatásait kutatja. Jelenleg Bolyai János kutatói ösztöndíjas (MTA), illetve Wellcome Trust International Senior Research Fellow.

GRÁF LÁSZLÓ AKADÉMIKUS 70 ÉVES

Gráf László, a hazai biokémia egyik legszínesebb egyénisége, az ELTE emeritus professzora, Széchenyi-díjas akadémikus 70 éves. Ő a „kalapos karizma”, ahogy egyik tanítványa, ma tanszéki munkatársunk nevezte. Nagykarimájú, mondhatnám „karizmájú” kalapjai messze földön híresek – amint azt Bér Rudinó festőművész róla készült rajza is megörökíti.



Egy „Renaissance Man”, ahogy a tiszteletére az ELTE Harmónia termében megrendezett „Friends and Science” szimpózium egyik amerikai meghívottja nevezte. Honnan erednek ezek az elnevezések, miért is olyan érdekes személyiség Gráf László? E sorok írója 27 éve ismeri az ünnepeletet. San Francisco-ban találkoztunk először, egyik kedvenc városában. Azután következett együtt több mint két évtized a Biokémiai Tanszéken, harmóniában. Tudományos érdeklődésünk csak annyiban fedett át, hogy mindketten az izom miozin *coiled-coil* szerkezetű „rúd” régiójának tanulmányozásával kezdtük kutatói pályánkat, csak ő 15 évvel korábban, Bíró Endre professzor, a Biokémiai Tanszék alapítójának laboratóriumában. (Bíró Endre viszont Szent-Györgyi Albert budapesti intézetében kezdett „miozinológiával” foglalkozni, ezért kis túlzással talán szabad Dosztojevskijt parafrazálnom: a Biokémiai Tanszéken izombiokémiával, motorfehérjéjével foglalkozó kutatók mindannyian Szent-Györgyi Albert köpönyegéből bújtunk elő).

A kilencvenes évek elején született egy közös publikációnk, amelyben a fésűkagyló miozin nehéz lánc génről írtunk le érdekes új tényeket – akkoriban azon gondolkodtam, hogy Szent Jakab és a zarándokok attribútumának, Botticelli Vénuszának, a *Pecten* kagylónak a kultúrhistóriájával (is) kellene foglalkoznom, nem csak gyűjtenem és fogyasztanom őket. Talán ezek a gondolatok Gráf László hatására (is) ötlöttek fel bennem. Mert ő a kutatás szenvedélye mellett a természetre történő rácsodálkozás, kíváncsiság, filozofálás és a gyűjtőszendély embere – legyenek ezek a tárgyak kövek, természet faragta faágak, csontok,

kövületek. Gráf László irodája egy természetrajzi gyűjtemény benyomását kelti. Ráadásul kiváló fotós is. A tanszékvezetői irodájának ablakából (melyet ma én „bitorlok”) készített fotókból évekkel ezelőtt nagy sikerű kiállítást rendezett az ELTE-n „Hajnali részegség” címmel. De az irodalommal is kacérkodott már (lásd a Tudomány és Művészet rovatban „Az Intézet, 1965” című karcolatát és válogatott fotóit). Személy szerint nagyra értékeltem a fehérjetudomány és a művészet kapcsolatának vizuális bemutatásáról az utóbbi években kifejtett tevékenységét. Elég itt utalnom az ELTE Gömbaulájában és az MTA székházában képzőművészek bevonásával 2009-ben megszervezett „A fehérjék színes világa” című kiállításra és a hozzá kapcsolódó előadóra. Születésnapjára a tanszéki munkatársai Albertus Seba *Locupletissimi rerum naturalium thesauri* című híres metszetgyűjteményének faksimile kiadásával leptük meg – hogy miért, az a fentiek alapján talán érthető.

A születésnapja alkalmából rendezett „Friends & Science” című szimpóziumon számos külföldi és hazai kutató, professzor kollégái és barátai köszöntötték. Az eseményre olyan külföldi előadókat hívtunk meg, akiket több évtizedes barátság fűz Gráf László professzorhoz, amelyet mindannyian fel is elevenítettek fényképek és visszaemlékezések formájában. A szimpóziumon külföldi vendégek, a Biokémiai Tanszék vezetője és Závodszy Péter, az MTA Biológiai Tudományok Osztályának elnöke, az ELTE emeritus professzora tartottak szakmai előadást saját kutatási területükről. A szimpózium előadói között szerepelt William Rutter, aki jelenleg a Synergenics cég elnök-vezérigazgatója, korábban pedig a Chiron Corporation orvosi-biotechnológiai cég alapítója volt, azé a vállalaté, amely a világon az elsők között állított elő rekombináns fehérje gyógyszereket. A vendégek között volt Robert Lazarus, a világon elsőként megalakult biotechnológiai vállalkozás, a Genentech cég senior munkatársa, Kúnos György magyar származású amerikai professzor, az MTA külső tagja, az NIH National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism tudományos igazgatója és John Markley, a legnagyobb amerikai NMR-központ vezetője is. A szimpózium az Európai Léptékkal a Tudásért ELTE kutatóegyetemi pályázat támogatásával valósult meg.

Végül álljon itt róla egy rövid életrajz, kiemelve Gráf László pályafutásának néhány mérföldkövét. 1942-ben Zalaegerszegen született. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karán szerzett vegyész diplomát 1965-ben. Pályafutása első fele a Gyógyszerkutató Intézethez köti, ahol 1985-ig dolgozott, 1975-től a Biokémiai osztály vezetőjeként. Időközben több évet töltött az Egyesült Államokban, a San Francisco-i Egyetemen (UCSF) a Hormon Research Institute-ban és a New York-i Egyetemen a Center for Neurochemistry-ben. Peptidkémiai kutatásaival nemzetközi hírnevet vívott ki magának. Ebből az időből a legfontosabb felfedezései a sertés és humán adrenokortikotrop hormon helyes aminosav szekvenciájának leírása és a β -lipotrop hormon felfedezése volt. 1972-ben védte meg a biológiai tudományok kandidátusi, 1982-ben akadémiai doktori értekezését. 1979-ben Akadémiai Díj kitüntetésben részesült.

1985-től az Eötvös Loránd Tudományegyetem egyetemi tanára, ahol hosszú ideig, huszonegy éven keresztül (1986-2007) töltötte be a Biokémiai Tanszék vezetői tisztségét. 1997 és 2001 között az ELTE TTK Professzori Tanácsának elnöke

volt. Itteni munkásságát fémjelzi, hogy egyetemi szinten az elsők között a Biokémiai Tanszéken folyt nemzetközi szinten is elismerést kiváltó, a rekombináns DNS technológiára alapuló fehérjekutatás Magyarországon: elsőként állítottak elő hely-specifikus génmutációkból kiindulva, fehérjemérnöki (avagy ahogy ő nevezi „fehérjeszobrász”) módon tripszin mutánsokat. Fő kutatási területe a szerin-proteázok és fehérje inhibitoraik szerkezet-funkció összefüggéseinek feltárása. Komoly fegyvertény volt Gráf László részéről a Szerkezeti biokémia doktori program elindítása és vezetése. Saját témavezetése mellett 16 PhD disszertáció készült.

Tudományos munkásságát eddig több mint 150 szakmai közlemény jelzi, amelyekre 3000 független hivatkozás történt. A kutatói tevékenysége elismeréseként 1998-ban Széchenyi-díjat kapott. A Magyar Tudományos Akadémia 1993-ban választotta levelező, 2001-ben rendes tagjai sorába. Iskolateremtő tevékenységéért 2010-ben Szilárd Leó professzori ösztöndíjban részesült. Jelenleg is aktívan kutat, részt vesz az egyetemi és az akadémiai közéletben. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem 2012-ben professor emeritus címet adományozott számára.

Nyitray László
tanszékvezető egyetemi docens
ELTE TTK Biokémiai Tanszék

ÍGY KEZDŐDÖTT LÁSZLÓ ÉS AZ ÉN TÖRTÉNETEM 22 ÉVVEL EZELEŐTT

Gráf Lászlóval 22 évvel ezelőtt találkoztam egy vidéki gimnáziumban. 1990-et írtunk abban az évben és a rendszerváltozás izgatott hangulatában élt akkor az ország. Én 17 éves voltam és László 48 lehetett. A változások szele minket is elérte: a gimnázium 225. éves fennállásának alkalmából Landler Jenő Gimnáziumból változtunk át Batthyány Lajos Gimnáziummá. László ebben a gimnáziumban érettségizett évtizedekkel azelőtt, s mivel azóta „sokra vitte”, meghívott vendégként vett részt az ünnepségeken. A diákok szabadon választhattak az egykori „öregdiákok” előadásai közül és én László Fehérjemérnökség című előadását választottam. Körülbelül harmincan lehettünk a teremben, amikor elkezdődött volna az előadás. A diavetítő azonban kínos módon nem indult, pedig az előadó állítólag fantasztikus diaanyaggal készült: a legutóbbi San Francisco-i tanulmányútról számolt volna be gyönyörű képek kíséretében, és nagyon sajnálta, hogy a vetítő csütörtököt mondott. Aztán gondolt egyet, krétát ragadott, a táblához ment és felrajzolt egy kört A következő bő félórában megismertette velünk a rekombináns DNS technológia alapjait és lehetőségeit. Talán az előadás sikerének és az előadó vitathatatlan karizmájának is köszönhető, hogy a közönség soraiból aztán évek múlva hárman fel is bukkantak az ELTE Biokémiai Tanszék ajtaja előtt, s jelentkeztek diplomamunkára.

A sors azonban úgy hozta, hogy végül én nem a Tanszéken írtam meg a szakdolgozatomat, hanem kijutottam Angliába, onnan pedig egy doktori iskolába, Németországba. Az évek során azonban tartottuk a kapcsolatot: László lelkesen részt vett a külföldi doktori munkámat értékelő/segítő bizottságban. Majd a kaliforniai posztdoktori éveim alatt évente találkoztunk, és ő bátorított abban az eredeti szándékomban, hogy a garabonciás vándorévek után hazatérjek. Érdekes egyezés, hogy körülbelül harminc évvel előttem László is San Francisco-ban élt jó pár évet, s ugyanabban az épületben kutatott, ahol én akkor dolgoztam. Közös bennünk a kalandvágy, az Óceán szeretete és csodálata is. Hatvankét éves korában például könnyedén sikerült rávennem arra is, hogy életében először kipróbálja a hullámlovaglást. Távkapcsolatunk aztán később közelire változott: tanszéki laborjaink néhány méter távolságon belül vannak, és naponta találkozunk. A több mint húsz évvel ezelőtti találkozás egy számomra fontos mentor-diák viszonyra érett az évek során. Az akkori nagykanizsai találkozás és annak jelentősége a diák hallgatóság fogékony tagjainak későbbi döntéseire adta az inspirációt ahhoz, hogy kitaláljuk az „ELTE házhoz megy” programot, hogy az ilyen típusú személyes találkozások ne csak a véletlen szeszélyeiből jöhessenek létre. A program célja, hogy a pályaválasztás előtt álló középiskolás diákok és aktív kutatók között minél több személyes csatornát nyisson és ezáltal figyelmüket a természettudományos kutatások izgalmaire és a bennük rejlő lehetőségekre terelje. Ennek keretében László pár éve megismételte előadását a most már Batthyány Lajos nevű egykori közös iskolánkban. Továbbá az utóbbi években a Tanszék tucatnyi más középiskolában próbálta a biokémia és molekuláris biológia felé irányítani a diákok figyelmét, illetve személyes találkozásokat katalizálni érdeklődő hallgatók és gyakorló kutatók között.

Visszakanyarodva arra a verőfényes tavaszi, 22 évvel ezelőtti napra az alábbiakat mondhatom. A „Bevezetés a biokémiába” című szemináriumon a rekombináns DNS technológia alapjait tanítván BSc hallgatóknak, mindig nagy izgalommal készülök arra a részre, amikor a plazmidokat kell elmagyaráznom. Ilyenkor egy kis hatásszünetet tartok, majd krétát veszek, odamegyek a táblához és rajzolok egy kört – éppen úgy, ahogy azt annak idején Lászlótól láttam.... és titkon reménykedek; akkor is, amikor egy vidéki gimnáziumban tartok előadást a sejtes jelátvitelben szerepet játszó molekuláris mechanizmusokról. Talán a laptopom vagy legalább a vetítő csütörtököt mond, és akkor majd rajzolhatok egy jó kis hálózatos ábrát krétával. Persze a kétség is kísért, hogy összejön-e majd. Mindenesetre László remek prototípusa annak a tudósnak, akitől mi fiatalabb kutatók egyebek mellett főként stílust is tanulhatunk, és így bizakodhatunk, hogy sikerülhet!

Reményi Attila
tudományos főmunkatárs
ELTE TTK Biokémiai Tanszék

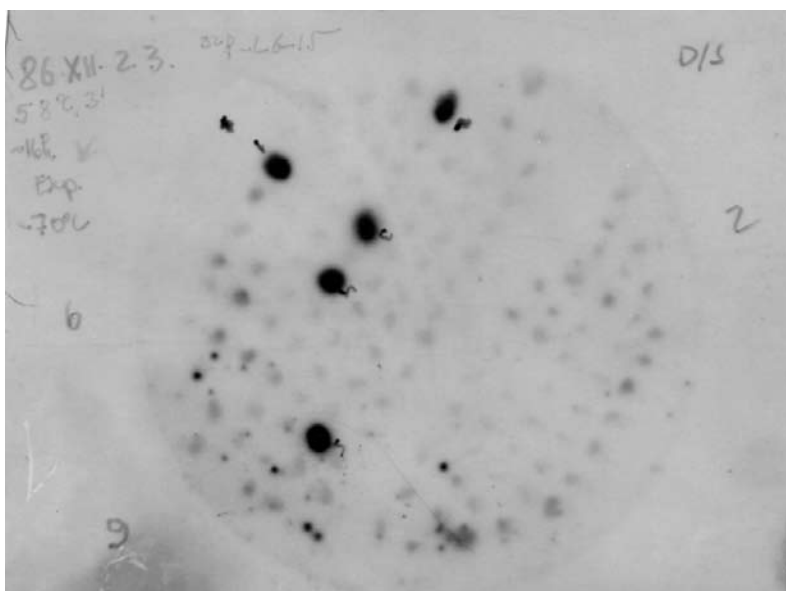
AZ ELSŐ MUTÁNS A PUSKIN UTCÁBÓL

1986 őszén vette át Gráf László az ELTE Biokémiai Tanszékének irányítását a nyugállományba vonuló Bíró Endre professzortól. A Biokémiai Tanszék kutató laboratóriumai akkoriban a Puskin u. 3. alatti épület földszintjének hátsó szakaszában, hallgatói laboratóriumai az alagsorban voltak. Gráf professzor színre lépésével egy időben kezdődött a földszinti helyiségek több évtizede aktuális felújítása, a tanszék egésze az egyik alagsori laboratóriumba szorult. A siralmas állapotok ellenére a tanszék oktatóinak hangulata optimizmust sugárzott, az új tanszékvezető vonzó új témát kívánt meghonosítani: változtassuk meg egy enzim specifitását a kódoló DNS-ének irányított mutagenézisével.

Tanszékvezetővé történő kinevezését megelőzően Gráf László több évet töltött el a UCSF Hormon Kutató Intézetében. Ennek az intézetnek a vezetője akkor William (Bill) Rutter volt, aki az intézetét a 70-es évek végétől kezdve a rekombináns DNS technikák, molekuláris klónozás területén a világ vezető laboratóriumai közé fejlesztette. Itt történt többek között az inzulin és pár évvel később az inzulin receptor klónozása is. Ebben a munkában Gráf László is részt vett. Az intézet fő kutatási profilja a pankreatikus génexpresszió tanulmányozása volt. Ennek a munkának a keretében klónozták számos szekretált fehérje, többek között a tripszinogén génjét is. San Francisco-i tartózkodása alatt Gráf László már tett egy merész próbálkozást a tripszin specifitásának megváltoztatására. Régóta ismert tankönyvi tétel, hogy a tripszin specifitását alapvetően a peptid szubsztrát lizil- vagy arginil- és a fehérje egy aszpartil-oldallánca közötti ionos kölcsönhatás határozza meg. Az ötlet a következő volt: fordítsuk meg az ionpárt, legyen a lizin a fehérje szubsztrátkötő zsebében. Az elkészült fehérje azonban nem hasította az aszpartil szubsztrátokat, viszont nagyon gyenge kimotripszin-szerű aktivitást mutatott [1]. Ennek fényében a következő lépés logikus – alakítsuk át kimotripszinné a tripszint. Mindkét fehérje térszerkezete már ismert volt. A kimotripszin szubsztrátkötő zsebében a tripszin aszpartil oldalláncával azonos pozícióban egy szerin található, melynek sorszáma 189 a kimotripszin aminosav szekvenciájában. A feladat tehát az volt, hozzuk létre az Asp189Ser tripszin mutánst.

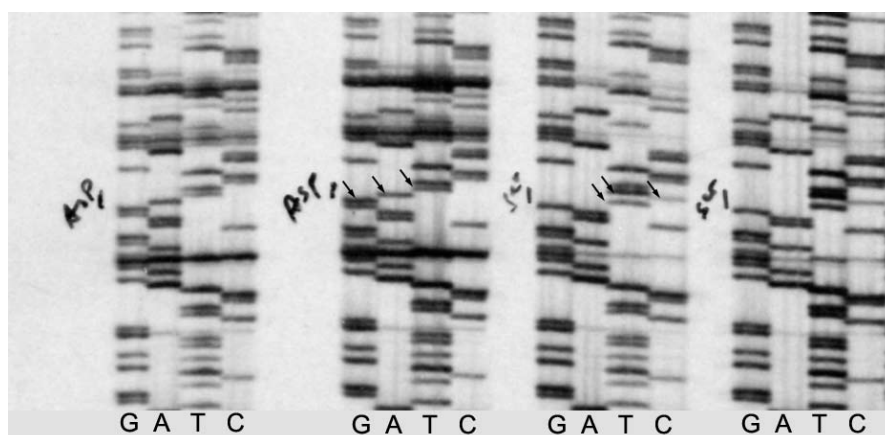
A Biokémiai Tanszék kutatási profilja Bíró Endre idejében a Szent-Györgyi Albert által elkezdett izomfehérje kutatások folytatása volt. Kémiai módosításokkal és limitált proteolízissel vizsgáltuk a miozint és az aktint, hagyományos fehérjekémiai technikákat alkalmazva. DNS munkához szükséges eszközök nem voltak a tanszéken. Az induláshoz szükséges kisebb eszközöket (futtató kádak, üveglapok, távtartók és fésűk a DNS szekvenáláshoz) és ami még fontosabb volt, a vektorokat, oligonukleotidokat és baktérium törzseket Gráf László hozta magával. A munka kezdeti szakaszában a tanszék valamennyi oktatója szerepet vállalt. A DNS munkákat Jancsó Ágnes és Pintér Katalin végezte. A mutagenézishez akkoriban még nem voltak kitek, a klasszikus, M. Smith-féle módszert használtuk. Egyszálú M13 fág DNS-hez a mutagén primertől indulva második szálát szintetizáltunk, és ezzel a konstrukcióval transzformáltunk JM101 baktérium törzset. A keletkező fág plakkok többsége azonban nem mutáns, mivel a baktéri-

um hibajavító mechanizmusa kegyetlenül visszaalakítja a drága pénzen vásárolt oligonukleotiddal bevitt mutációt. Ezért a sok száz vad típus közül a néhány mutánst sorozatos, egyre magasabb hőmérsékleten történt hibridizációval lehet megtalálni. A hibridizációhoz ^{32}P izotóppal jelölt oligonukleotidot használtunk. Az első sikeres mutagenézist bizonyító autoradiogram látható az 1. ábrán. A megfakult felirat a film előhívásának dátumát is rögzítette.



1. ábra. Karácsonyi ajándék 1986-ból. Autoradiogram nitrocellulóz filterre átvitt M13 fág DNS radioaktív mutagén oligonukleotiddal történt hibridizációjáról. Az erős fekete foltok mutáns DNS-t tartalmazó plakkokat jelölnek.

Hamarosan sikerült a mutáció meglétét szekvenálással is igazolni (2. ábra). A gél minőségének értékelésekor figyelembe kell azt is venni, hogy a reakcióhoz nem T7-polimerázt (Sequenase), hanem Klenow-enzimet használtunk. A számos kompresszió ellenére jól látható, hogy az Asp GAT kodonja helyett megjelent a Ser TCT tripllettje.



2. ábra. A vad típusú (Asp) és a mutáns (Ser) tripszin szekvenciája a 189-es régióban.

A DNS munkákkal párhuzamosan folytak az előkészületek fehérjeizolálás és aktivitásmérés körülményeinek kidolgozására. Száz patkány pankreászából készítettünk acetone szárazport, amiből hagyományos módszerekkel tripszinogént állítottunk elő. Ezzel a tripszinogénnel nyulakat immunizáltunk, az így kapott ellenanyag nélkülözhetetlennek bizonyult a rekombináns fehérje izolálása során. Ennek két oka volt, egyrészt a fehérje termelés meglehetősen alacsony volt (0,1-0,5 mg/liter), másrészt a tripszinogén mobilitása SDS-gélen gyakorlatilag megegyezik a β -laktamázéval. Az aktivitás méréséhez szükségünk volt olyan tetrapeptid szubsztátokra, amelyek P1 helyén különböző aminosavak vannak és az érzékeny mérés lehetőségének biztosítására fluoreszcens távozó csoportot tartalmaznak. Ezek szintézisét Hepp József kollegánk végezte. További problémát jelentett, hogy a tanszéken nem volt fluoriméter. Ezt a nehézséget úgy hidaltuk át, hogy a Brice-Phoenix fényszórás mérő készülékünkbe Hegyi Gyuri beszerelt a MOM-tól vásárolt interferencia filtereket.

1987 tavaszára elkészült az első mutáns tripszin. A részletes enzimológiai karakterizálás során – amikor gyakran a „nulla különböző válfajait” mértük (© Hegyi Gy.), kiderült, hogy ez a mutáns elvesztette ugyan tripszin-szerű aktivitását, de fiziológiai körülmények között nem rendelkezik számottevő kimotripszin-szerű aktivitással sem. Ennek magyarázata csak jóval később, a térszerkezet felderítése után vált lehetségessé [2]. Ugyanakkor viszont azt találtuk, hogy magas pH-n, ahol a lizin szubsztát protonációja visszaszorul, az aktivitás jelentősen növekszik. Ez a megfigyelés, a többi szubsztáton kapott eredmény összevetésével alkalmat adott arra, hogy analizálhassuk az elektrosztatikus komplementaritásnak az enzim szubsztátkötésében és a katalízisben betöltött szerepét [3].

Az első mutáns rekombináns fehérje elkészültével a Biokémiai Tanszéken beköszöntött a „fehérjemérnökség” korszaka, amely azóta is töretlenül tart.

Irodalomjegyzék

- [1] Gráf L., Craik C.S., Patthy A., Rocznik S., Fletterick R.J., Rutter W.J. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry*, **26**: 2616-2623
- [2] Szabó E., Böcskei Z., Náray-Szabó G., Gráf L. (1999) The three-dimensional structure of Asp189Ser trypsin provides evidence for an inherent structural plasticity of the protease. *Eur J Biochem*, **263**: 20-26
- [3] Gráf L., Jancsó A., Szilágyi L., Hegyi G., Pintér K., Náray-Szabó G., Hepp J., Medzihradsky K., Rutter W.J. (1988) Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 4961-4965

Szilágyi László
nyugalmazott egyetemi docens
ELTE TTK Biokémiai Tanszék

A BIO-SCIENCE DÍJ EREDMÉNYHIRDETÉSE

Hagyományainkhoz híven, a Magyar Biokémiai Egyesülettel együttműködve a **BIO-SCIENCE Kft. pályázatot hirdetett** 2011-2012-ben, nemzetközi folyóiratban megjelent, molekuláris biológiai témájú közlemény szerzője/szerzői részére. A pályázati kiírásban foglaltak szerint a hazai tudományos műhelyekben készült közlemények előnyt élveztek.

A pályázatra örvendetesen nagyszámú, 23 pályamű érkezett. Több ifjú kolléga több közleménnyel is pályázott. Az MBKE Intézőbizottsága 2012. április 17-én tartott ülésen megvitatta a pályázatokat. A titkos szavazás alapján a díjat Csépanyi-Kömi Roland, a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének tudományos segédmunkatársa nyerte el. A díjazott felkérést kapott arra, hogy eredményeit a „From Molecules to Life and Back” FEBS3+ konferencián (Optajja, 2012. június 13-16) ismertesse.

A nyertes pályamű:

Csépanyi-Kömi R, Sirokmány G, Geiszt M, Ligeti E. ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes. *Blood* 2012 Jan 12;119(2):573-82, Epub 2011 Nov 16. **Impakt faktor: 10,558.**

Gratulálunk a díjazottnak!

Ezúton is köszönjük a Bio-Science Kft. támogatását!

Az MBKE Vezetősége

A beérkezett pályamunkák bibliográfiai adatai:

Abdul-Rahman O, Sasvari-Szekely M, Ver A, Rosta K, Szasz BK, Kereszturi E, Keszler G. Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary. Altered gene expression profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of type 2 diabetic rats. *BMC Genomics* 13:81-90 2012, IF: 4,206

Baghy K, Dezso K, László V, Fullár A, Péterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary. Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest* 91(3):439-51 2011, IF: 4,405

Bai P, Canto C, Brunyánszki A, Huber A, Szántó M, Cen Y, Yamamoto H, Houten SM, Kiss B, Oudart H, Gergely P, Menissier-de Murcia J, Schreiber V, Sauve AA, Auwerx J. Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, ESBS, 67412 Illkirch, France. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab* 13(4):450-60 2011, IF: 18,207

Bai P, Cantó C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia J, Auwerx J. Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, ESBS, Illkirch, France. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab* 13(4):461-8 2011, IF: 18,207

- Csépányi-Kömi R, Sirokmány G, Geiszt M, Ligeti E. Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary. ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes. *Blood* 19(2):573-82 2012, IF: 10,558
- Csörgő B, Fehér T, Tímár E, Blattner FR, Pósfai G. Institute of Biochemistry, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, 62 Temesvári krt, H6726 Szeged, Hungary. Low-mutation-rate, reduced-genome *Escherichia coli*: an improved host for faithful maintenance of engineered genetic constructs. *Microb Cell Fact* 11:11 2012, IF: 4,544
- Kiss A, Bécsi B, Kolozsvári B, Komáromi I, Kövér KE, Erdődi F. Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Hungary Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Hungary Vascular Biology, Thrombosis and Hemostasis Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Clinical Research Center, University of Debrecen, Hungary Department of Chemistry, University of Debrecen, Hungary. Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl- β -D-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS J* 2012 Jan 19. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08498.x. [Epub ahead of print], IF:3,129
- Kiss B, Duelli A, Radnai L, Kékesi KA, Katona G, Nyitray L. Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Hungary. Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(16):6048-53 2012, IF: 9,432
- Lipinszki Z, Kovács L, Deák P, Udvardy A. Institute of Biochemistry, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, H-6701 Szeged, Hungary. Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors. *Biochemistry* 51(12):2461-70 2012, IF: 3,226
- Lipinszki Z, Pál M, Nagy O, Deák P, Hunyadi-Gulyas E, Udvardy A. Institute of Biochemistry, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary. Overexpression of *Dsk2/dUbqln* results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit. *FEBS J* 278(24):4833-44 2011, IF:3,129
- Margittai É, Löw P, Stiller I, Greco A, Garcia-Manteiga JM, Pengo N, Benedetti A, Sittia R, Bánhegyi G. Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary. Production of H₂O₂ in the endoplasmic reticulum promotes in vivo disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 16(10):1088-99 2012, IF:8,209
- Markó K, Kohidi T, Hádinger N, Jelítai M, Mezo G, Madarász E. Institute of Experimental Medicine of Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. marko@koki.hu Isolation of radial glia-like neural stem cells from fetal and adult mouse forebrain via selective adhesion to a novel adhesive peptide-conjugate. *PLoS One* 6(12):e28538 2011, IF: 4,411
- Matta C, Juhász T, Szíjgyártó Z, Kolozsvári B, Somogyi C, Nagy G, Gergely P, Zákány R. Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, H-4032 Debrecen, Hungary. PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures. *Biochimie* 93(2):149-59 2011, IF: 3,787
- Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozsó Z, Tökési N, Horváth I, Hlavanda E, Kovács J, Magyar A, Szücs M, Orosz F, Penke B, Ovádi J. Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-1113 Budapest, Hungary. Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting

- protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286(39):34088-100 2011, IF: 5,328
- Oláh J, Zotter A, Hlavanda E, Szunyogh S, Orosz F, Szigeti K, Fidy J, Ovádi J. Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, H-1113 Budapest, Hungary. Microtubule assembly-derived by dimerization of TPPP/p25. Evaluation of thermodynamic parameters for multiple equilibrium system from ITC data. *Biochim Biophys Acta* 1820(7):785-94 2012, IF: 4,733
- Orbán E, Manea M, Marquadt A, Bánóczy Z, Csík G, Fellingner E, Bosze S, Hudecz F. Research Group of Peptide Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary. A new daunomycin-peptide conjugate: synthesis, characterization and the effect on the protein expression profile of HL-60 cells in vitro. *Bioconjug Chem* 22(10):2154-65 2011, IF: 5,002
- Pécsi I, Szabó JE, Adams SD, Simon I, Sellers JR, Vértessy BG, Tóth J. Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-1113, Budapest, Karolina út 29., Hungary. Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(35):14437-42 2011, IF: 9,432
- Sági B, Maraghechi P, Urbán VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Német K, Monostori E, Gócza E, Uher F. National Blood Service, Stem Cell Biology Unit, Budapest, Hungary. Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev* 21(5):814-28 2012, IF: 7,871
- Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csosz É, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98, Debrecen H-4032, Hungary. A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(2):431-6 2012, IF: 9,432
- Szántó M, Rutkai I, Hegedus C, Czikora Á, Rózsahegyi M, Kiss B, Virág L, Gergely P, Tóth A, Bai P. Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98. Pf. 7, H-4032 Debrecen, Hungary. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovasc Res* 92(3):430-8 2011, IF: 6,051
- Vincze O, Oláh J, Zádori D, Klivényi P, Vecsei L, Ovádi J. Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. A new myelin protein, TPPP/p25, reduced in demyelinated lesions is enriched in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 409(1):137-41 2011, IF: 2,595
- Zotter Á, Oláh J, Hlavanda E, Bodor A, Perczel A, Szigeti K, Fidy J, Ovádi J. Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-1113 Budapest, Hungary. Zn²⁺-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry*. 50(44):9568-78 2011, IF: 3,226
- Zotter A, Bodor A, Oláh J, Hlavanda E, Orosz F, Perczel A, Ovádi J. Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-1113 Budapest, Hungary. Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg²⁺-dependent GTPase activity. *FEBS Letters* 585(5):803-8 2011, IF: 3,541

ALGÁK A FEHÉR BIOTECHNOLÓGIÁBAN

Kiss Bernadett, Németh Áron, Sevella Béla
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Összefoglaló

A világ üzemanyag szükségletének dinamikus növekedése és a fosszilis üzemanyagkészlet kimerülésének állandó fenyegetése elősegítette az alternatív üzemanyagok előállításának rohamos fejlődését. Egyik téma, amely központi figyelmet kapott az utóbbi évtizedekben, a növényi olajokból előállítható biodízel. A mikroalgák előkelő helyet kapnak a biodízel gazdaságos előállítását célzó kutatásokban, ugyanakkor számos egyéb felhasználási lehetőségük van a mezőgazdaságban, kozmetikai iparban, az élelmiszeriparban és a szennyvíztisztítási technológiákban egyaránt. Jelen összeállításunkban erről a komplex kérdéskörrel szándékozunk vázlatos áttekintést adni.

Bevezetés

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik a fehér biotechnológia „platform-alkotó” vegyületeinek előállításával, felhasználásával. Ezen a területen „platform-alkotó” kifejezéssel azon molekulákat illetik, amelyek (vegy)ipari potenciállal rendelkező származékok egész sorával (készletével, azaz platformmal) rendelkeznek. Ezek analógiájára célul tűztük ki a széles körben használható „platform”-enzimek kutatását. Ugyancsak előtérbe kerültek a „platform”-mikroorganizmusok is, mint például az algák, amelyek hatalmas potenciállal rendelkeznek többek között biofinomítóban történő hasznosításhoz. Számos területen való felhasználhatóságuk (biodízel előállítás, gyógyszeripar, kozmetikai ipar, mezőgazdaság, élelmiszeripar, szennyvíztisztítás), továbbá biológiai előállításuk miatt tartjuk őket alkalmasnak biofinomítóban történő előállításra és felhasználásra. Ennek okán kutatásaink fókuszában állnak a mikroalga fermentációk, amelyek elsődleges célja a hatékony alga-biomassza előállítás megvalósítása. Ehhez szükséges előbb laboratóriumi léptékben, a későbbiekben pedig kísérleti üzemi léptékben meghatározni azokat a legfontosabb paramétereket, amelyek meghatározzák a biomassza hozamot [1-2].

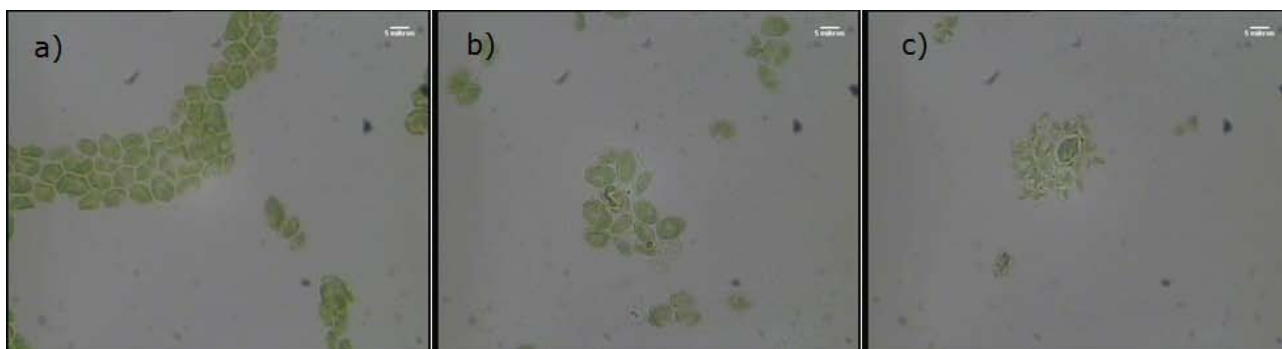
Algák

Az algák olyan fotoszintetikus élőlények, amelyek valódi gyökérrel, szárral, levéllel és virággal nem rendelkeznek. Méretük igen változatos, a néhány μm -es, bakteriális méretű, szabadon úszó sejtektől egészen a több méteres, növény-szerű társulásokig. Korábban az algákat méretük szerint (nem taxonómiailag) mikro- és makroalgákra osztották. A makroalgák nagyobb méretűek, az aljzathoz rögzülve nőnek, szabad szemmel is jól láthatóak (1. ábra). Idetartoznak a vörös-, barna- és zöldmoszatok.



1. ábra. Makroalgák [27].

A mikroalgák ezzel szemben kisméretűek (2. ábra), általában egyedül vagy kisebb sejtcsoportokban úszva élnek [3-7].



2. ábra. Kutatócsoportunk által fenntartott mikroalgák mikrosztópos képe 1000-szeres nagyításban: a) *Chlorella vulgaris* tihanyi izolátum, b) *Chlorella vulgaris* hamburgi izolátum, c) *Nannochloropsis* sp.

Az utóbbi évek kutatásai alapján az evolúciós elágazások rekonstruálásával és proteomikai, illetve filogenetikai alapon próbálják besorolni az algákat különböző taxonómiai csoportokba, figyelembe véve a morfológiát, az ultrastruktúrát, valamint a genetikai állományt. Egybehangzó vélemény még nem alakult ki pontos besorolásukat illetően [2]. A mikro- és makroalgákra történő felosztás mellett prokarióta és eukarióta szempontból is megkülönböztetik őket, ami jelzi a sejtszerkezetbeli jelentős különbségeket e két csoport között, és alapvetően befolyásolja a felhasználási lehetőségeket.

A jó termelési k hozataluk, gazdag aminosav, vitamin és ásványi anyag tartalmuk helyezi az algákat előtérbe más ipari mikrobákkal, illetve növényekkel szemben. Hektáronkénti olajtermelő kapacitásuk jóval nagyobb (58.700 l/ha), mint más szárazföldön termelt haszonnövényé (kukorica:172 szója:446, pálma:5950 l/ha) [1].

Kozmetikumok

Jelentős igény tapasztalható a tengeri élőlényekből készített termékek iránt a bennük lévő vitaminok, antioxidánsok és olajok miatt a kozmetikumok piacán is. Felhasználják őket szappanok, testápolók, krémek, arc maszkok, pakolások, bőrtisztítók készítésénél. A *Chlorella vulgaris* (*Trebuxiophyceae*, eukarióta, mikroalga) fajból előállított termékek ránctalanító hatása is ismert, mivel elősegítik a kollagén termelését a bőrben, ezáltal serkentve annak regenerálódását, hidratálódását [8-10].

Élelmiszeripar

Táplálkozási szempontból jelentős az algák esszenciális aminosav, fehérje, vitamin, zsírsav, antioxidáns és rost tartalma. Makro méretű képviselőiket régóta használják salátaként nyersen fogyasztva. Egyes fajok, mint például a *Gracilaria sp.* (*G. domingensis*, *G. birdiae*)(*Rhodophyta*, eukarióta) és a *Laurenica sp.* (*L. filiformis*, *L. intricata*)(*Rhodophyta*, eukarióta) igen gazdagok többszörösen telítetlen omega-3 és omega-6 zsírsavakban, valamint megfelelő proteinforrások a magas fehérje, illetve esszenciális aminosav tartalmuk miatt. A *Sargassum vulgare* (*Phaeophyceae*, eukarióta, makroalga) fajt esszenciális aminosav tartalma miatt fogyasztják előszeretettel a keleti országokban. Napjainkban egyre elterjedtebbé válik a mikroalgák étrend kiegészítő kapszulaként való fogyasztása (*Spirulina* (*Cyanophyceae*, mikroalga), *Chlorella*) és természetes étel színezőként történő használata [11-15].

Mezőgazdasági felhasználás

Az állati takarmányozásnál - hasonlóan az emberi táplálkozáshoz - fontos szerepet játszanak az ásványi anyagok, aminosavak, fehérjék, melyek mind megtalálhatóak az algákban. A szójafehérjéhez képest az algák esszenciális aminosav (metionin, treonin, valin, hisztidin) tartalma magasabb, valamint egyéb amino-karbonsavak, illetve -amidok is megtalálhatóak bennük, pl. *Enteromorpha* (*Ulvophyceae*, eukarióta) esetén: szerin, aszparagin, glutamin, alanin, prolin, tirozin. Felhasználásuk történhet közvetlen etetéssel vagy a takarmányba kiegészítőként keverve.

A mezőgazdaság további területein is felhasználják az algákat. Egyrészt szerves trágyaként a szántóföldekre kiszórva, kiegészítve a szervesetlen műtrágyákat, ezzel csökkentve azok felhasznált mennyiségét, valamint egyre elterjedtebb hazánkban is a lombtrágyázás alkalmazása. Ez elősegíti a növények ellenálló képességének kialakulását, jobb terméshozamok érhetőek el a használatával. Mérések szerint növekedett a hasznos nyomelem tartalom a termékekben azokhoz viszonyítva, amelyeken nem használtak alga kivonatot tartalmazó lombtrágyát [14,16-20].

Gyógyszeripar

Bioaktív anyagaik révén előszeretettel alkalmazzák az algákat a gyógyszer előállításokban is. Klorofill tartalmuk miatt (főként *Chlorella vulgaris* fajt) fekély kezelésére alkalmas krémekbe keverik, elősegítve a bőr regenerálódását. Koreában a népi gyógyászatban már régóta használnak terápiás kezelésre alga

készítményeket. Az új gyógyszeripari alga kutatások számos bioaktív anyag felfedezését tették lehetővé, melyek új gyógyszerek kifejlesztését segíthetik elő az elkövetkezendő években. Antiallergén hatásuk mellet a kutatók vérnyomás csökkentő (*Ecklonia stolonifera*: florofukofuroekol-A, dieckol), rák megelőző, gyulladásgátló (*Ulva laetuea*: 3-O- β -D-glükopiranozil-sztigmaszta-5,25-dién) és elhízás ellenes hatásokat tulajdonítanak az algáknak [23-24].

Környezetvédelem (szennyvíztisztítás, CO₂ felhasználás)

Környezetvédelmi fontosságuk és alkalmazhatóságuk abban nyilvánul meg, hogy képesek kis molekulatömegű elemeket és ionokat felvenni, mint például nehézfémeket és foszfort, illetve nitrogént elnyelni. További nagyon jelentős felhasználási terület lehet a gyárak/erőművek által kibocsátott szén-dioxid megkötése és abból hasznos biomassza tömeg előállítás.

Ipari szennyvizek és kommunális szennyvizek tisztításában is használnak algákat. Előbbinél kitüntetett szerepük van a nehézfémek eltávolításában, utóbbinál a degradáció javításában, a CO₂ egyensúly beállításában és a baktériumok oxigén ellátásában [25-26].

Kihívások az alga biomassza előállításban

Az algák növekedéséhez nem szükséges összetett tápközeg, néhány esetben elegendő a tengervizet kiegészíteni szerves nitrogén (pl. műtrágya) és foszfor forrással, valamint néhány mikro mennyiségben szükséges tápkomponenssel. A tenyésztés a makroalgák esetében lehet tengervízben, az erőművek által termelt szén-dioxidot felhasználva szerves szénforrásként. A mikroalgáknál viszont előnyösebb az úgynevezett Raceway tavak és fotobioreaktorok használata. Egyik legnagyobb üzem, amely Raceway tó kialakítást használ, az Earthrise Spirullina farmja Kaliforniában. 108 hektáron, 30 tóban tenyésztenek mikroalgát élelmiszeripari célra. A kivitelezés lehet betonozott, földbe vajt, esetleg fehér fóliával bélelt recirkuláltatott csatorna rendszer.

Ezzel ellentétben a fotobioreaktorok egy zárt csőrendszert alkotnak. A csőátmérő fontos szempont a fény hasznosulásánál, mivel annak behatolása a biomassza tömegbe fontos tényező a növekedésnél. Mivel zárt a rendszer, így a nappali órákban szükséges hűtést alkalmazni, hogy az ideális 20-30 °C közötti hőmérséklet fenntartható legyen, valamint a gázvezetést gáztalanítók beszerelésével kell megoldani. Azonos CO₂ felhasználás mellett összehasonlították a két szárazföldi termelést. Mind volumetrikus termelékenységben (fotobioreaktorok: 1,535 kg/m³d; Raceway tavak: 0,117 kg/m³d), mind területi termelékenységben (fotobioreaktor: 0,048 kg/m²d; Raceway tavak: 0,035 kg/m²d) a fotobioreaktorok tűnnek hatékonyabbnak, de egyúttal költségesebbnek is [1,28].

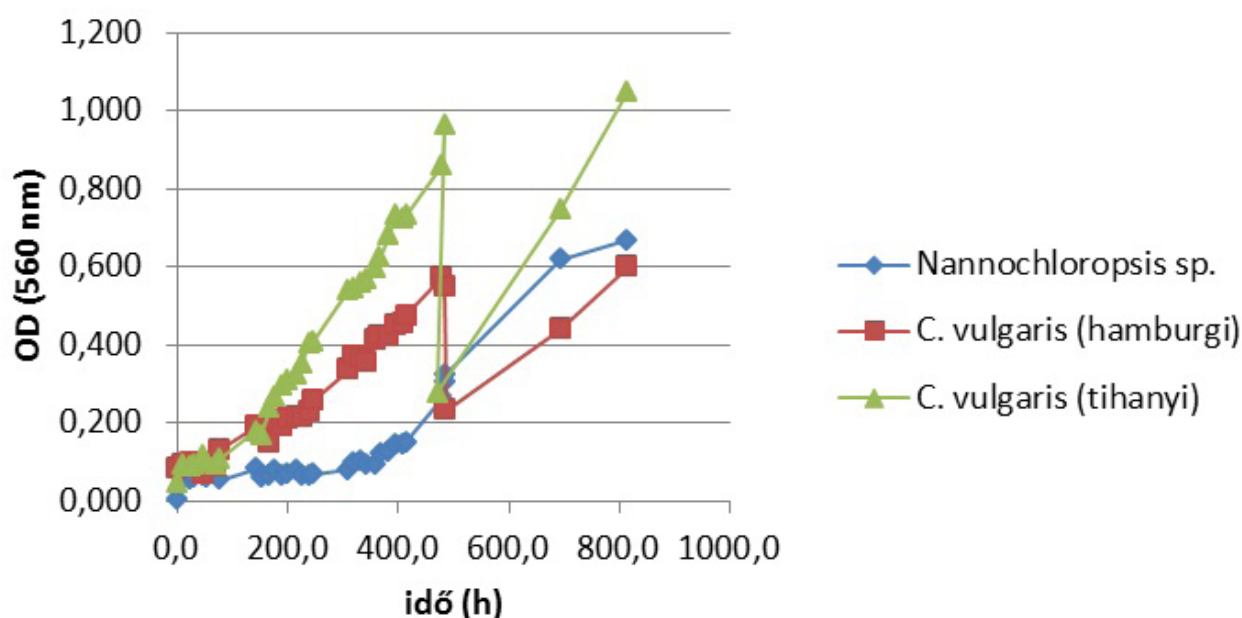
Kísérleteink és terveink

Az előbbi összefoglalóból jól látszik, hogy biomassza tömegük számos fontos ipari területen felhasználható, ezért tűztük ki célul a hatékony, jól hasznosítható algák előállítását. Ennek okán beszereztünk 4, gyakran alkalmazott alga törzset: egy *Nannochloropsis sp.*-t és három *Chlorella sp.*-t. Céljaink közt szerepel a

gyűjtemény kibővítése egyéb, iparban használatos fajokkal, például *Spirulina* törzsekkel is.

Összehasonlító kísérleteket a *Nannochloropsis* fajjal, valamint két *Chlorella vulgaris* fajjal (tihanyi és hamburgi izolátum) végeztünk és a növekedésüket vizsgáltuk üvegtestű asztali bioreaktorokban (B. Braun Biostat Q). A felvett növekedési görbék alapján fajlagos szaporodási sebességeket határoztunk meg (3. ábra). Ez alapján a további vizsgálatokat a tihanyi izolátummal tervezzük, mivel az jóval gyorsabban szaporodott a másik kettőhöz képest és a biomassza végtitere is közel duplája lett (*Nannochloropsis* sp.: 0,21 g/L, *Chlorella vulgaris* (hamburgi): 0,23 g/L, *Chlorella vulgaris* (tihanyi): 0,37 g/L).

Összehasonlító fermentációk



3. ábra. Mikroalga fermentációk összehasonlítása. Spektrofotométerrel 560 nm-nél mért optikai denzitás mérések eredményei.

A nagyobb sejttömeg elérése érdekében atmoszférikus változtatások vizsgálatát tervezzük CO₂ adagolás és a levegőztetés térfogatáramának változtatásával. Heterotróf vizsgálatok mellett mixotróf kísérletek elvégzését is ígéretesnek tartjuk, mely esetben a heterotróf és az autotróf növekedési formák előnyei kombinálhatóak. Terveink között szerepel még a beltartalom (olaj, vitamin) meghatározása a nálunk fenntartott törzsekből és tartalmi változásuk vizsgálata az eltérő kísérleti körülmények között.

Összegzés

A felsorolt számos példa jól illusztrálja az algák széleskörű alkalmazási lehetőségeit. Ezek indokolják, hogy mint „platform élőlényt” a fehér biotechnológiai kutatásaink keretein belül tanulmányozzuk és az alga előállítás hatékonyságát

fejlesszük. A szerteágazó platform miatt a biofinomító-koncepcióba történő bevonásuk is megvalósíthatónak tűnik, hiszen ha a feldolgozási műveleteket megfelelő sorrendben végezzük, akkor egy maradéktalanul hasznosítható, jól frakcionált termékspektrumot lehet előállítani, miközben a technológiához szükséges energiát is részben vagy egészben szolgáltatja.

Irodalomjegyzék

- [1] Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**: 294–306.
- [2] Day, J.G., Slocombe, S.P., Stanley, M.S. (2012) Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresource Technology* **109**: 245–251.
- [3] Pröschold, T., Leliaert, F. (2007) [Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics](#). In: Systematic of the green algae: conflict of classic and modern approaches (Brodie, J., Lewis, J., Ed.)(CRC Press Taylor & Francis Group, London) pp. 123-153.
- [4] Bhattacharya, D., Medlin, L. (1998) Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants, *Plant Physiol* **116**: 9–15.
- [5] van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. (1995) *Algae, an introduction to phycology*. (Cambridge University Press, Cambridge) pp. 1-41.
- [6] <http://www.slideshare.net/nataliepopik/algae-book>
- [7] <http://www.reference.com/browse/algae>
- [8] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 87–96.
- [9] <http://www.alga-net.com/cosmetics/cosmetics.htm>
- [10] <http://www.alga-net.com/seavegetables/spirulina.htm>
- [11] Imhoff, J. F., Labes, A., Wiese, J. (2011) Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances* **29**: 468–482.
- [12] Gressler, V., Yokoya, N.S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Filho, J. M., Torres, R. P., Pinto, E. (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry* **120**: 585–590.
- [13] Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* **19**: 31-39.
- [14] Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K. (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 1037–1047.
- [15] <http://www.balintcseppek.hu/a-honap-gyogynovenye.html>
- [16] http://egeszsegbolt.unas.hu/spd/unas_983912/Spirulina_alga_kapszula_360_db_sb
- [17] <http://spirulina-chlorella.biomax.hu/>
- [18] Víg, R., Dobos, A., Molnár, K., Nagy, J. (2010) Természetes alapú lombtrágyák hatékonysága szabadföldi kísérletekben: Kukorica (*Zea Mays* L.) *Növénytermelés* **59**: 89–105.
- [19] Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Shukla, M.K., Mishra, S., Srivastava, S., Singh, R., Rai, U.N., Gupta, D.K. (2008) Role of blue green algae biofertilizer in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Chemosphere* **70**: 1919–1929.

- [20] Aguilera-Moralesa, M., Casas-Valdeza, M., Carrillo-Dominguez, S., Gonzalez-Acosta, B., Perez-Gil, F. (2005) Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 79–88.
- [21] <http://www.alga-net.com/industry/fertilizers.htm>
- [22] <http://naturah.hu/index-2.html>
- [23] Voa, T.-S., Ngoa, D.-H., Kim, S.-K. (2012) Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochemistry* **47**: 386–394.
- [24] El Gamal, A.A. (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* **18**: 1–25.
- [25] Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M. (2012) Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**: 3043–3053.
- [26] Stewart, C., Hessami, M.-A. (2005) A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Conversion and Management* **46**: 403–420.
- [27] <http://open-reef.com/phpbb/viewtopic.php?f=4&t=22>
- [28] <http://www.earthrise.com/farm.html>



Kiss Bernadett 5. éves (2. éves MSc) hallgató a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki karán, biomérnök szakon, alkalmazott biotechnológia szakirányon. A témával a BME Kutató Egyetemi pályázatának keretein belül közel 2 éve foglalkozik.



Németh Áron 2002-ben végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki karán mint biomérnök, ipari biotechnológia szakirányon. 2008-ban szerzett PhD fokozatot, majd előbb tanársegédként, jelenleg pedig adjunktusként dolgozik a Fermentációs Kísérleti Üzemi kutató csoportban (F-labor). Főbb kutatási területei: mikrobiális és enzimes folyamatok vizsgálata, fermentációs technológiák kifejlesztése.



Sevella Béla vegyészmérnök, 1970 óta a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának oktatója, a tudomány kandidátusa, 1993 óta habilitált professzor és a Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék tanszékvezetője 2007-ig, továbbá a fermentációs kutató csoport vezetője. Főbb kutatási területei: fermentációs technológiák fejlesztése, optimalítása, fermentációs rendszerek kinetikai, anyagátadási folyamatainak vizsgálata. Az általa vezetett iskolából graduális vegyészmérnökök és biomérnökök százai kerültek ki, több egyetemi doktori és kandidátusi, illetve PhD disszertáció készült irányítása alatt, jelenleg is aktív PhD témavezető.



BESZÁMOLÓ A FEBS 3+ KONFERENCIÁRÓL

Nagy sikerrel zajlott le a horvát, a szlovén és a magyar biokémiai egyesületek első közös nemzetközi konferenciája, ami egyben a rendező országok éves konferenciája is volt, és a FEBS3+ program keretében elnyert pályázat támogatásával valósult meg. A több mint 300 résztvevő gyönyörű környezetben, a méltán híres Opatijában (Abbázia), az Adria kék vizében és a mediterrán növényekben gyönyörködve ismerhette meg egymás munkáját és építhetett ki együttműködéseket. Feltűnően sok fiatal vett részt, amit a FEBS az anyaországok egyesületein keresztül kiosztott utazási támogatással ösztönzött. Az MBKE 15 fiatalnak adott úti támogatást, akiket 44 pályázóból választott ki az IB alapos mérlegelés után. A FEBS Science and Society Committee két előadást szponzorált: „*What it takes to succeed in science – and how Europe’s institutions could help*” (Gottfried Schatz, Svájc) és „*Genetically modified plants – are they useful and safe?*” (Jacques-Henry Weil, Franciaország). A FEBS aktivitását Prof. Israel Pecht főtitkár ismertette Jerka Dumic horvát főszervező megnyitója után, ahol a szervezők a résztvevő nemzetek dalait is megszólaltató műsorszámmal is kedveskedtek.

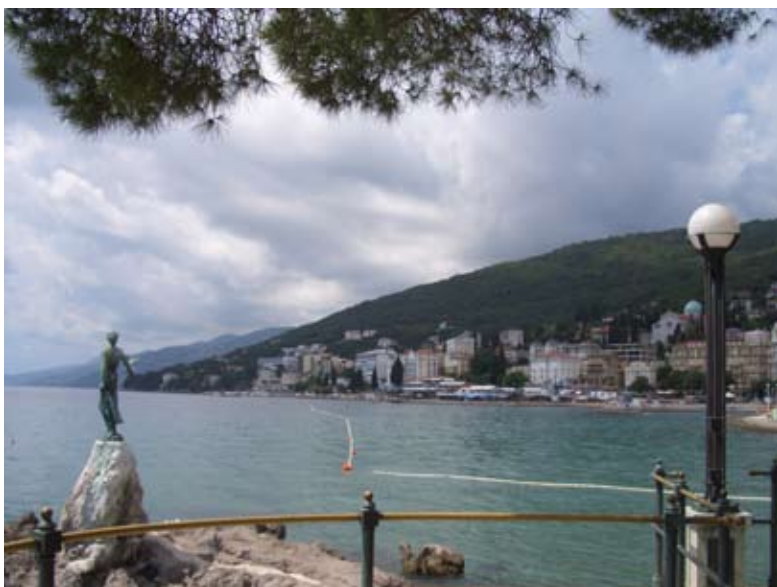
A konferencia nyitó előadását Ada Yonath (Izrael) tartotta, aki két társával együtt kapott Nobel díjat 2009-ben a riboszóma térszerkezetének és működésének feltárásáért. Plenáris előadást tartott még Kai Simons (Németország), Josef Jiricny (Svájc) és Sandra Orsulic (USA). A tudományos program igyekezett lefedni a biokémia és molekuláris biológia mindazon területeit, melyeken a három ország kutatócsoportjai nemzetközi színvonalú eredményeket mutatnak fel. 35 tudományos előadás (meghívásos alapon) és 43 rövid (10 perces) előadás hangzott el - utóbbi főként a benyújtott absztraktok alapján kiválasztott fiatal tudósok előadásában - a következő szekciókban: *Structure and Function of Proteins, Membrane Structure and Function, Cancer Biochemistry, Molecular Interaction and Communication, Lipidomics, Immunity and Inflammation, Transporters, Molecular Signaling, Molecular Basis of Disease and Therapy, Plant Biochemistry, System Biology and Informatics, Metabolism, Genomics, Regulation of Gene Expression*. Az előadások mellett a résztvevők mintegy 150 posztert tekinthettek meg, ami szintén kiváló lehetőséget nyújtott a fiatalok eredményeinek megvitatására szélesebb szakmai közönség előtt. A kiállítási csarnokban különböző cégek mutatták be termékeiket.



A konferencia keretein belül került átadásra a magyar Bio-Science Kft. által meghirdetett, az elmúlt év legjobb molekuláris biológiai témájú közleményének szerzője/szerzői részére kiírt díj, amelyet Csépanyi-Kömi Rolandnak (SOTE Élettani Intézet, Budapest) ítelt egyhangú szavazás alapján az MBKE IB. A díjazott didaktikus előadást tartott „*ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutophilic granulocytes*” címen. A beérkezett pályaművek listáját lásd külön írásunkban.

Élményekben gazdag utazást tehettek a résztvevők nemcsak „**From molecules to life and back**”, hanem a péntek délutáni isztriai kirándulás keretében is, ahol a vidék látni-valóival, kultúrájával és kulináris élvezeteivel is megismerkedhettünk. A banketten kiváló

helyi zenekar és a táncos lábú, rendkívül barátságos horvát szervezőcsapat biztosította az emelkedett hangulatot és hajnalig tartó közös vigadást.



Mintaszerűen megrendezett konferencia, tartalmas programok, baráti légkör - mindez gyönyörű környezetben, nyári időszakban... Köszönjük a horvát szervezőknek a sok munkát, reméljük, lesz folytatás akár Opatijában, akár máshol! A konferencián készült fotók megtekinthetők [az egyesület honlapján](#).

Szűcs Mária
a **Biokémia újság**
főszerkesztője

„GYÓGYSZERKUTATÁS ÉS FEJLESZTÉS MAGYARORSZÁGON 2012”

Magyar Biokémiai Egyesület Gyógyszerbiokémiai Szakosztály
MAGYOSZ Innovatív Gyógyszerek Kutatására Irányuló
Nemzeti Technológia Platform

Balatonöszöd
2012. május 21-22.

Összefoglaló

A globális gyógyszeripari kutatás-fejlesztés jelenleg komoly válságban van. Az általános gazdasági recesszió hatásaként világszerte leépítések tapasztalhatók a gyógyszeripari vállalkozások K+F tevékenysége területén. Ez a trend természetesen érvényes az EU-ra és ezen belül hazánkra is. Az utóbbi években felgyorsult a hazai gyógyszeripari K+F kapacitások leépítése.

Itthon a hazai trendek mögött a Munkaértekezlet több tényezőt definiált, melyek egyidejűleg hatnak:

- a társadalombiztosítások költségvetése elérte az országok teljesítőképességének határát
- az egészségbiztosítás rendszere globális kihívásokkal kell szembenézzen: elöregedő
- társadalmak alacsony reprodukcióval
- a gyógyszerkutatás eddigi üzleti modellje (blockbuster) fenntarthatatlan
- a generikus nyomás kiszorítja a szereplőket a piacokról és a validált célpontokról
- a gyógyszerkutatás XX. századi tudományos paradigmái megkérdőjeleződtek

Ezen trendek nyomán a Munkaértekezlet szerint az alábbi, a gyógyszerkutatást-és fejlesztést égető problémák várnak megoldásra(konszenzus pontok):

- Együttműködés hiánya
 - Egyetemek között
 - Akadémia-ipar között
 - Nemzetközi téren (pl. EU projektek)
 - Ipar-KKV között
 - KKV-k egymás között (!)
- Kiszámíthatatlanság
 - Gazdasági feltételrendszer gyakori változása
 - Jogi szabályozás gyakori változása
 - Pályázati rendszer
 - Változó koncepció
 - Változó finanszírozási elvek, magas önrész
 - A gyógyszerkutatás számára rövid pályázati ciklusok
 - Bürokratikus ügyintézés
 - „Megélhetési” pályázatok nincsenek kiszűrve (kontroll). Ez szőkíti az etikusan viselkedő pályázók lehetőségeit, forrásait

- Oktatás
 - Gyógyszeriparra célzott oktatás hiánya
 - Manager/ÜF kompetenciahiány
 - Nyelvtudás még mindig gyenge
- Jövőkép
 - Stratégiai tervezés általában hiányzik
 - Személyes jövőkép hiánya, etikai, értékrendi problémák az utánpótlásnál
- Pénzügyi – pályázati problémák
 - Piac alapú kutatásfinanszírozás hiánya
 - Kockázat megértés és kezelés hiánya
 - Általános tőkehiány
 - Ágazati elvonások
 - Az Open Innovation itthon inkább csak PR mint valóság

Továbbá:

- Kevés a jó minőségű projekt
- Kritikus tömeg továbbra sincs meg a vállalkozások többségénél
- A Széll Kálmán 2.0 verzió általános gyógyszeripari feltételrendszere kihatásaiban szőkíti a gyógyszeripari K+F+I finanszírozási lehetőségét (lásd: elvonások, árszabályozás stb.)
- Az egyetemi technológiai transzfer irodák tevékenysége még mindig nem optimális

A főbb megoldási javaslatok között (konszenzus pontok) szerepeltek:

- Helyes önismereti szemlélet erősítése és fókusz a felismert erisségekre
- Együtműködések bővítése (hazai és nemzetközi projektbe történő integráció) részben rásegítő pályázati források révén, networking
- Nyílt innováció szemléletének (együtműködés, jogok és eredmények megosztása) és gyakorlatának terjesztése
- Acélzott, gyógyszeriparnak megfelelő képzési formák (szak- és managerképzés) és pályázati lehetőségek kialakítása, a szakkompetenciák kidolgozása
- Működő tőke intenzív bevonása, egyedi finanszírozási megoldások (pénzügyi szektor),
- bátrabb saját kockázatvállalás
- A transzferirodák működési hatékonyságának fokozása
- Hazai pályán működő vállalkozások állami (rész)támogatása
- „Gyógyszerkutatási Köztanács” létrehozása
- Gyógyszer/Transzlációs Kutatási Intézet felállítása (PPP projekt formában)

Dr. Keserű György

MBKE

Gyógyszerbiokémiai Szakosztály

Elnök

Dr. Vas Ádám

MAGYOSZ

Tudományos és Műszaki Bizottság

Elnök

EGY HÉTEN ÁT SZEGED A NOBEL-DÍJASOK VÁROSA VOLT

Mottó: „Az első generáció felejt, a második elfelejt, a harmadiknak már eszébe sem jut...”

(Sándor György humoralista)

A Szegedi Tudományegyetem, különösen annak Orvostudományi Kara az elmúlt évben sokat tett azért, hogy Sándor György fenti, borús jóslata nehegy valósággá váljék, amikor Szent-Györgyi Albert, az egyetem egykori rektora 1937-ben elnyert orvosi-élettani Nobel-díjának 75 éves évfordulójára számos Nobel-díjas részvételével rendezett konferencia csokorral emlékezett.

Közös elhatározással, az anyagi és szellemi források egyesítésével, az évente Szegeden szokásos 5-6 nemzetközi konferencia összevonásával, olyan méretű és súlyú orvos-biológiai konferencia családot szervezett 2012. március 22 és 25 között, mely elérte, meghaladta azt a kritikus tömeget, amely köré keretként sikerrel lehetett meghívni kilenc Nobel-díjas tudóst.

A rész konferenciák önmagukban is jelentős eseményei voltak a nemzetközi kardiológia, gasztroenterológia, immunológia és gyulladás, molekuláris biológia és genetika, idegtudományok, valamint a tuberkulózis kutatók közösségeinek. A meghívott és a meghívást elfogadó Nobel-díjasok, a díj elnyerésének időrendi sorrendjében:

Andrew V. Schally, élettani és orvostudományi Nobel-díj 1977, az agy peptidhormon termelésének megismeréséért,

Robert Huber kémiai Nobel-díj 1988, a fotoszintézis reakció centrum háromdimenziós szerkezetének megismeréséért,

Bert Sakmann élettani és orvostudományi Nobel-díj 1991, a sejtek egyes ioncsatornáinak funkcionális jellemzéséért,

Eric Wieschaus élettani és orvostudományi Nobel-díj 1995, a korai embrionális fejlődés genetikai szabályozásának megismeréséért,

Peter C. Doherty élettani és orvostudományi Nobel-díj 1996, a sejtközvetített immunvédelem specifikálásának leírásáért,

John E. Walker kémiai Nobel-díj 1997, az ATP szintézis enzim mechanizmusának feltárásáért,

Tim Hunt élettani és orvostudományi Nobel-díj 2001, a sejtciklus szabályozás kulcslépéseinek leírásáért,

Aaron Ciechanover kémiai Nobel-díj 2004, az ubikvitin mediált fehérje lebontás felfedezéséért,

Ada E. Yonath kémiai Nobel-díj 2009, a riboszómák szerkezetének és funkciójának megismeréséért.

A konferencia résztvevői meggyőződhetnek arról, hogy a Nobel-díjas meghívottak milyen nagy respekttal viseltetnek Szent-Györgyi Albert szakmai eredményei mellett emberi kvalitásai, polgári helytállása, példamutató társadalmi felelősségvállalása iránt.

Fontos eleme volt a konferenciának, amikor 600, korábbi tanulmányi eredményei alapján kiválogatott középiskolás Szegedről, a Dél-Alföldről és a határon túli délvideki iskolákból nyílt fórumon találkozhatott a Nobel-díjasokkal, akik közvetlen, jó hangulatú beszélgetés keretében, olykor egymással is vitába szállva cseréltek gondolatot a fiatalok tudományos, kutatói érdeklődésének felébresztéséről, a tehetségek megtartásáról és a tudósok szerepéről a modern társadalmakban. Többen a vendégek közül a konferencia előtti vagy utáni napokban szegedi középiskolákban tartottak előadásokat, szakköri foglalkozásokat, valószínűleg életre szóló élményt nyújtva a természettudományok iránt érdeklődő diákoknak. A konferencia csokrot színvonalas kiállítások, kulturális, társasági, kulináris és borászati rendezvények, bemutatók kísérték, melyek a sajtó kiemelkedő érdeklődése, korrekt tájékoztatása révén hozzájárultak a Szegedi Tudományegyetem, Szeged és Magyarország pozitív bemutatásához, oktatási nevelési célkitűzéseink sikeres megvalósításához.

Dr. Dux László
Tanszékvezető egyetemi tanár
SZTE ÁOK Biokémiai Intézet
Szeged

42. MEMBRÁN-TRANSZPORT KONFERENCIA, SÜMEG

A konferencia idén május 15-18. között került megrendezésre, a hagyományoknak megfelelően Sümegen. Az idei találkozó abból a szempontból volt különleges, hogy az első tudományos összejövetel megszervezésére éppen 40 évvel ezelőtt, 1972-ben került sor. Ennek szellemében a konferencia nyitónapján Prof. Somogyi János, a választmány örökös tiszteletbeli elnöke tartott előadást „40 éve az interdiszciplinaritás szolgálatában” címmel.

Ezt követően került sor a Romhányi és Kovács Tibor díjak átadására. Az idei Romhányi díjas Németh Péter volt (Pécsi Tudományegyetem KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs) aki „*Molekuláris kölcsönhatások a biológiai szabályozásban*” címmel tartott előadást. Ezután a két Kovács Tibor díjas következett: Margittai Éva (Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest) „*Hidrogén-peroxid, egy prooxidáns az oxidatív fehérje tekeredésben*”, illetve Lizák Beáta (Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet, Budapest) „*Minőségellenőrzés az endoplazmás retikulumban*” címmel tartottak előadást.

A további előadások hat szekcióban zajlottak: jelátvitel, ioncsatornák, membránlipidek és szignalizáció, citoskeleton és sejtmembrán, apoptózis és mitokondrium, valamint modern membránbiofizikai vizsgáló módszerek témakörökben, 29 hazai kutató prezentálásában. A témák sokoldalúsága biztosította azt, hogy a hagyományoknak megfelelően a membrán-transzport konferencia a sejtbiofizika, biofizika, élettan, biokémia és molekuláris biológia interdiszciplináris seregszemléje legyen. Igen örömdetes volt a Ph.D. hallgatók és a tudományos diákkörös hallgatók részvétele is a konferencián, akik baráti légkörben vitathatták meg eredményeiket a szakma jeles képviselőivel. A konferenciának ez utóbbi erényét mindenképp érdemes kiemelni, a meglehetősen személytelené váló gigantikus konferenciákhoz képest felüdülést jelent egy kisebb méretű, szakmai eszmecserékre és kapcsolatok építésére alkalmasabbnak tűnő összejövetel. Az előadások utáni élénk viták híven tükrözték a tudomány sokoldalúságát és a kritikus gondolkodás szükségességét hangsúlyozták és mutatták be a fiatal kollegák számára.

A fiatal kutatók szerdán és csütörtökön a poszter szekcióban mutakozhattak be. A szenior kutatókból álló poszter zsűri javaslata alapján a legjobb posztereket ebben az évben Bartók Ádám (Debreceni Egyetem OEC), Boldizsár Ferenc (Pécsi Tudományegyetem KK), Boratkó Anita (Debreceni Egyetem OEC), Keller-Pintér Anikó (Szegedi Tudományegyetem), Kolozsvári Bernadett (Debreceni Egyetem OEC), Pribér János (Pécsi Tudományegyetem ÁOK) Sipos Adrienn (Debreceni Egyetem OEC), valamint Tóth József (Semmelweis Egyetem) mutatták be. A több mint 80 poszter közül kiválasztott nyertes posztereket előadás formájában is prezentálták a szerzők közvetlenül a konferencia zárása előtt. Az előadásra történő felkészülésre hagyott rövid idő ellenére színvonalas előadásokat hallhattunk, mindenki meglegedésére.

A tudományos programon kívül természetesen a membrán-transzport konfe-

renciák vonzereje a helyszínt adó Hotel Kapitány és a kapcsolódó egyedi programok, például a Sümegi Várjátékok. A több mint 200 regisztrált résztvevő jó hangulatban, kötetlenül beszélgethetett a középkori lakoma vagy a mini borfesztivál során. E programok feltételét a szponzorok biztosították, sikeres megszervezésüket pedig a Remedicon Kft. és a Hotel Kapitány személyzete végezte hibátlanul.

A szervezők nevében:

Panyi György
egyetemi tanár
DE ÁOK Biofizika és Sejtbiológiai Intézet

BESZÁMOLÓ A PEPTIDKÉMIAI MUNKABIZOTTSÁG 2012. ÉVI ÜLÉSÉRŐL

Az MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Tudományos Bizottság keretében működő Peptidkémiai Munkabizottság immár hagyományosan Balatonszemesen a Richter Gedeon NyRt. üdülőjében tartotta éves ülését május 30. és június 1. között. A közel 80 résztvevő 42 előadást hallgathatott meg, amelyek bemutatták a hazai peptid- és fehérjekutatás legfrissebb eredményeit.

Az előadások olyan fontos betegségek diagnosztikai és terápiás lehetőségeit érintették, mint a rák, az autoimmun betegségek és az Alzheimer-kór. Számos előadás hangzott el a célzott tumorterápiával kapcsolatban, amelyre úgy tekintenek, hogy jelentős áttörést hozhat a rák gyógyításában. Az előadók (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Országos Onkológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Genetikai Sejt- és Immunbiológiai Intézet) eredményei bizonyították, hogy a peptideket sikeresen lehet alkalmazni a gyógyszermolekulák irányított célba juttatására, ezáltal csökkentve a hatóanyagok toxikus mellékhatásait. Bízató kísérletekről számoltak be azok a kutatók (ELTE Immunológiai Tanszék, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport), akik autoimmun betegségek (pl. rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus, sclerosis multiplex) korai felismerésére alkalmas diagnosztikai kittek kifejlesztésével foglalkoznak. Azonban itt még a vizsgált betegszám növelése szükséges ahhoz, hogy a pozitív eredményeket alátámasszák. Penke Botond professzor (SZTE, Orvosi Vegytani Intézet) nagyon érdekes előadást tartott arról, hogy megállítható-e az amiloid és prion betegségeknek a sejtről sejtre terjedése. Ezután Martinek Tamás (Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány-BAYGEN, Szeged) a beta-amiloid oligomereket felismerő, és *ex vivo* semlegesítő foldamer-dendrimer konjugátumokról, mint az amiloid betegségek potenciális gyógyszereiről beszélt.

Az ülésen számos, a peptidek és fehérjék szerkezeti és biokémiai hatások vizsgálatára alkalmas módszert is bemutattak a résztvevők. Így többek között NMR, ECD, VCD és a röntgenkristallográfia modern szerkezetkutatásokban játszott szerepéről esett szó, a fehérjék proteomikai meghatározásának lehetőségeivel, továbbá *in vivo* fluoreszcens és biolumineszcens optikai imaging módszer alkalmazásával és sejtéletlen folyamatok követésére alkalmas impedimetriai módszerekkel ismerkedhetett meg a hallgatóság.

Immár hagyománnyá vált, hogy a Munkabizottsági Ülésen egy tapasztalt kolléga összefoglalót tart munkásságáról, és olyan szintetikus problémákat is bemutat, amely tanulságos lehet a fiatalok számára. Idén Tóth Gábor (SZTE, Orvosi Vegytani Intézet) „Peptidektől a módosított peptidekig” címmel tartott előadást, amely ízelítőt adott a gliko- és foszfopeptidek szintézisének nehézségeiről és azok megoldásáról. Szintén hagyományosan egy meghívott előadó vitaindító előadást tart érdekes peptid-, fehérje biokémiával összefüggő problémáról. Ebben az évben Pál Gábort (ELTE, Biokémiai Tanszék) kértük fel előadónak, aki nagyon érdekes, gondolatébresztő előadást tartott „Gyógyszercélpont szerin proteázok

gátlása evolvált kanonikus inhibitorokkal - vajon a kulcs-zár modell itt mennyire alkalmazható?” címmel.

Mivel a pályázatok egyre inkább megkövetelik a beszámoltatások során a kísérletek és eredmények dokumentálását, ezért hasznos lehet a Sysment Kft. Sysment Notebook elektronikus jegyzőkönyv programcsomagja, amelynek bemutatására szintén lehetőséget biztosítottunk.

Az Munkabizottsági Ülést kiállítók is színesítették, akik egyben szponzorálták is az eseményt. A szponzoroknak (Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért, Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt., ABL&E-JASCO Magyarország Kft., Gen-Lab Kft., Kvalitex Kft., LAB-EX Kft., Merck Kft., S-Biotech Kft., Sysment Kft., Uratim Kft.) ez úton is köszönjük a támogatást, amely hozzájárult az ülés magas színvonalú lebonyolításához.

A Peptidkémiai Munkabizottság nevében:

Mező Gábor
elnök

Szabó Ildikó
titkár



*BIOKÉMIA
XXXVI. évfolyam 2. szám 2012. június*

A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET JELÁTVITELI SZAKOSZTÁLYÁNAK III. KONFERENCIÁJA

Bellevue Konferencia és Wellness Hotel, Esztergom Búbánatvölgy
2012. október 4-6.

Tisztelt Kolléga!

Örömmel jelezzük, hogy a **Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztálya** Esztergomban rendezi meg III. Konferenciáját. A konferencia helyszíne a Bellevue Konferencia és Wellness Hotel.

A Jelátviteli Szakosztály elnöke Gergely Pál, társelnöke Buday László.

A konferencia szervező bizottsága Buday László, Erdődi Ferenc, Hunyady László, Sármay Gabriella, Sümegi Balázs, Vértessy Beáta és Vigh László

A konferencián előadással, illetve poszterrel lehet részt venni. A szervezőbizottság a beérkezett előadás-kivonatokat alapján - figyelembe véve a lehetséges előadások korlátozott számát - szerkeszti meg a végleges programot. A poszterek esetében várhatóan minden szakmailag megalapozott jelentkezést el tudunk fogadni.

A konferencia felhívása, illetve minden további információ – bejelentkezési lehetőséggel – az Egyesület honlapjáról (<http://www.mbkegy.hu>) vagy a szervező iroda web-oldaláról (<http://chemolcongress.hu/rendezveny/47>) érhető el.

A rendezvény végleges programját és az előadások/poszterek összefoglalóit a konferencia programfüzete fogja tartalmazni. Ugyanakkor az aktuális információk, esetleges változások az egyesület, illetve a szervező iroda honlapján folyamatosan elérhetők lesznek.

Amennyiben felkeltettük érdeklődését, kérjük, hogy bejelentkezését, illetve tervezett prezentációjának összefoglalóját a fenti honlapon elektronikus úton **2012. július 15-ig** küldje el.

Kérjük továbbá, hogy az érdeklődő kollégák figyelmét szíveskedjen felhívni a konferenciára.

Budapest, 2012. május 29.

Baráti üdvözlettel a szakosztály vezetésé

Gergely Pál
DE OEC Orvosi Vegytani Intézet

Buday László
MTA TTK Enzimológiai Intézet



iubmb&febs
Sevilla 2012

Congress

22nd **IUBMB**
37th **FEBS**

From Single Molecules
To Systems Biology



International Union
of Biochemistry
and Molecular Biology



Sociedad Española
de Bioquímica y
Biología Molecular



Federation of European
Biochemical Societies

www.iubmb-febs-2012.org

Sevilla, Spain * September 4 - 9, 2012

GRÁF LÁSZLÓ: AZ INTÉZET (1965)

Reggel tízkor ébredt. Meghagyta, hogy ne ébresszék. Ameddig alszik, alszik. Amit átalszik, azt nem vehetik el tőle, az az övé. Végre felkelt, elhúzta a függönyt, és mint valami súlyos gyapotbála, rádőlt a szerda délelőtt. Eszébe jutott az Intézet, és a fali tükörben látta, hogy összeráncolódik a homloka.

Az első megállót gyalog tette meg, a másodikat lépésben. Nem sietett, harapta a ködöt, mint a vásári ember pálcikára csavart cukorvattáját.

Az Intézetbe pontosan tizenegykor lépett be. Ettől nem térhetett el. Az íratlan szabályok mint valami mágia hatottak itt, és a centrifugazümmögés megfoghatatlan szövetében pókhálóként feszült a rend.

Régebbi időből tudta, hogy reggel hétkor jön a mosogató és a takarítónő, nyolckor a Laboráns, kilenckor a Tanársegédek, féltízkor az Adjunktus, tízkor a Professor és tizenegykor ő, a Szaklaboros. A későnjövés itt tudományos fokozat, itt csak az késhet, aki tud.

A Tanársegéddel, akivel együtt dolgozott, jól kijött. Középtermetű, erős állkapcsú fiú, ha összeszorította a fogait –gyakran állt így leengedett cigarettával a pH-stat előtt- az arca kemény elszántságot tükrözött. A Szaklaboros hajlamos volt elhinni, hogy jó barátok. Szerelmi kalandokat meséltek egymásnak, s a munka sodrában, közös várakozások műszerketyegésre hangolt izgalmai közepe néha odáig fajult kettejük kapcsolata, hogy bizonyos nótákat együtt énekeltek. A Tanársegéd feldobott egy dallamot és ő megvariálta. Cili, a Laboráns, ha éppen ott volt, rafinált csigákba csavart hajtornya alól bántóan nevetett. Ilyenkor a Tanársegéd restelkedve elhallgatott és cigarettázott. Cili civilben egy fodrász szalon modellje volt. Délután négyig azonban rendszerint krumplicukorszerű vegyszerdarabokat kopogtatott egy hatalmas porcelánmozsárban. A Szaklaboros néha segített, bár jobban szerette valamilyen távoli zugból nézni, mint vergődik a buzogány hosszú, fehér ujjai síkos szorításában. Általában szerette tekintetével simogatni a környezetét, a szőke, sietéstől kicsit mindig előrehajló Tanársegédnőt, az Adjunktust, aki bal kezét mint valami becses műtárgyat íróasztala mappáján pihentette, míg a jobb lustán lapozta, csúsztatta, ropogtatta a fényes fotókópiákat.

Találkozásuk ritka perceiben egyedül a Professor törte át furcsa, tüzelő egyéniségének torpedórombolásával a Szaklaboros békés, egocentrikus világát. A kifejezés valójában találó, a Professor leginkább egy torpedóhoz hasonlított. Megmagyarázhatatlan belső nyugtalanság hajtotta egyik laborból a másikba, és ha valaki netán olyan ügynek akarta megnyerni, ami éppen nem foglalkoztatta, elemi erővel tört ki belőle a türelmetlenség. Még novemberben ismertette a Szaklaborossal a Témát, idegesen toporgott két laborasztal között, száraz szája sarkában nem parázslott, valósággal lángolt a cigaretta. A Szaklaborosnak úgy tűnt, hogy beszéd közben is állandóan harapja magába a füstöt, érdes, dohány-

szagú, derékbaszipantott szavai őt is lázba hozták.

A Szaklaboros végeredményben a Tanársegéd témájából kapott egy darabot, aki éppen doktori disszertációját írta. A dolgok ilyen összefüggése végülis nem érdekelte. A Témát önálló egésznek képzelte, és megfertőzte a becsvágy nevű betegség, melynek kórokozója valósággal hemzsegett a levegőben. Belevetette magát a munkába...

Egy bizonyos Anyagot kellett volna állandóan hűtött cső pépes töltetén szétválasztania. Az oszlopról távozó Anyag eloszlását egy írószerkezet rögzítette volna szüntelenül forgó papírtekercsen. Feladata csak annyi volt, hogy felvitte az Anyagot az oszlopra és cserélte a jeget a termosztátban. A dolgot egyszerűnek és mégis érdekesnek gondolta, mert a görbék alakjából fontos kérdésre várt választ.

A baj ott kezdődött, hogy az oszlopról egyáltalán nem jött le az Anyag. Először a töltetre gyanakodott, ráeresztette a sóoldatot, előírás szerinti sebességre állt és várt. És cserélte a jeget. Először egy zsákban törte súlyos fakalapáccsal apró darabokra, de amikor a zsák jégbe került foszlányai eltömték a járatokat és rácsavarodtak a termosztát szívó propellerére, pléhedényben kezdte csapkodni a jégtáblákat. A várvavárt Anyag azonban nem hagyta el az oszlopot, a mutató unalmas piros-kék, piros-kék végtelent rajzolt a drága papírtekercsre. Az első hetekben szívósan és szisztematikusan dolgozott reggel kilenctől este hatig. Először az oszlopot készítette el, duplafalú üveghenger volt, a belső csőben ülepítette a töltetet, ügyelve, hogy mindig legyen folyadék felette. Két órát is várt, míg beállt az egyensúly az oldattal, aztán telehordta jéggel a termosztátot, beindította a motort, megszívta a nyomócsövet – fogába tépett a hideg – majd ráhúzta a hűtőköpeny alsó kimenetére. Az Anyagot vékony pipettával rétegezte a töltet fölé, várt, hogy beigya az oszlop, aztán óvatosan a pépes töltetre eresztette a mosófolyadékot.

Ötmilliliteres csövecskékbe gyűjtötte a frakciókolektor az átréselődő levet, furcsa kettyenéssel fordult a kerék, ilyenkor összecsörrentek a csövek, a billegő mutató pedig váltakozó írógépszalagokon kipötyögte a végtelent. Nem tudott egy helyben maradni, izgett-mozgott, millió ötleten törte a fejét, különböző járatokat taposott ki magának a Labor összevisszaságában, mániákusan rózta beidegzett ösvényeit centrifugák és spektroszkópok dzsungelében, és két percenként visszatért a műszerablakhoz, amelyen ködös foltokban kondenzált meleg lehelete.

Gyöngyözött az oszlop, a szánakozás egyforma könnycseppjeit buggyantotta a szivornyába a tefloncső vége. Folyt a mosólé, mint a vér. És ez így ment napról napra. Nyolcra majd hétre járt be, és még este kilenckor is rezgett a pléhlavór súlyos kalapácsa alatt. Zavart szempár búvólte az UV-rekorder rajtvonalon billegő mutatóját, de az konokul kitarzott. Fél tízkor telefonáltak a portáról, hogy rövidesen leoltják a villanyt, kikapkodta a villásdugókat és ment.

Senkit sem lehetett azzal vádolni, hogy behajtották a dologba. A Professor nem várt gyors eredményt, és egyáltalán várt-e eredményt? Gyors vizitjei, mint ha csak valamilyen tehetetlenség lendítette volna a szomszédos laborból súlyosabb problémák mellől, szelet kavartak, tétova kérdései nyomában hamu szállt a levegőben. A Szaklaboros magában a Tanársegédet okolta a tempóért. Ez a félreértés kezdetben éket vert közénk és megzavarta az esti duetteket. Tény, hogy a Tanársegédnek voltak gesztusai, amelyekkel szította a tüzet, de ezek semmiképpen sem kötelezhették a Szaklaborost ekkora erőfeszítésre. Inkább csak arról volt szó, hogy értelme nem tudott lépést tartani fantasztikus akarásával, és ez feldühítette.

Csakazértis.

A düh tulajdonképpen célpont nélküli volt. Gyűlölte a Készüléket, az Intézetet, a Témát, a Diplomát. A negyedik hét végén jégpüfölés közben hirtelen átvillant az agyán, mi lenne, ha két kézre fogná a fakalapácsot, ordítva rávetné magát a frakciókollektorra és szétverne mindenkit, aki védelmére kel. Persze ez csak tűnő indulat volt. Túlfeszített idegszájai gyakran rezonáltak fals hangokra. Más témáról valójában hallani sem akart, szerette a készüléket, a hét percenként zökkenő kollektort, a konok mutatót, a hűtőköpeny hideg-nedves tapintását. A dolgok monoton reménytelensége néha sajátos módon Reményt ébresztett benne. Fantasztikus, hogy az emberi lélek milyen anyagiatlan kitartással tudja magából kitermelni ezt a szerteáradó, stimuláló érzést, a Reményt.

A Szaklaboros hegyesnél hegyesebb csúcsokról, nyálcsorogva végiglapozott amerikai reklámfüzetek eszményi kromatogramjairól álmodott. Hosszú ideig minden naptól azt a megváltó percet várta, amikor sziszegve, mint valami fürge sikló, kiszalad a mutató balra, aztán előkelő mértéktartással, kellemes ívet kanyarítva a papíron, visszatér eredeti helyére.

A Szaklaboros már régen nem borotválkozott, nem evett és keveset aludt. A beszéde zavart lett, a hangja fátyolos, szeme szürke gödrében furcsa tüzek égtek. Barátai sorra elmaradtak, bántó megnemértés gyűrűzött körülötte. A lány, akit szeretett és akivel már csak este tíz után találkozhatott, egyszerűen otthagya, mert nem lehetett vele másról beszélni, mint a kollektorról, az Eredményeiről, amik még váratnak magukra, de már nem sokáig.

A várakozás állandó idegfeszültségében élt, nézte a mutatót és aprította a jeget... Csak még egy óra, csak még néhány perc... és az oszlop, mint valami búvópatak nyelte az Anyagot.

1964. december 15-én délután öt óra hat perckor csoda történt. A professor a Tanársegédet és a Szaklaborost egymás karjaiban találta. A készüléken különösebb elváltozás nyomain nem voltak láthatók, a szivornyába ugyanolyan közönyösen hullottak a cseppek, mint a hónap annyi más napján, ketyyelve fordult a frakciókollektor, a hűtővízben buborékok szálltak... A mutató akkor hatvanason állt, és sírt a Szaklaboros. Ezt követően két napig nem dolgozott. A harmadikon

nekilátott, hogy megismételje a Kísérletet. Biztosította az azonos körülményeket, felvitte az Anyagot és lélegzetvisszafojtva figyelte az UV-rekordert. De a mutató aznap néma maradt. És negyed- és ötödnap is csak unalmas, egyenes pályáját rótt a végtelen papíron, semmi jelét nem adva annak, hogy emlékeznek a december 15-i kalandra.

A Szaklaborosban akkor mintha megszakadt volna valami. Kilencre, majd tízre, aztán tizenegyre kezdett járni. Megborotválkozott, viccet mesélt és nevetett, ölelő karjaiba visszafogadta a hétköznapiok kényelme.

Nem, a Reményt nem adta fel, csak valahogy fénye tört meg. Mintha elnapolta volna a beteljesülés terminusát, feszességéből engedett a Várakozás. Már nem sétált eszelősen az UV-rekorder ablaka előtt, higgadtan dolgozott, örült az ebédnek, kellemes borzongást váltott ki belőle Cili, a laboráns éles kacagása, maga is élcelődött és sörözött a Tanársegéddel. Az Adjunktussal több ízben meghányta-vetette a Témát, mintha valami idegen, súlyos tárgyat emlegettek volna... És közben szaladt a mutató. Élete visszatért a rendes kerékvágásba, elhatalmasodott szenvedélyét és esztelen akarását kerékbe törte a hétköznapiok sodra. Mint egy kirakós játékban minden kocka, minden érzés és gondolat a maga helyére került.

Ezen a szerdai napon ezt átgondolta az UV-rekorder ablaka előtt guggolva. A mutató mereven állt a nullán, a teflon végéről zajtalanul gördültek a másodpercek és negyedóránként mint egy öreg kakukkos óra, zötytyent a kerék.

A frakciókollektor örölte az Időt.

A Szaklaboros nem érezte, hogy hiába, nem tudta, hogy hiába- és talán nem is. Körülötte zajlott az élet és mindenki várt valamit. Zilált, össze-vissza életébe beépült ez a furcsa időgép, ritmust szabott zakatoló vágyainak és ébren tartotta a Reményt. Mert a Remény mécsese nem aludt el, csak halványabban égett: sokáig kell, hogy kitarson a Láng.

Biokémia 1989.március
XIII. évfolyam 1. szám

GRÁF LÁSZLÓ MINT FOTÓMŰVÉS

Válogatás a tanszékvezetői irodájának ablakából készített fotókból, amelyekből nagy sikerű kiállítást rendezett 2004-ben az ELTE TTK Lágymányosi Tömbjének aulájában „Hajnali részegség” címmel.



