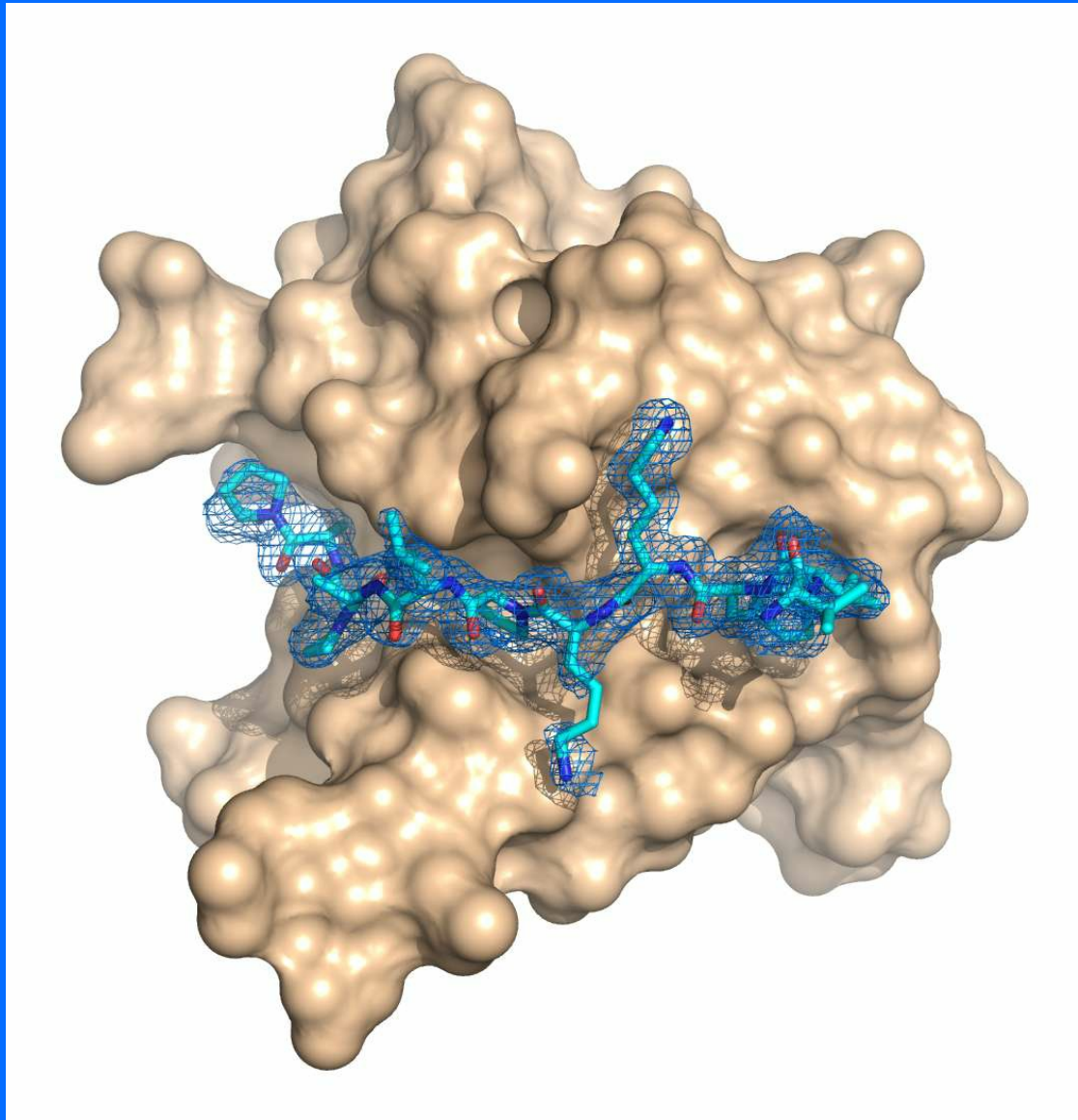


# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLI. évfolyam 2. szám

2017. június



# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Geiszt Miklós,  
Kiricsi Mónika (titkár), Maksay Gábor, Nyitray László, Sarkadi Balázs,  
Székács András, Szondy Zsuzsa

Főszerkesztő:

**Szűcs Mária**

szucs.maria@brc.mta.hu

Technikai szerkesztő:

**Bérdi Péter**

info@remekdesign.hu

**XLI. ÉVFOLYAM 2. SZÁM**

**2017. június**

## TARTALOMJEGYZÉK

*Címlapkép: A PP4 foszfatáz regulátor alegység szubsztrátumkötő doménjének (világosbarna) és a CENP-C centroméra fehérje kölcsönható motívumának (kék) röntgenkristallográfiai adatokból nyert 3D szerkezeti modellje, lásd 38. oldal (Lipinszki és mtsai., 2015., Nature Communications; Martin Singleton engedélyével; PDB: 4WSF).*

### **AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK**

Kitüntetések, díjak ..... 3.

Hudecz Ferenc: Úton... ..... 5.

### **FIATAL KUTATÓK MŰHELYEI**

Kármán Zoltán, Nagy Zsuzsanna és Lipinszki Zoltán: Foszforilálni vagy defoszforilálni: az itt a kérdés! ..... 30.

### **TUDOMÁNYOS CIKK**

Szabó Eszter és Ambrus Attila: A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiencia molekuláris patomechanizmusa ..... 44.

### **VISSZATEKINTÉS AZ ELMÚLT 50 ÉV KIEMELKEDŐ CIKKEIRE**

Haracska Lajos, Lipinszki Zoltán és Udvardy Andor: A 26S proteaszóma poliubikvitin receptor alegységének kalandos azonosítása ..... 64.

### **KONFERENCIA BESZÁMOLÓK**

Hungarian Molecular Life Sciences 2017, Eger ..... 78.

Peptidkémiai Munkabizottság 2017. évi tudományos ülése, Balatonszemes .... 83.

### **TUDOMÁNY ÉS MŰVÉSZET**

Maksay Gábor: Egypercesek ..... 85.

**FÓRUM FELHÍVÁS** ..... 87.

### **ÁLLÁSHIRDETÉSEK**

Kutatói állás ..... 88.

Laborasszisztensi állás ..... 89.

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület  
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.  
<http://www.mbkegy.hu>

Felelős kiadó Dr. Buday László | Az engedély száma III/SZI/397/1977  
HU ISSN 2060 8152 (Online) | HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

## AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI 2017. MÁRCIUS 15. ÉS 2017. JÚNIUS 30. KÖZÖTT

Az MTA Elnöksége kiemelkedő tudományos munkásságuk elismeréseként **megosztott Akadémiai Díjjal** tüntette ki az ELTE TTK Biológiai Intézet Biokémiai Tanszék három oktatóját: **Kovács Mihály** egyetemi tanárt, az MBKE jelenlegi főtitkárát, **Málnási-Csizmadia András** kutatóprofesszort és **Nyitray László** tanszékvezető egyetemi tanárt, az MBKE jelenlegi alelnökét. Kutatócsoportjaik a motorfehérjék működésének feltárásában, valamint az izomfehérjék mellett a sejtosztódásban, a sejtmozgásban, a sejten belüli anyagforgalom lebonyolításában és a DNS-hibajavításban résztvevő enzimek vizsgálatában értek el jelentős, nemzetközi visszhangot kiváltó eredményeket.

Az idei **Lendület pályázati** felhívásra 96-an jelentkeztek, közülük 22 fiatal kutató kezdheti meg tudományos munkáját a program keretében. Az MBKE tagjai közül **Lipinszki Zoltán** biológus az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetében alakíthat kutatócsoportot. Eredményei közelebb vihetnek a sejtosztódási hibákból eredő betegségek kialakulásának megértéséhez (lásd 30. oldal).

A beérkezett 140 pályázatból 25 magyar, 40 évesnél fiatalabb posztdoktor nyerte el az MTA másodszor meghirdetett Prémium posztdoktori kutatói programjának 3 éves támogatását, köztük:

**Enyedi Balázs** (Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet): A sejtmagduzzadás szerepe a sejtkárosodás és a szöveti sérülés patomechanizmusában,

**Harami Gábor** (ELTE TTK Biokémiai Tanszék): A homológ rekombináció minőség-ellenőrzésének feltérképezése egyedi molekula-eljárással,

**Szabó Milán** (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai Intézet) Foszintetikus folyamatok, sejtnövekedés és sejten kívüli kapcsolatok fenotipizálása Symbiodiniumban és egyéb mikroalgákban

című témában végezhet kutatásokat.

A 2017. évi **Straub-plakett** díjazottja **Puskás László**, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Funkcionális Genetikai Laboratóriumának tudományos tanácsadója, aki a sikeres gyógyszerekhez vezető útról, a molekuláris célpontok azonosításáról tartott előadást a díj átvételekor.

**Pro Urbe** díjban részesült **Vígh László** akadémikus, **Szeged Nemzetközi Kapcsolataiért emlékérmét** kapott **Wollemann Mária** orvos, mindketten az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet kutatói.

**Gratulálunk a kitüntetetteknek!**

## ÚTON...

**Hudecz Ferenc<sup>1</sup>**  
**ELTE TTK Szerves Kémiai Tanszék,**  
**MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport**



Budapesten születtem 1952. szeptember 12-én. A Mártonhegyi úti általános iskola ének-zenei tagozatra jártam. A felvételin – annak ellenére, hogy hangom nemigen volt – jó hallásom miatt a „b” osztályba kerültem. Az énektanár Vigh Rudi bácsi, a neves népzene kutató, Kodály tanítvány azzal érvelt: „lássuk mi lesz a gyerekből”. Valóban, felső tagozatban (5. osztály) már az énekkar tagja voltam, bár szólót soha nem énekeltem (és ez reális). A zene, a zeneolvasás, a kórus, az éneklés szeretete velem maradt. Fontos emlék számomra Kodály látogatása az iskolában, Szőnyi Erzsébet kísérte, aki a Magyar Kodály Társaság alapító és örökös tiszteletbeli tagja, társelnöke, elnöke. A 40 éves osztálytalálkozón – 2008-ban – felső-tagozatos énektanárunkat, Horváth Karcsi bácsit sikerült rávenni (nem volt nehéz) az öregdiák kórus létrehozására és örülök annak, hogy sokan bekapcsolódtak a munkába.

Az iskola szigorú volt, sokat követelt és sokat adott, emberségre és tartásra nevelt. Az alsó tagozatos osztályfőnök, Vaszkó Béláné, Irén néni igazságos, nyugalmat árasztó, remek tanító volt. A felső tagozatban emlékezetesek voltak Kecskés Mihályné magyar órái, vers- és prózaelemzései. Szerettem a történelmet, Margit néni racionális, világos és jól követhető óráit, ahol bizony fegyelem volt, a jó értelemben és Lujzi néni, a néptánc tanárnő gondos, odafigyelő és értelmes tevékenységre nevelő munkáját. Fontosak, mókások és szeretnivalók voltak a rajzórák Bakonyi Mózes tanár úrral, a gyakorlati foglalkozások Máthé tanár úrral és persze a kémia Wiener Jánosné, Anna nénivel, akinek köszönhetem, hogy érdeklődésem már ott az iskolában a

<sup>1</sup> Hudecz Ferenc Eötvös József-emlékérmét és „Pro European Peptide Society” kitüntetést kapott, lásd *Biokémia XLI. ÉVFOLYAM 1. SZÁM, 2017. március, a szerkesztőség megjegyzése.*

kémia/biokémia felé fordult. Nem fejeltem el biológia tanárunk, Jutka néni meleg szeretetét, amellyel a diákokkal foglalkozott. Jó volt Mártonhegyisnek lenni...

A budapesti Szilágyi Erzsébet Gimnáziumban érettségiztem 1971-ben. A középiskolás évek emlékét meghatározza édesapám halála (1969), aminek háttere egy inoperábilis gyomorrák volt. Tanárain együttérzése és ennek megnyilvánulási formái alapvető élmények maradtak számomra. A kémia-biológia tagozatos osztályban sokat tanultam Fraknói Tibor kémia tanártól, élveztük a kísérleteket és megtanultuk, hogy a reprodukálhatóság elsőrendű követelmény. A logikus gondolkodás, a racionális megközelítés tiszteletét sajátíthattuk el a közelmúltban Rátz tanár úr életműdíjjal kitüntetett Pálfalvi Józsefné, Sárikától, a matematika hiteles, elkötelezett tanárától. Emlékezetesek Nagy Tamásné, Gréti néni magyar órái, a József Attila vagy Radnóti verselemzések és Mohayné Katanics Mária tanárnő ének-zenetörténet órái és természetesen a kamarakórus. Nemcsak szakmai tudást, műveltséget, hanem emberséget, a közösség szolgálatát, a „másik” tiszteletét tanultuk meg. Szerencsés osztály voltunk... És jó közösség. Azóta is figyelünk egymásra, tanulunk egymástól: a gyógytornász és a gyógypedagógus, a szemész, a belgyógyász háziorvos és a tüdőgyógyász főorvos, akit az év orvosának választott kórháza, az akadémikusok, a gyógyszerértároló, a jezsuita szerzetes, a Jezsuita Roma Szakkollégium kezdeményezője, a nemzetközileg elismert szállítmányozási vállalkozó, aki a túlsúlyos-túlméretes eszközök szállításának specialistája a kontinensen, a középiskolai tanár, az 1991-ben alapított biotech cég ügyvezetője, egy magyar tudományos folyóirat főszerkesztője és a többiek – itthon és külföldön.

Biokémikusnak készültem. Mivel előzményei e tudományterületnek nem voltak a családban, a továbbtanulást meghatározta az a beszélgetés, amelyet az MTA Történettudományi Intézetben Angliával és az angol-magyar kapcsolatokkal foglalkozó történészként édesanyám folytatott Straub F. Brunó akadémikussal,

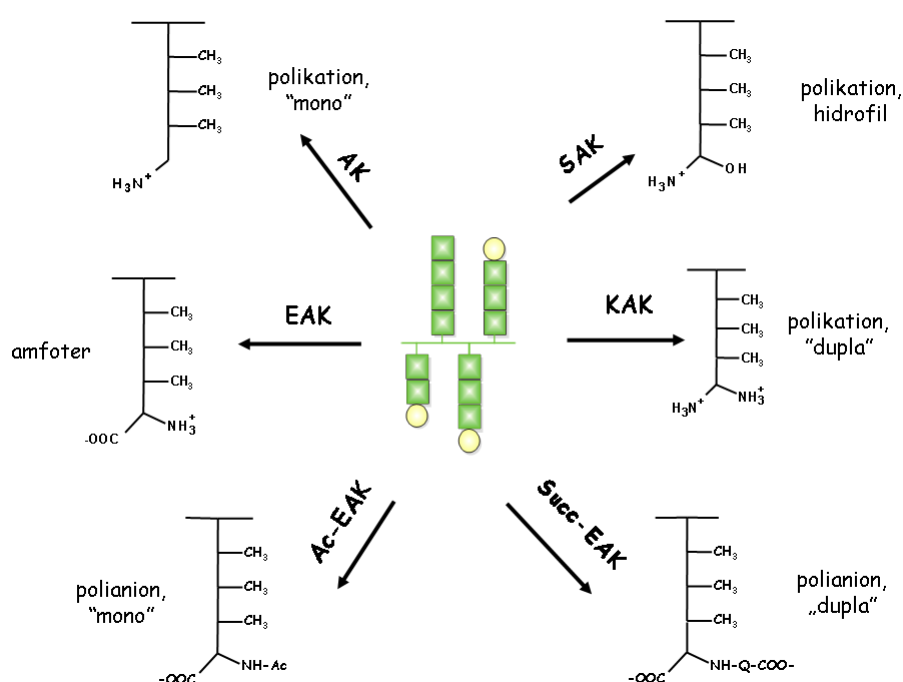
akit – ismeretlenül – felkeresett a kérdéssel, mit tanácsol, hogyan lehet egyetemi tanulmányokat folytatni az 1970-es években Magyarországon? A lehetőségek (SOTE, ELTE, BME) részletes elemzése után Straub akadémikus az ELTE vegyész szakot javasolta.

Így az ELTE TTK vegyész szakos hallgatója lettem 1972-ben, 1977-ben szereztem kutatóvegyészi diplomát. Az egyetemen nagy hatással voltak rám Kucsman Árpád elegáns szerves kémiai előadásai, a speciális kurzusok között pedig megfogtak Medzihradzsky Kálmán peptidkémiai előadásai, Gergely János immunológiai és Kovács János sejttani stúdiumai. Önálló gondolkodásra, szuverén kutatói működésre készítettek fel Haiman Ottó fizika vizsgái, az Eötvös Collegista Turczai Gyula és Beke Gyula matematika, illetve fizikai kémiai szemináriumai. Talán a legtöbbet Szekerke Mária tudományos tanácsadónak köszönhetek, akinél – rákkutatással kapcsolatos témában – a tudományos diákköri munkát kezdtem az egyetemi évek alatt, diplomáztam és doktoráltam (Dr. rer. nat., ELTE, 1980). Az ő nyitottsága, nemzetközi-szakmai széleslátókörűsége és a gondolkodás szabadságának tiszteletben tartása nagyban segítette szakmai fejlődésemet.

1979 májusában, az ELTE TTK biológus bálon ismertem meg azt a hallgatót, aki december 1-én feleségem lett, aki végzés után ledoktorált, aki kezdetben a Kőbányai Gyógyszerárugyár (ma Richter G. Vegyészeti Nyrt.) munkatársa, majd a Semmelweis Egyetem Biofizikai Intézet elkötelezett oktatója, sikeres Ph.D. hallgatók témavezetője, habilitált docens, a biológiai tudomány kandidátusa (1994), kutató (h index: 15). Nemcsak feleség, gyermekeink édesanyja (és Lili unokánk nagymamája), lelkes oktató és kutató, de társam minden vonatkozásban...

Kezdetben különböző tumorellenes szerek albumin, majd polipeptidek (Ara-C) illetve (m-AMSA) DNS kötődésének tanulmányozásába kapcsolódtam be. Később olyan új típusú elágazó láncú polimer polipeptid család szintézisére,

jellemzésére törekedtünk, amelynek segítségével egyrészt tanulmányozni lehet a primer szerkezet (aminosav sorrend, aminosav összetétel) és a térbeli elrendeződés (oldatbeli konformáció) közötti összefüggéseket, másrészt a kémiai szerkezet befolyásoló hatását releváns funkcionális biológiai sajátságokra. E vegyületekben a polilizin gerinchez különböző felépítésű, rövid peptid oldalláncok kapcsolódnak (1. ábra). Az oldalláncvégi aminosavak megválasztásával létre lehetett hozni különböző töltésű, töltéssűrűségű, hidrofil/hidrofób karakterű vegyületeket.



**1. ábra. Elágazó láncú, polilizin gerincű polipeptidek sematikus szerkezete.** A = Ala, K = Lys, E = Glu, S = Ser.

Az oldatbeli térszerkezet meghatározására CD spektroszkópiai vizsgálatokat végeztem – első külföldi tanulmányutak keretében (1978, 1979 és 1982) – a nemzetközi elismertségű Dr. Karel Blaha kutatócsoportjában, Prágában (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences). Megállapítottuk, hogy a láncvégi aminosavak mineműsége (töltés, oldallánc hidrofób karaktere) meghatározó módon befolyásolja az oldatbeli térszerkezetet: alifás, aromás oldalláncú aminosavak jelenléte a terminálison rendezett konformációt eredményez, míg az amfoter Glu azonos pozícióban rendezetlen térszerkezetet hoz létre – azonos körülmények között. Dr. Gaál



Dezső (Országos Onkológiai Intézet) vizsgálataival összefüggéseket irtunk le az immunmoduláló hatás és a szerkezet között, míg Dr. Rajnavölgyi Évával (ELTE Immunológia Tanszék) kezdeményezett együttműködés bizonyította, hogy a láncvégi aminosavak konfigurációja jelentősen befolyásolja a polipeptidek immunválaszt kiváltó képességét. E kísérletek, a közös munka több évtizedes eredményes közös kutatómunkát alapoztak meg és megtanítottak arra, hogy komplex problémák vizsgálata – amely „team”-ben lehet sikeres – során mennyire fontos a „más” szakmai háttérű kutató megközelítésének, gondolatrendszerének a megértése. A kémikust a vegyület előállítása, a szerkezet leírása, a kémiai reaktivitás és a szerkezet összefüggése érdekli elsősorban. A biológus, orvosbiológus a biológiai funkció, a jelenség, a sejten vagy szervezeten belüli viselkedés megértésére törekszik. Az elágazó láncú polipeptidek szintézise és kémiai/biológiai viselkedése terén elért eredményeket az 1985-ben benyújtott kandidátusi disszertáció foglalta össze.

Fontos megjegyezni, hogy a későbbiekben bővülő polipeptidcsalád, valamint a funkcionális tanulmányok során bizonyítást nyert, hogy az oldalláncvégi aminosav hidrofobicitása és a molekula töltésviszonyai meghatározóak a polipeptid foszfolipid modellmembránon kifejtett aktivitásában, citotoxicitásában. *In vivo* kísérletek bizonyították a töltés kiemelt szerepét a keringésben töltött időre, illetve biodisztribúcióra, tumorban való feldúsulásra vonatkozóan.

1983-ban lehetőségem nyílt csatlakozni Stanley A. Plotkin professzor csoportjához az első (1892) független amerikai biomecinális kutatóintézetben (Wistar Institute, Philadelphia), amely C. Wistar orvos (1761-1820), egyetemi tanár (University of Pennsylvania), az első amerikai anatómia tankönyv szerzője nevét viseli, <https://www.wistar.org/>. Itt ismerkedtem meg azokkal a kérdésekkel, amelyek kapcsolatot keresnek a fehérjék, glikoproteinek immunválaszt kiváltó képessége, specifikus immunfelismerése (ellenanyag- illetve T-sejt receptor-kötődés) és a kémiai szerkezet között. E jelenségek

molekuláris szintű értelmezése e poszt-doktori, vendégkutatói tanulmányút során került érdeklődésem előterébe – s ehhez az egyetemi évek alatt Gergely professzor ELTE előadásai biztos alapot nyújtottak.

Az 1980-as évek elején széleskörű kutatások indultak meg annak tisztázására, hogy az immunválaszért felelős fehérjéken belül mely szakaszok játszhatnak meghatározó szerepet a specifikus immunválasz kiváltásában. Az Intézetben feladatom először az immunválaszért felelős humán citomegalovírus fehérjék azonosítása, izolálása és az aminosav sorrend megismerése volt. Megtanultam számos új technikát (pl. ELISA, dot-blot, immunprecipitáció), majd bekapcsolódtam a herpesz szimplex vírus (HSV) D glikoprotein antigén-szerkezetének feltérképezésébe, jártasságot szereztem B- és T-sejt epitópok (antigéndeterminánsok) predikciója, kísérleti azonosítása és kémiai szintézise terén. A kutatás során az „átfedő” és/vagy „csökkenő hosszúságú” peptid-stratégia együttes alkalmazásával hozzájárultunk a D burokfehérje antigén-szerkezetének meghatározásához.

A Wistar Intézetben folytatott kutatómunkának köszönhetően eljutottam a philadelphiai Magyar Klub egyik rendezvényére, ahol a Nobel-díjas Wigner Jenő tartott előadást pályafutásáról, szakmai fejlődéséről. Az előadó szerénysége, az előadás közvetlen stílusa lehetővé tette, hogy egy személyes beszélgetés után megkérjem Wigner Jenőt az elhangzottak leírására. A kézirat pár héten belül megérkezett. A közlés lehetőségét Wigner Jenő 100. születésnapja alkalmából felajánlottam a Magyar Tudomány számára. A kéziratot és annak leiratát a folyóirat 2002. novemberi száma, illetve annak melléklete hasonló kiadásban közölte <http://epa.oszk.hu/00700/00775/00048/wigner.html>.

E tanulmányútnak másik érdekessége, tanulsága is volt. Feleségem és a két fiú, Gergő (1981) és Andris (1983) 1984. januárban csatlakoztak hozzám. 8 hónap alatt megtapasztalták az amerikai életformát több vonatkozásban is, voltak az Empire State Building tetején New Yorkban, sétáltak a Metropolitan lépcsőin és

Princetonban. Gergő az egyetem (University of Pennsylvania) bölcsődéjében észlelte, hogy az angol nyelv ismerete nem alapvető a kapcsolatteremtésben, a gesztusok, a testbeszéd alapot adhat arra, hogy komfortosan érezze magát a gyerek egy idegen országban, barátai legyenek. (A két fiú később a nyelvtanulásban versenyeztek, kettejüknek nyolc nyelvből nemcsak vizsgájuk van.) Szüleik pedig megtanulták, hogy egy hasmenéses fertőzés nem csupán meggyógyítandó, hanem az egyetem kutatóit inspiráló körülmény, amely egy új vírus tudományos leírását, közzétételét teszi lehetővé az izolálást követően.

Hazatérésünk után, továbbra is az ELTE–MTA Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársaként megvédtem kandidátusi disszertációm (1986), majd a tanulóévek folytatásaként R. W. Baldwin professzor meghívására a Nottinghami Egyetem Rákkutató Laboratóriumában (CRC Laboratories, University of Nottingham) dolgoztam 1988 őszétől. Monoklonális ellenanyag – tumorellenes szer (daunomicin, methotrexát), valamint elágazó láncú polipeptid konjugátumok szintézisével, funkcionális jellemzésével foglalkoztam (1988/89, majd többször 1990 és 1995 között). Első eredményeink abban az 1990-ben induló American Chemical Society (ACS) folyóiratban (Bioconjugate Chemistry) jelentek meg, amelynek társszerkesztője lehettem később (2007–2014 között), az alapító főszerkesztő, C. F. Meares (University of California, Davis) felkérésére. A „célbajuttatási” kutatás mellett a nottinghami tanulmányutak során egy másik projekt keretében Dr. M.R. Price biokémikussal a mucin glikoproteinek (MUC1) antigénszerkezete felderítésén dolgoztunk, különös tekintettel arra, hogy e fehérjék hibás/csökkent mértékű glikozileződése jellemző a tumorsejtek felszínén megjelenő struktúrákra, amelyek a beteg szervezetben specifikus ellenanyag termelődést váltanak ki. Bebizonyítottuk, hogy az epitópként azonosított – szénhidrát oldalláncot nem tartalmazó – peptidszakaszok alkalmasak tumorellenes immunválasz kiváltására, valamint tumorspecifikus ellenanyagok kimutatására vérmintából, sőt polipeptiddel/albuminnal konjugált formában a kötődés kifejezettebb.

A család Nottinghamban is velem volt. A gyerekek már nagyobbak és az egyetemhez (lakásunkhoz) közeli Dunkirk Primary School iskolába jártak (<http://www.dunkirkprimary.com/>), ahol megtapasztalták a kulturális sokszínűséget, a kreatív, értelmes és együttműködő légkört, barátokat és önbizalmat szereztek. Feleségem megismerhette a patch-clamp módszert és a Yorkshire puding elkészítésének titkát. (A szakirodalmat követve kiderült, hogy 2008-ban „The Royal Society of Chemistry” állásfoglalást közölt (<http://www.rsc.org/aboutus/news/pressreleases/2008/perfectyorkshire.asp>) E szerint: „a Yorkshire pudding isn't a Yorkshire pudding if it is less than four inches tall” – a hirt a BBC is átvette.

A tanuló/vándorévek lezárásának a Kumamotoi Egyetemen, H. Maeda professzor laboratóriumában végzett kutatások tekinthetők (1991-92). E japán kutatócsoport írta le először az „enhanced permeability and retention” (EPR) effektust, amely arra utal, hogy „solid” tumor szövetekben nagy molekulatömegű vegyületek (pl. módosított fehérjék, polimerek) és tumorelles szert (pl. neokarcinosztatin) tartalmazó konjugátumaik feldúsulhatnak, ami új terápiás lehetőséget vet fel. Egy három hónapos meghívás során kutatásokat végeztem az általunk előállított, nagy molekulatömegű elágazó polipeptidekkel, megvizsgálva a kémiai szerkezet és a jelzett vegyületek biodisztribúciója, tumorbeli felhalmozódása között, s e kutatások folytatódtak a következő években is.

Hazatérésem után az eredményeket MTA doktori disszertációban „Protein, illetve polipeptid tartalmú biokonjugátumok: Tervezés és szintézis szerkezet-hatás összefüggések alapján” címmel foglaltam össze és védtem meg. Elmondható, hogy az 1990-es évekre kialakult az a két kutatási irány, amelyek meghatározták a következő évtizedeket: a) fehérjék antigénszerkezetének feltérképezése, epitópok azonosítása klasszikus és kombinatorikus kémiai módszerekkel, „szuper”-antigének kutatása szintetikus vakcinák és diagnosztikumok előállítása céljából, b) tumorelles és antimikrobiális

kemoterápiás hatású vegyületek, epitóp és enziminhibitor peptidek specifikus célsejtbe juttatása oligo/polipeptid/fehérje biokonjugátumaik segítségével.

1993-tól az MTA kémiai tudományok doktora és az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tudományos tanácsadójaként, 1997 és 2001 között Széchenyi Professzori Ösztöndíjasként dolgoztam. 1996-ban habilitáltam és egyetemi magántanári címet kaptam az ELTE-n. 1999-től – az akkor bevezetett pályázati rendszerben, sikeres pályázat alapján – a kutatócsoport vezetője lettem. 2003 óta rendes egyetemi tanárként, előbb oktatási és tudományos rektorhelyettes (2003-2006), az egyetem rektoraként (2006-2010), majd a Szerves Kémia Tanszék vezetőjeként (2010-2016) és az Eötvös Collegium biológia-kémia műhely vezetőjeként (2010-2016) működtem. A rektori periódus dokumentumaiból ad ízelítőt egy válogatás.

Közben fiaink befejezték a Gimnáziumot (ELTE Trefort Ágoston Gyakorló Gimnázium), ahol remek tanároktól nemcsak ismereteket, de nyitott, értékorientált megközelítési módot, kritikai készséget, a teljesítmény elismerését és a minőség tiszteletét tanulták meg. Felvételiztek sikerrel az ELTE Bölcsészkarra (Andris), illetve a Budapesti Corvinus Egyetemre (Gergő, majd Andris is), diplomát szereztek (kettőt is: Gergő közgazdász [2004], majd Ph.D., [2009], Andris egyiptológus [2006], majd közgazdász [2008]).

A következőkben érdekesebb tudományos eredményeket mutatom be – vázlatosan.

## **1. Epitóp peptidek, szintetikus immunogének, antigének kutatása**

Az elmúlt közel két és fél évtizedben a fentiekben jelzett predikciós stratégia és kísérletes megközelítések segítségével epitóp fehérjeszakaszokat azonosítottunk (lásd 1.1. fejezet), tanulmányoztuk milyen szerkezeti/kémiai feltételei lehetnek az epitóp funkció kialakulásának (pl. poszt-transzlációs

átalakulások) (lásd 1.2. fejezet). Másrészt előállítottunk oligopeptid epitópokat, származékokat és konjugátumokat annak tanulmányozására, hogy a kémiai szerkezet megváltoztatásával milyen törvényszerűségek mentén javítható az ellenanyag-kötődés, MHC-, illetve T-sejt receptor kötődés, illetve immunogenitás (lásd 1.3. fejezet).

### 1.1. Epitópok azonosítása

A fehérjeepitópok azonosítása az elmúlt évtizedek során hozzájárult a korábban említett HSV D burokfehérje, és a MUC1 glikoprotein antigénszerkezetének megismeréséhez, de lehetővé tette további lineáris és folytonos topográfiás B-sejt (ellenanyag) epitópok, valamint T-sejt epitópok lokalizálást, jellemzését, amint ezt az alábbi két példa demonstrálja.

Dr. M.R. Price professzorral közös vizsgálatainkban meghatároztuk a vastagbél tumorok esetében kimutatott MUC2 glikoprotein egyik lineáris B-sejt epitóp régióját ( $^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$ ) és jellemeztük oldatbeli konformációját. A Furka professzor által kifejlesztett keverés-osztásos kombinatorikus kémiai módszerrel, a glikoprotein TXTXT motívumot tartalmazó szakaszai közül kiválasztottuk a magepitópot ( $^{21}\text{TQTPT}^{25}$ ) és értelmeztük a fehérjegerinc heteroklitikus ellenanyag kötődését.

A *M. tuberculosis* baktérium 16kD és 38kD protein antigénszerkezetek tanulmányozása során – együttműködésben J. Ivanyi (MRC, London) és F. Dieli (University of Palermo) professzorokkal predikciós módszerekkel és átlapoló, majd szubsztituált peptidekkel bizonyítottuk T-sejt epitópok jelenlétét, meghatároztuk a magepitópot és az MHC kötődésben kiemelt szerepet játszó aminosavakat.

### 1.2. A poszt-transzlációs módosulás hatása az ellenanyag felismerésre

A következő két példa segítségével azt vizsgáltuk, miért viselkednek a fehérjék bizonyos szakaszai epitópként, azaz milyen szerkezeti tényezőkre vezethető

vissza az immunfelismerésért felelős molekula részlet megjelenése. Lineáris B-sejt epitópok azonosítása során korábban tisztázták, hogy a poszt-transzlációs módosítás (pl. glikozilezés, citrullináció) kiemelt szerepet játszhat egyes fehérjék immunogenitásában. A tumoros megbetegedéssel összefüggésbe hozható mucin glikoproteinek, illetve az autoimmun betegségekben autoantigénként szerepet játszó fehérjék (pl. filaggrin, fibrin) a poszt-transzlációs módosulás előtt nem viselkednek „idegen” fehérjeként, míg azt követően immunreakciót váltanak ki. Ismeretes, hogy az érintett mucin glikoproteinek egészséges szövetben jelentős mértékben glikozilezettek, míg rosszindulatú megbetegedésekben – nemcsak túltermelődnek, de – a tumoros szövetből izolált fehérje alig tartalmaz szénhidrát oldalláncokat. A fehérjegerinc így hozzáférhetővé válik az immunrendszer számára és mint „testidegen antigén” fehérje immunválaszt indukálhat.

Annak tisztázására, hogy a glikozilezés milyen szerepet játszhat a MUC2 glikoprotein immunfelismerésében, előállítottunk olyan glikoheptapeptideket, amelyekben a  $^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$  peptid egy, kettő, vagy mindhárom Thr oldalláncához monoszacharid egység kapcsolódik. Kimutattuk, hogy akár egyetlen D-glükóz jelenléte jelentősen meghatározhatja a fehérjeszakasz ellenanyag-kötődését. A T<sup>21</sup> oldalláncához kapcsolt D-glükóz például teljesen megakadályozza az ellenanyag - epitóp kötődést. Egy másik megfigyelés arra hívta fel a figyelmet, hogy a rheumatoid arthritis (RA) autoimmun kórképben az arginin (Arg) helyett citrullint (Cit) tartalmazó fehérjék fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Igazolták, hogy a peptidil-arginin-deimináz enzimek katalizálják az Arg/Cit átalakulást, amely bizonyos fehérjékben (pl. fibrin, filaggrin) megváltoztatja a töltésviszonyokat. Ennek hatására módosul a térszerkezet, új fehérjeszakaszok, új, immunválaszt kiváltó epitópok jelenhetnek meg, ami (autoimmun) ellenanyagok bioszintéziséhez vezet.

Együttműködésben Sármay Gabriella professzorasszonnyal és munkatársaival (ELTE Immunológia Tanszék) a filaggrin egyik epitóprégióját

(<sup>306</sup>SHQESTXGXSRSGRS<sup>324</sup>) (X = Cit) vizsgálva megállapítottuk, hogy az autoimmun válasz kiváltásában döntő szerepe van az Arg/Cit átalakulásban résztvevő aminosavak számának és egymáshoz viszonyított elhelyezkedésének. Ezen epitóprégióon belül - az egészséges és RA betegségben szenvedő személyek szérummintáinak összehasonlításával - lokalizáltuk azt a legkisebb peptidszakaszt (<sup>311</sup>TXGRS<sup>315</sup>), amely ellenanyag (B-sejt) epitópként viselkedik és alkalmas lehet a betegség korai és specifikus kimutatására is.

Egy másik, az RA kialakulásban fontos szerepet játszó, esetenként arginin helyett citrullint (X) tartalmazó fibrin fehérje ( $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc) antigénszerkezetét tanulmányozva Dr. Guy Serre professzorral és munkatársaival (CNRS, Université Toulouse 3) folytatott közös kutatásaink során három immundomináns fehérje epitóprégiót azonosítottunk. A fibrin  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncából származó Arg/Cit tartalmú <sup>34</sup>GPRVVXHQSACKDS<sup>48</sup> ( $\alpha$ 36-50) és <sup>60</sup>RPAPPPISSGGYXAX<sup>74</sup> ( $\beta$ 60-74) peptidek szérum ellenanyagkötésének összehasonlító tanulmányozása alapján jelentős különbséget lehetett tapasztalni az egészségesek és betegek mintái között. E tanulmányok, valamint az epitóp orientáció - kötődés elemzés alapján (lásd később) választottuk ki azt az ellenanyag (B-sejt) epitóp peptidet (<sup>60</sup>RPAPPPISSGGYXAX<sup>74</sup>,  $\beta$ 60-74), amelyet „célbajuttató” egységként használtunk egy háromkomponensű biokonjugátum tervezésénél, szintézisének.

### **1.3. Epitópok szerkezetének módosítása: miként befolyásolható az immunfelismerés hatékonysága?**

A fehérjeepitópok felhasználásával olyan kémiai struktúrákat (peptidek, peptid-konjugátumok) lehet létrehozni, amelyek – szerkezetüktől függően – mesterséges (cél)antigénként ellenanyag, illetve T-sejt válasz kimutatására, ezáltal egyes betegségek (például HSV fertőzés, tumor, autoimmun betegségek) korai diagnosztikájára és/vagy a kezelés hatékonyságának monitorozására lehetnek alkalmasak. Más konstrukciók hatékony védelmet alakíthatnak ki



például bizonyos tumoros megbetegedések, vírus-, baktérium vagy parazita fertőzéssel szemben, vakcinaként működhetnek.

Kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy szisztematikusan módosított szerkezetű epitóp peptidekkel (pl. gyűrűbe zárt, a lebegő szakaszokkal átalakított, D-aminosavval szubsztituált) vagy konjugátumok révén sokszorozott származékokkal, miként befolyásolható az immunfelismerés hatékonysága (ellenanyag-kötődés, MHC- illetve T-sejt receptor kötődés, illetve immunválasz), illetve milyen lehetőségek nyílnak más, releváns biológia tulajdonságok (pl. védelem a gyors enzimatis lebomlás ellen) kialakítására. A lehetséges stratégiákat és az elért eredményekből nyújt válogatást az alábbi összefoglalás.

A HSV D glikoprotein (gD-1) N-terminális szakaszán lokalizált B-sejt epitóp szakasz (<sup>9</sup>LKMADPNRFRGKDL<sup>22</sup>) béta-kanyar másodlagos szerkezetet vesz fel receptor kötődése során. A kétféle általunk tervezett és szintetizált **ciklusba zárt változat** azonban, a lineáris peptidhez képest, három nagyságrenddel csökkent ellenanyagkötődést mutatott. Ugyanakkor ciklusos szerkezet kedvezően befolyásolja az epitóp peptid enzimatis lebomlását lizoszóma preparátumban. Az ugyancsak a HSV gD-1 fehérjén azonosított epitópot tartalmazó peptid (<sup>278</sup>LLEDPVGTVA<sup>287</sup>) ciklusos származékai a ciklust létrehozó kovalens kötéstől függően jóval nagyobb stabilitást mutattak, mint a lineáris változat: tioéter > amid > diszulfid kötés.

Az epitóp peptidek szerkezetét az epitóp sajátosságért (specifikus kötődés) felelős epitóp „mag” N- és C-terminálisán elhelyezkedő **„lebegő” régiók kicserélésével** szintén át lehet alakítani. Ezzel a „mag” szakasz ellenanyag kötődése B-sejt epitóp esetében vagy MHC-, illetve T-sejt receptor kötődése a T-sejt epitóp esetében megváltoztatható. Kísérleteink bizonyították, hogy a „lebegő szakaszok” kialakíthatóak úgy, hogy az optimális kötődés megtartása mellett a peptid enzim-rezisztens legyen szérumban és lizoszomális enzimekkel

szemben is. Kimutattuk, hogy a MUC2 glikoprotein egyik B-sejt epitóp peptidben (TPTPTGTQTPT) a „magot” (PTGTQ) körülvevő L-aminosavak egy részét D-izomerre cseréljük (tpTPTGTQtp, ahol a kisbetű a D-izomer), akkor e peptid megtartotta teljes ellenanyag kötődését és nem bomlik le testfolyadékokban.

Megfigyeltük, hogy a lineáris B-sejt epitóp peptidek, illetve a T-sejt **epitóp peptidek sokszorozása** előnyösen befolyásolhatja az ellenanyag, illetve T-sejt felismerést. A HSV gD-1 fehérje epitópot tartalmazó <sup>9</sup>LKMADPNRFRGKDL<sup>22</sup> peptid és makromolekuláris hordozóhoz kapcsolt származékai - a hordozó szerkezetétől függően, azonos szubsztitúció fok mellett - az ellenanyag kötődés mértékét javították (pl. szekvenciális oligopeptid vagy elágazó láncú Leu tartalmú polipeptid alkalmazásakor) vagy akár két nagyságrenddel csökkent (pl. KLH fehérje hordozó esetén).

Kimutattuk a specifikus immunválasz hatékonysága függ attól, hogy az előzetes immunizáláshoz szabad vagy konjugált epitóp peptidet, illetve milyen szerkezetű polipeptidet választottunk.

Halálos dózisú HSV vírussal fertőzött egerek túlélése jelentősen nőtt attól függően, hogy a konjugáláshoz milyen hordozót használtunk. A HSV gD-1 B sejt epitóp konjugátum immunválaszát egerekben a hordozó polipeptid szerkezete jelentős mértékben meghatározta. A vakcináció ez esetben az állatok 50 %-át megmentette a pusztulástól.

A *M. tuberculosis* fertőzés/érintettség kimutatására a baktérium 38 kDa, illetve 16 kDa fehérje több T-sejt epitóp régiót tartalmaz. Ha az általunk tanulmányozott szakaszoknak megfelelő epitóp peptideket (rende <sup>350</sup>DQVHFQPLPPAVVKLSDALI<sup>369</sup>, illetve <sup>91</sup>SEFAYGSFVRTVSLPVGAD<sup>110</sup>) elágazó láncú polipeptiddel vagy ugyanazzal az elágazó polipeptiddel konjugáljuk és PPD+ személyek limfocitáinak T-sejt válaszát tanulmányozzuk, azt vehetjük észre, hogy a „szabad” peptiddel szemben az egyféle vagy még inkább a kétféle

epitópot tartalmazó konjugátum jelentős specifikus immunválaszt vált ki és ezáltal jelzi az érintettséget.

Egy másik kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a kapcsolt epitóp peptid orientációja (N-C vagy C-N) az ellenanyagkötődést. Ennek érdekében olyan biokonjugátum-sorozatokat szintetizáltunk, amelyben a filaggrinból származó (hosszabb) epitóprégió peptid ( $^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}$ ) vagy egy (rövidebb) epitóp peptid ( $^{311}\text{TXGRS}^{315}$ ) N- vagy C-terminálisához biotint kapcsoltunk.

A konjugátum avidinkötődési tulajdonságának megőrzését az biztosította, hogy a biotin és az epitóp peptid között 6-aminohexánsav „távolság-tartó” részlet került beiktatásra. A négy vegyületet összehasonlítva megállapítottuk, hogy a hosszabb epitóprégió peptidet tartalmazó két konjugátum ( $^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}\text{K}$ -biotin és biotin- $^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}$ ) egyaránt kötődött az RA betegekből származó szérum ellenanyagokhoz. Ugyanakkor a rövid epitóp peptid tartalmú biokonjugátumok között jelentős különbség volt észlelhető: a biotint az N-terminálison tartalmazó (biotin- $^{311}\text{TXGRS}^{315}$ ) peptidet nem ismerte fel az ellenanyagminta, míg a C-terminálisra beépített biotin ( $^{311}\text{TXGRS}^{315}$ -biotin) nem zavarta az ellenanyagkötődést.

E kísérleti eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy az epitóp orientációja (N-C vagy C-N) meghatározó lehet a sokszorozás (pl. hordozó polipeptidhez vagy szilárd felszínhez, ELISA lemezhez történő kovalens kötés) során az ellenanyag kötődésében, s ez hatékony immundiagnosztikumok kialakításánál döntő szempont lehet.

A fenti példák jelzik, hogy a peptid epitópok szerkezetének módosításával (pl. gyűrűbe zárás, a lebegő szakaszok átalakítása, sokszorozás) növelni lehet az immunfelismerés hatékonyságát, valamint az immunválasz kiváltó képességet.

A megfelelően kialakított származékok alkalmassá tehetik e peptideket, peptid-konjugátumokat tumoros (emlő, vastagbél karcinoma), fertőző (HSV, *M. tuberculosis*), valamint autoimmun (RA, Crohn szindróma) betegségek korai kimutatására, a kezelés eredményességének monitorozására és esetenként vakcinációval történő megelőzésére. Kutatásaink az „érdeklődés-vezérelt” alap kutatások csoportjába tartoznak. Adataink azonban – reményeink szerint is – hozzájárulhatnak a korszerű diagnosztika és/vagy terápia eszköztárának bővítéséhez.

## 2. Célbajuttatás fehérje- vagy peptid-biokonjugátumokkal

Az elmúlt időszakban a kutatás másik iránya azt vizsgálja, milyen feltételek teljesülése szükséges ahhoz, hogy egy hatóanyag (pl. gyógyszer, enzim inhibitor) vagy jelzőmolekula (pl. fluorofór) az érintett (cél)sejtbe jusson úgy, hogy egyidejűleg ne veszélyeztesse az egészséges sejteket. A molekulaszervezet és a „célbajuttató” sajátság közötti összefüggések feltárása során egyfelől figyelembe kell venni a célsejt (pl. tumorsejt vagy fertőzött sejt) és az egészséges sejtek közötti szerkezeti, működésbeli különbségeket. Másfelől olyan új molekulákat biokonjugátumokat kell tervezni, szintetizálni, amelyek jellemzően a célsejteken fejtik ki hatásukat. Ezek – egyszerű esetben – két alkotórészből állnak: az egyik komponens például olyan fehérje, elágazó láncú polimer polipeptid vagy oligopeptid, amely képes kötődni és bejutni a „célsejtbe”. A másik alkotórész a sejt elpusztítására/jelzésére – kis mennyiségben is – képes vegyület. A kutatás célja e két alkotórész „azonosítása” és annak kikísérletezése, hogy a konjugálás során mely molekularészt lehet a másikhoz úgy kapcsolni, hogy egyik partner se veszítse el funkcióját.

Az eredeti tudományos közleményeket közlő, 1990-be induló ACS Bioconjugate Chemistry folyóirat megjelenése integrálta a sokféle tudományterületről származó eredményeket, amikor definiálta a biokonjugátum fogalmát

(<http://pubs.acs.org/journal/bcches>) és lehetőséget adott olyan szintézismódszerek, kémiai/biológiai analitikai eljárások közlésére. A biokonjugátum olyan vegyület, amely két- vagy több partner molekulát kovalens kötéssel kapcsol össze úgy, hogy a komponensek a kötés létrehozása után is megőrzik eredeti funkcionális sajátságait, amelyek motiválták a kovalens kapcsolatot. Ilyen tulajdonságok lehetnek: a „riporter” sajátság (pl. kromofór/fluorofór jelleg, radioaktivitás), a kötődési/felismerési képesség (pl. enzim-szubsztrát, hormon-receptor, ellenanyag-antigén) vagy az *in vitro/in vivo* kifejtett „biológiai” hatás (pl. citosztatikus/citotoxikus hatás, sejtbejutási képesség, vagy a specifikus immunválaszt kiváltó képesség, farmakokinetikai sajátság).

A kémikus számára e követelmény teljesítése komplex feladatot jelent. Egyrészt azonosítani kell a partner vegyületeknek azon részeit (funkciós csoportokat, régiókat), amelyek részt tudnak venni a konjugálási folyamatban, azaz nem felelősek a megőrzendő – funkcionális tulajdonságért. Másrészt, olyan kémiai kötést kell kiépíteni a partnerek között, amely kellően stabil és nem befolyásolja a partnerek jellemző, a funkcionális sajátságokért felelős szerkezeti elemeit. A kísérletező a lehetséges reakciókörülmények (pl. hőmérséklet, fény, oldószer, sav/bázis érzékenység) által meghatározott „kémiai teret” (chemical space) jelentős mértékben csökkenteni kényszerül. Ügyelnie kell arra is, hogy a célvegyület tisztítása során „enyhe” körülményeket használjon.

A fentiekből érzékelhető, hogy a biokonjugátumok tervezése, szintézise, jellemzése multidiszciplináris megközelítést követel meg, amelyben a szerves kémiai kompetencia jelentősen kiegészül. A biokonjugátumok kutatását jelentősen motiválja a széleskörű alkalmazás is: az alaptudományokban, az életjelenségek sejtszintű vizsgálatától a gyógyszerkutatásig, a korszerű molekuláris diagnosztikától a teljes test képalkotó technikák fejlesztéséig. A következőkben néhány példán, a peptid-biokonjugátumok, illetve komponenseik

kutatása során feltárt új törvényszerűségeket, eredményeket mutatom be – a teljesség igénye nélkül.

Hatóanyagok „célsejtbe juttatásának” koncepcióját Paul Ehrlich fogalmazta meg (Nobel-díj, 1908) ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1908/ehrlich-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrlich-bio.html)). A kifejezést („Zauberkegel”, „mágikus golyó”) Carl Maria von Weber „A bűvös vadász”, „Der Freischütz”) című operájából kölcsönözte. Napjainkra az elv a gyógyszerkutatás egyik stratégiai fontosságú irányává vált. Amennyiben a kiválasztott vegyület csak a „beteg” sejtbe jut, csökkenhetnek a mellékhatások, kisebb lehet a terápiás dózis, javulhat a terápiás hatékonyság.

A hordozók, amelyekhez kovalens kötéssel kapcsolódik hatóanyag és/vagy riporter molekula két csoportba oszthatók: az egyik típus (pl. monoklonális ellenanyag, hormon, epitóp) rendelkezik a célsejtet felismerő szerkezettel (pl. receptor, akceptor, enzim) és képes specifikusan kötődni. A másik csoportba tartoznak azok a vegyületek, amelyek nem rendelkeznek sejt felismerő szerkezeti egységgel (vagy az még nem ismert), de sejtbe történő felvételük – valamilyen oknál fogva – egyes sejt típusok részéről kedvezményezett, s így a hozzájuk kapcsolt molekula („cargo”) e sejtekben nagyobb koncentrációban lehet jelen.

Kutatásaink (szintézis, szerkezeti/funkcionális jellemzés) párhuzamosan folytak/folynak polipeptid (elágazó láncú és szekvenciális polipeptidek), illetve oligopeptid (pl. sejtpenetráló peptidek, MHC ligandum/T-sejt epitóp) hordozókkal. A kialakított biokonjugátumok közös sajátossága, hogy a „cargo” jellemzően tumorelles (pl. antraciklin, folsav-antagonista, hormon-antagonista, vinka alkaloid, ferrocén származék) vagy antimikrobiális (pl. izoniazid, metotrexát) hatású kemoterápiás szer, illetve riporter molekula (fluoreszcein, oxazon származék, kelátor) sajátosságú vegyület.

## 2.1. Makromolekuláris, polipeptid tartalmú biokonjugátumok

Az elágazó láncú polimer polipeptid hordozók csoportjában az egyes vegyületek egymástól meghatározott tulajdonságokban (pl. töltés, oldatbeli térszerkezet) eltérnek. Ez a szisztematikusan megválasztott molekulákból álló csoport lehetőséget adott annak tanulmányozására, hogy a hordozó hogyan befolyásolja a hozzá kovalensen kapcsolt „cargo” tulajdonságait? A molekulaszervezet (a hordozó felépítése, a kötéstípus a hordozó és „cargo” molekularész között) és a biológiai hatása közötti összefüggések feltárása lényegét tekintve a „felfedező kutatás” igazi célja és öröme. Az összefüggések alapján előállított, a korábbi törekvéseknél hatékonyabbnak mutakozó vegyületek, pl. a tumorellenes szert (Dau), vagy a *Leishmania donovani* parazitafertőzés elleni szert (MTX) tartalmazó konjugátumok új irányokat jelölhetnek ki, vagy létező irányokat erősíthetnek meg a gyógyszerkutatás ezen területein.

Az amfoter sajátságú, oldallánc végeken Glu aminosavat tartalmazó elágazó láncú polipeptiddel konjugált daunomicin (cAD-EAK) L1210 leukémiában szenvedő egereken végzett állatkísérletekben teljes túlélést eredményezett. A kezeletlen vagy csak daunomicinnel (Dau), illetve a polipeptid és Dau keverékével kezelt állatok 10-24 napon belül elpusztultak. Ezzel szemben, az azonos dózisú kezelés, amelyet az oldallánc végeken Ser aminosavat tartalmazó, polikationos polipeptidhez – azonos kötéssel – kapcsolt daunomicinnel (cAD-SAK) végeztünk, nem eredményezett túlélést, az állatok 24 napon belül elhaltak. E megfigyelés világosan dokumentálja a hordozó molekula komplex szerepét a Dau tumorellenes hatására nézve.

A hatás különbség elemzésére irányuló kutatások eredményei arra utaltak, hogy a kétféle konjugátumból (cAD-EAK vs. cAD-SAK) – azonos körülmények között – lényegében azonos kinetika szerint szabadul fel a hatásért felelős Dau és hasonló mértékű a különböző sejtvonalakon tapasztalt *in vitro* citoxikus hatás is. Jelentős különbséget lehetett észlelni ugyanakkor a sejtfelvétel mértékében sejtkultúrákban *in vitro*, illetve a biodisztribúció jellemzőiben *i.v.* kezelés után

(véráramban eltöltött idő, szöveti megoszlás). Ezek az egybeesések és különbözőségek megegyeznek a polipeptid hordozók esetében leírtakkal, azaz a konjugátumok sajátságaira a hordozó molekularész markáns hatással van.

A *Leishmania donovani* parazita fertőzés elleni szert (metotrexát, MTX), valamint elágazó láncú, polikationos sajátságú polipeptid makromolekulát tartalmazó konjugátumok hatásának összehasonlító vizsgálata szerint a polikationos polipeptidek oldalláncának felépítése fontos szerepet játszik az fertőzés ellenes hatás létrejöttében. A kezeletlen, a szabad vagy polipeptid + MTX keverékkel kezelt állatokhoz képest, az MTX – ALK konjugátum, amelyben a Leu aminosav a polilizin gerinchez közel helyezkedik el, a parazitaszám drámai csökkenését eredményezte *in vitro* és *in vivo*.

Az *in vivo* kísérletek jelentős különbségeket mutattak a konjugátumok (tumorellenes, illetve *L. donovani* fertőzés ellenes) hatásában. Újabb kísérleteink arra utalnak, hogy a szabad hatóanyag vagy az elágazó láncú polipeptiddel konjugált származék felvétele a sejtek (pl. szenzitív, illetve rezisztens tumorsejtek, makrofágok) részéről egymástól eltérő mechanizmus szerint valósul meg. A szintetikus polipeptid konjugátumok folyadék fázisú endocitózissal jutnak a sejtbe. Kimutattuk azt is, hogy e konjugátum család esetében – a hordozó szerkezete által meghatározott mértékben – az A típusú scavenger receptor is részt vesz a folyamatban.

## 2.1. Oligopeptid biokonjugátumok

A sejtpenetráló peptidok leírását követően, az irodalom áttekintése után, felmerült a kérdés: vajon milyen eredményre vezethet ugyanannak a vegyületnek (pl. Dau, folsav antagonist) célsejtbe juttatása különböző „architektúrájú” peptid típusú vegyülettel? Milyen különbségek azonosíthatók az elágazó láncú polipeptidhez, sejtpenetráló vagy sejtfelszíni receptorhoz specifikusan kötődő oligopeptidhez kapcsolt hatóanyag sejtfelvétel között?



Szerkezet-hatás összefüggések elemzésére sejtpenetráló oligopeptidek konjugátumait állítottuk elő tumorellenes hatású vegyületekkel (daunomicin, fólsvav antagonist, ferrocén származék, illetve vinblasztin), valamint enzim aktivátor/szubsztrát/inhibitor származékokkal vagy „riporter” molekulával. A hatásos vegyületek esetében ígéretes első lépéseket tettünk a mechanizmus tisztázására is (pl. a tubulin rendszerre gyakorolt hatás, kalpain aktiválás).

Újabb kísérleteinkben, az ErbB2 receptor ligandumát az LTVSPWY oligopeptidet és Dau-t tartalmazó konjugátum állítottunk elő. Az ErbB2 receptor fokozott expresszióját figyelték meg bizonyos (pl. HER2 receptor pozitív emlő) tumorok esetében, ligandumát fágtár stratégia segítségével azonosították. A konjugátum felhasználásával azt kívántuk vizsgálni, hogy mennyiben tér el tumorsejt fehérje-expressziós profil a szabad és konjugált Dau kezelés esetében az érzékenyen reagáló HL-60 humán leukémia sejteken. A kezelést követő proteomikai analízis világosan kimutatta, hogy a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum, illetve a szabad Dau kezelt sejtek – a kezeletlen kontroll sejtekhez képest – más fehérjéket, más mennyiségben szintetizálnak.

A szabad Dau-val és a célfelismerő egységgel rendelkező konjugátummal kezelt HL-60 humán leukémia sejtek közötti különbség igen markánsnak bizonyult. A három fehérje közül kettő [proliferating cell nuclear antigen (Cyclin), protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP-1)] több mint 10-szer nagyobb, míg a tubulin beta-5 chain fehérje 5-ször kisebb mértékben jelent meg a konjugátummal kezelt sejtek lizátumában, a szabad Dau kezeléshez képest. A kezelt sejtek fehérje mintázata nemcsak egymástól, de a kezeletlen sejtektől is jelentős mértékben különbözik. Érdemes megjegyezni, hogy a „receptor-felismerő” egység lecserélése a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátumban sejtpenetráló tulajdonságú oligopeptidre (pl. oktaargininre) más fehérjemintázatot eredményez újabb és eltérő mechanizmusú sejtbejutást valószínűsít.

E vázlatos áttekintés is jelzi, hogy a proteomikai megközelítési módszer lehetőséget adhat a hatásmechanizmus (szabad vs. konjugált hatóanyag) megértésére, valamint fehérje célpontok, bioszintetikus utak felfedezésére, s új utakat nyithat a gyógyszer-hatóanyag célpontok azonosításában.

A fentiekben is érintett eredményeink arra utaltak, hogy a szabad hatóanyag és fehérjével, elágazó láncú polipeptiddel vagy selt penetráló peptiddel (pl. oktaarginin) konjugált származékok hatása és sejtekbe történő bejutása egymástól eltérő mechanizmus szerint valósul meg. A Dau kismolekulaként diffúzió útján, a receptor felismerő egységgel bíró ellenanyag konjugátum receptor mediált endocitózissal, míg a különböző szintetikus polipeptid konjugátumok – a hordozó szerkezete által meghatározott módon – pl. az „A típusú” scavenger receptor bekapcsolódásával vesz részt a folyamatban.

### **3. Célbajuttatás B-sejt epitóp felismerés alapján**

Az epitóp peptidok azonosítása, szerkezeti módosítása alapján újabban egy olyan célbajuttató háromkomponensű, nanorészecskét tartalmazó peptid biokonjugátum konstrukciót alakítottunk ki, amely képes elpusztítani azokat a B-sejteket, amelyek az autoimmunválasz során keletkező citrullinált fibrin epitópspecifikus ellenanyagokat állítják elő és új távlatokat nyithat a RA betegek kezelésben. E konjugátumcsalád létrehozása és jellemzése a Kutatócsoport (Dr. Magyar Anna, Dr. Uray Katalin), Prof. Kiss Éva (ELTE Kémiai Intézet, Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma), Prof. Sármay Gabriella (ELTE Immunológia Tanszék) és munkatársaik közös eredménye.

A biokonjugátumban biodegradábilis poli(tejsav-glikolsav) + pluronic sav kopolimer nanorészecskéhez kapcsolódik az az oligopeptid, amely felismeri a célsejtet, specifikusan kötődik a receptorhoz és egy másik oligopeptid, amely a célsejt elpusztításáért „felelős”. Azokat a B-sejteket vettük célba, amelyek a fibrin  $\beta$ -láncból származó  $^{60}$ RPAPPPISSGGYXAX $^{74}$  ( $\beta$ 60-74) epitóp-specifikus és a RA autoimmun betegség kialakulásában szerepet játszó autoellenanyag

fehérjéket termelik. Ezen sejtek felszínén ugyanis – a célsejtre jellemző – receptorok vannak, amelyek ezt az epitóp peptidet ismerik fel, kötődnek hozzá.

Az előző fejezetben leírtuk, hogy az epitóp peptid orientációja befolyásolhatja az ellenanyaghoz (célsejthez) való kötődést. E megfigyelésre való tekintettel az epitóp peptid orientációját úgy választottuk meg, hogy a nanorészecskéhez kapcsolást követően is megőrződjön az ellenanyag-kötődési képesség. A peptid ( $\text{NH}_2\text{-}^{60}\text{PAPPPISSGGYXAX}^{74}\text{-CONH}_2$ ) szabad N-terminális aminocsoportján keresztül N-C orientációban – savamid kötéssel – történt a kovalens kötés kialakítása. A konjugátum harmadik alkotórésze a sejt elpusztulását, komplement aktiváló sajátsága révén előidéző, a HIV gp 120 glikoproteinből származó, az irodalomban leírt fehérjeszakasz aktivitásért felelős peptid ( $^{233}\text{CNNKTFNGTGPCTNVS}^{\text{N}251}$ ) konjugálásra kialakított származéka lett C-N orientációban.

A funkcionális kísérletek arra utalnak, hogy a három-komponensű, biodegradábilis konjugátum a) kötődik a fibrin  $\beta$ -lánc  $\beta 60\text{-}74$  epitóp peptid specifikus IgG ellenanyaghoz és az RA betegből származó B-sejtekhez, b) aktiválja a komplement rendszert és ennek következményeként, c) elpusztította *in vitro* azokat a B-sejteket, amelyek fibrin  $\beta$ -lánc  $\beta 60\text{-}74$  epitóp peptid specifikus ellenanyagot (autoellenanyag) termelnek.

#### 4. Kitekintés

A fenti rövid és vázlatos ismertetés jelzi, hogy a terület, mind biomolekuláris kémiai, mind pedig gyógyszer- és vakcina-kutatási vonatkozásban nemzetközileg fontosnak és eredetinek tekinthető. A biokonjugátumok és alkotórészeik kutatása terén elért eddigi eredményeink izgalmasak és biztatóak. Az ELTE Doktori Iskola keretében témavezetőként tizenhat esetben segíthettem Ph.D. dolgozat, több mint 35 esetben szakdolgozat megszületését, a hallgatók TDK munkáját. Eredményeink elismerésének is tekinthető, hogy 1998-tól az ACS Bioconjugate Chemistry „Advisory Board” tagjaként, 2007 és 2014 között pedig

Associate Editorként vehettem részt a szakterület vezető folyóiratának munkájában, ahol 25 cikket közölhattünk. Több mint 70 alkalommal kértek fel meghívott előadóként nemzetközi tudományos konferenciákon (pl. Angliában, Japánban, Koreában, Kínában, Svájcban, az USA-ban). Az eredményeket MTA Akadémiai Díjjal (1996), 1999-ben az ELTE TTK Tudományos Díjával (1999), az MTA Zemplén Géza fődíjjal (2005), majd az MTA Bruckner Győző díjjal (2008), MTA tagjává történt megválasztással (2010, 2016) és más kitüntetésekkel ismerték el. Vendégprofesszor lehettem több egyetemen (pl. Konstanzi Egyetemen, Osakai Egyetem, Helsinki Egyetem) megválasztottak a European Peptide Society elnökének (2010-16).

1977 óta tanítok az egyetemen, az utóbbi 25 évben biológusok számára adok elő szerves kémiát; a vegyészeknek gyógyszerkutatással és biokonjugátumokkal kapcsolatos előadásokat. Angol és spanyol kollégákkal az egyik első magyarországi TEMPUS (1989-1992) és több COST projekt koordinátora/meghívott résztvevője voltam. Az Erasmus-program keretében – 1998-tól – diákjaim német, angol, spanyol és finn egyetemekre jutottak/jutnak el. Fontosnak tartom a nemzetközi tapasztalatszerzést, a diákok és oktatók bekapcsolódását a TEMPUS/ERASMUS és más, kutatási programokba. Öröm számomra, hogy munkámat az ELTE Eötvös József Collegiuma „Eötvös Collegiumért emlékéremmel” ismerték el (2016).

## **Epilógus**

Gergő megnősült (2015) és feleségével, Dórizal, lányukkal, Lilivel (2016) Londonban élnek. Andris feleségül vette Katit (2016), Brüsszelben élnek és dolgoznak. Szakmájukban, eredménnyel.

## **Üzenetek**

1. A leírtakból talán látszik, hogy e kutatás nemcsak szellemi izgalmat vált ki a kutatócsoport tagjaiból, egyetemi hallgatókból, hanem igencsak hasznos: lehetővé teszi a betegség korai felismerését, gyorsabb gyógyulás, kevesebb és

kevésbé kíméletlen mellékreakció ígéretét rejti magában a daganatos és fertőző betegségek kezelésében.

2. Fontosnak tartom azt a szemléletet és kutatói magatartást, amelyet Ritoók Zsigmond akadémikus egy interjúban fogalmazott meg: „De attól félek, a kevés dologhoz sem lehet úgy érteni igazán, hogy az ember az egésznek a látását elveszíti a szeme előtt.” (Magyar Tudomány, 2009: 1246)

3. A kutatók felelőssége nagy, magatartásuk példaértékű minta lehet: remélem, hogy képesek leszünk jobban megérteni, miért „viselkedik” másként a másik, milyenek az értékei, és miért azok. A tudományos elemzések segíthetik legyőzni a xenofóbiát, a „mástól”, az „ismeretlentől” való félelmet, elutasítást; a tanulás/tanítás folyamatának megértését és lehetőségeinek/korlátainak felmérését a XXI. századi körülmények között; az eligazodást a digitális generációk világában, az értékek felismerését, megőrzését és új értékek létrehozását.

## Utószó

Az MTA székfoglaló előadások szövege olvasható a Magyar Kémiai Folyóiratban (2012, 2017) megjelent/megjelenő számaiban. További tájékozódást nyújthatnak a 2012-ben megjelent rövid közlemények, amelyek az MTA-ELTE Peptidkémiai kutatócsoportban elért, vonatkozó eredményeket foglalták össze:

Hudecz, F. (2012) „Peptid-út”: a Trefort-kerttől Lágymányosig. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **118 (1)**: 5-16

Hudecz, F. (2017) Biokonjugátumok – összefogni érdemes. *Magyar Kémiai Folyóirat*, (in press)

Hudecz, F. (2012) Néhány új eredmény az MTA-ELTA Peptidkémiai Kutatócsoportban. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **118 (2-4)**: 87-88 (2012).

További információk a honlapomon: <http://peptid.chem.elte.hu/hudecz.html>, a csoport publikációi: <http://peptid.chem.elte.hu/publikaciok.html> érhetők el.

## FOSZFORILÁLNI VAGY DEFOSZFORILÁLNI: AZ ITT A KÉRDÉS!

**Kármán Zoltán, Nagy Zsuzsánna és Lipinszki Zoltán**

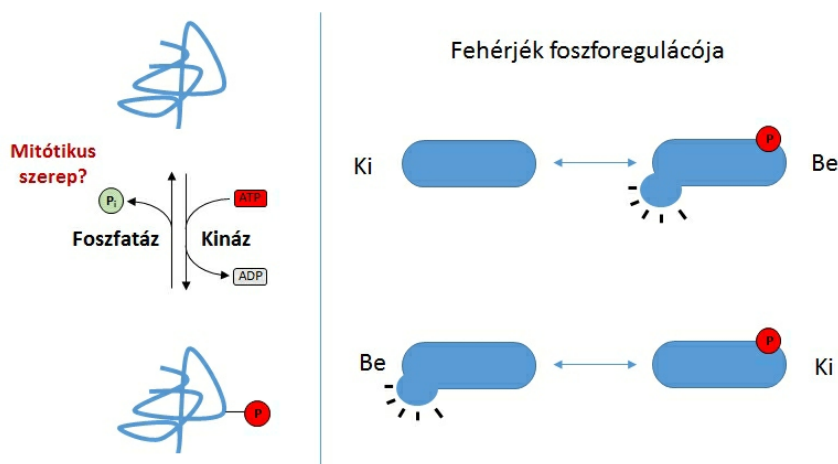
*MTA SZBK Biokémiai Intézet, Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoport*

### **A sejtosztódás szabályozása**

Az eukarióta sejtek osztódása, amely lehet számtartó (mitózis) és számfelező (meiózis) alapfeltétele az egyedfejlődésnek, többsejtű élőlények kialakulásának, szöveti differenciálódásnak és regenerációnak, valamint a fajfenntartásnak – magának az életnek. Az osztódni képes sejt életciklusának leghosszabb szakaszában, az ún. interfázisban a sejt megduplázza genomját (és egyéb struktúráit), és elvégzi a DNS szintézis során keletkezett hibák kijavítását. Ezt követően a sejt felkészül a fizikai kettéosztódásra, amely a sejtciklus legrövidebb szakaszában, az ún. mitózis fázisában megy végbe. A mitózis során az anyasejt két utódsejtbe rendezi a már megkettőződött és egyenlő arányban szétválasztott genomját, így biztosítva a genetikai integritást az organizmus élete során. A sejtciklus hibás működése génmutációk, kromoszóma szerkezeti és számbeli eltérések és egyéb anomáliák kialakulását eredményezheti, melyek fejlődési rendellenességek, neurodegeneratív elváltozások vagy sejtproliferációs betegségek (pl. a rák) kialakulásához vezethetnek. Ezért fontos megismerni és megérteni, hogy milyen molekuláris folyamatok vesznek részt a sejtciklus és annak különféle fázisainak szabályozásában.

A sejtosztódási ciklus szigorúan szabályozott, melynek minden lépését precízen, magas fidelitással kell végrehajtani. E folyamatban kritikus szerepe van több száz fehérjének (és más makromolekulának), melyek katalitikus aktivitása, fizikai jelenléte és megfelelő működése meghatározó a sejtosztódás számára. Némelyek szerkezeti alkotóelemei szupramolekuláris képződményeknek, mint a kromoszómák, a centroszóma pár, a kinetokór vagy a centroméra. Mások katalitikus aktivitással rendelkező enzimek, melyek a szupramolekuláris

képződmények kialakulását irányítják, fehérjemolekulák működését, szubcelluláris elhelyezkedését, szállítását, lebontását vagy stabilitását szabályozzák.

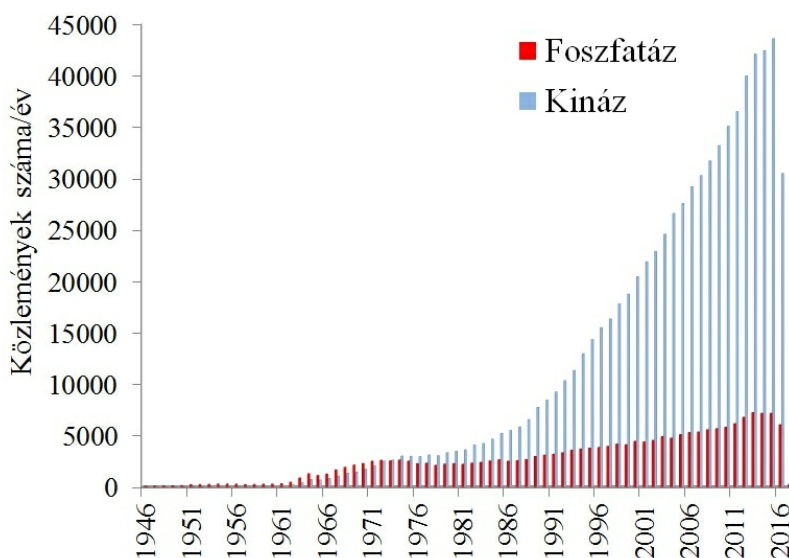


**1. ábra. A foszforiláció folyamata és hatása a célfehérjére.** A fehérjék foszforilációját kinázok katalizálják, míg defoszforilációjukért foszfatázok felelősek. A foszforilált célfehérje térszerkezeti változáson megy keresztül, mely a funkcióját is megváltoztathatja (pl. ki- vagy bekapcsolhatja egy enzim aktivitását).

A sejtciklus és különösképpen a mitózis szabályozásában kiemelkedő szerepe van az ún. fehérje foszforilációnak, amely az egyik leggyakoribb fehérjéket érintő reverzibilis poszt szintetikus módosítás. A foszforiláció során a célfehérje tirozin, szerin vagy treonin aminosavainak oldalláncához egy negatív töltésű foszfát csoport kapcsolódik, melyet fehérje kinázok katalizálnak. Eltávolításában pedig a fehérje foszfatáz enzimek vesznek részt (1. ábra). Foszforiláció jelenlétében vagy hiányában megváltoznak a szubsztrátum fizikokémiai tulajdonságai, amelyek a célfehérje sejtben vagy mitotikus struktúrákon belüli elhelyezkedését, aktivitását (ki- vagy bekapcsolás) (1. ábra), kölcsönható partnereinek összetételét vagy féléletidejét is meghatározhatják. A fehérje foszforilációs mintázata ugyanakkor eltérő is lehet attól függően, hogy melyik kináz módosítja és mely sejtciklus stádiumban, így egyetlen fehérje több különböző funkciót is betölthet e szabályozásnak köszönhetően. A foszforiláció tehát mintegy molekuláris kapcsoló játszik szerepet a sejtosztódás folyamatainak finomhangolásában.

## A fehérje foszfatázok - nehézségek

Tudománytörténeti érdekességnek számít, hogy míg a sejtosztódásban szerepet játszó mitotikus kinázok működéséről viszonylag nagy ismeretanyaggal rendelkezünk, ismerjük specifikus szubsztrátumaikat, szabályozásukat és működésük molekuláris részleteit [1-2] (persze nem minden esetben), alig tudunk valamit az ellentétes hatású fehérje foszfatázok szerepéről. Ennek egyik fő oka, hogy a fehérje foszfatázokat látszólag sokkal kevesebb érdeklődés övezte az elmúlt évtizedekben, mint a kinázokat, ami jól látható a megjelent közlemények számában is (2. ábra). Míg a kináz terület „exponenciális robbanás” ment keresztül, addig a foszfatázokról szóló munkák lassan gyarapodnak, és jóval lemaradnak a kinázok után. Ez azért is meglepő, mert az első foszfatázt évekkal előbb leírták mint, az első kinázt [3]. Mi lehet ennek a jelenségnek az oka?



**2. ábra. A kináz és foszfatáz területen közölt kutatómunkák gyakoriságának összehasonlítása.**

A történelmi okok között megemlíthető, hogy hosszú évekig az a téves elképzelés élt, hogy a fehérje foszfatázok háztartási enzimek, melyek mindenféle specifitást mellőzve, az újukba került összes foszforilált fehérjét defoszforilálják. Ma már tudjuk, hogy ez képtelenség, hiszen valamennyi foszfatáz enzim szigorúan meghatározott szubsztrátumkörrel rendelkezik, ideértve más fosz-



fatázokat [4-5] és kinázokat is [6-7]. A mitótikus kinázok többsége (auto)foszforiláció révén válik katalitikusan aktívvá, ezért adja magát a feltételezés, hogy a foszfatázok fontos szerepet játszanak a kinázok működésének szabályozásában is. Ma már tudjuk, hogy számos onkogén hatású mitótikus kináz [8] aktivitását valóban foszfatázok tartják kordában, ezért nem meglepő, hogy ezek az enzimek nagy érdeklődésre tettek szert az utóbbi években, s némelyiket potenciális tumorterápiás célpontként tartják számon [9-10].

A fehérje foszfatázok lassú megismerésének valódi oka azonban inkább technikai eredetű. A humán genom közel 500 kináz-aktivitású fehérjét kódol (szemben a 200 foszfatáz-aktivitású fehérjével [11]), melyek mind nagyon hasonló biokémiát alkalmazva működnek. A szubsztrátumhoz és foszfátdonorhoz való kapcsolódást követően a kináz szerkezeti változáson megy keresztül, amelyet a célfehérje gyors foszforilációja és disszociációja követ. Ezzel szemben a foszfatáz-aktivitással rendelkező fehérjék különféleképpen evolválódtak, mely különböző szerkezetű aktív centrumok kialakulásához vezetett, így teljesen más típusú katalitikus mechanizmus alkalmazásával működnek. Ez megnehezíti a velük végzett munkát a kutatásukhoz alkalmazható metodikák (ha egyáltalán rendelkezésre állnak) sokszínűsége miatt. Továbbá a legtöbb foszfatáz-aktivitású fehérje (katalitikus fehérje/alegység) szerkezeti komplexitást mutat, azaz különféle regulátor alegységekkel két vagy három (esetleg több) alegységes holoenzim komplexumot alkot. A regulátor alegységek feladata a katalitikus fehérje stabilitásának és aktivitásának szabályozása, sejten belüli elhelyezkedésének irányítása, kölcsönható partnereinek meghatározása és szubsztrátumainak megkötése. Míg a legtöbb (mitótikus) kináz közvetlenül kapcsolódik a célfehérjéhez (konszenzus motívumokat felismerve), addig a foszfatázok zöme regulátor alegységeivel kerül kapcsolatba a módosítandó fehérjével. Bonyolítja a képet, hogy egyetlen katalitikus alegység több különböző regulátor fehérjével alakíthat ki többalegységes holoenzimet, melyek mind egyedi szereppel bírnak a sejtfolyamatok szabályozásában. Egyes kutatások szerint a humán PP2A

(Protein Phosphatase 2A) foszfatáz katalitikus alegységének 2 izoformája mintegy 100 különböző heterotrimer holoenzimet hozhat létre, míg a PP1 (Protein Phosphatase 1) foszfatáz katalitikus alegységének 4 izoformája közel 200 heterodimer holoenzimet alkothat [12]. Ebből következik, hogy a többalegység-es foszfatázok esetében nem a katalitikus alegységet, hanem a szubsztrátum-specifitását felelős regulátor alegységeket kell vizsgálni (pl. a reverz genetika módszereit használva). Ez persze tovább komplikálja a kutatásokat, lévén a regulátor alegység repertoárja csak részben ismert.

A foszfatázkutatás további nehézségeit az adja, hogy a foszfatáz holoenzimek alegységei poszt-szintetikus módosításokon mehetnek keresztül. A módosítás fajtája meghatározhatja a holoenzim alegység összetételét [13-14], szubcelluláris lokalizációját vagy aktivitását [15]. Ezek azonosítása nehéz feladat. A fentiek terhére róható az is, hogy míg a kinázok esetében hatékonyan állítható elő rekombináns enzim *in vitro* foszforilációs teszthez, a többalegység-es fehérje foszfatázok rekonstruálása időigényes és sokszor nagyon nehezen megvalósítható feladat. Leggyakrabban a foszfatáz enzimet sejtekből történő közvetlen immunoprecipitációval állítják elő, amely alkalmas lehet ugyan *in vitro* tesztek elvégzéséhez, de már nem elégséges tisztaságú és mennyiségű szerkezetbiológiai kísérletekhez. Továbbá, míg a kinázok esetében a szubsztrátum módosítása radioaktív ATP jelenlétében autoradiogáfiával rutinszerűen validálható, egy aktív fehérje foszfatáz holoenzim *in vitro* alkalmazásának feltétele az is, hogy rendelkezünk tisztított foszforilált szubsztrátummal. Ennek hiányában csak aspecifikus enzimaktivitási tesztek végezhetőek el. Végül, de nem utolsó sorban a szerkezeti komplexitás és diverz katalitikus aktivitás miatt problémát okoz a holoenzim-specifikus foszfatáz gátlók kifejlesztése is. A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható foszfatáz inhibitor foszfatáz családokat gátol, egyedi holoenzimek *in vivo* vizsgálatára nem alkalmas. Ezzel szemben a legtöbb mitotikus kináz specifikusan gátolható kis molekulásúlyú inhibitorokkal *in vivo*.

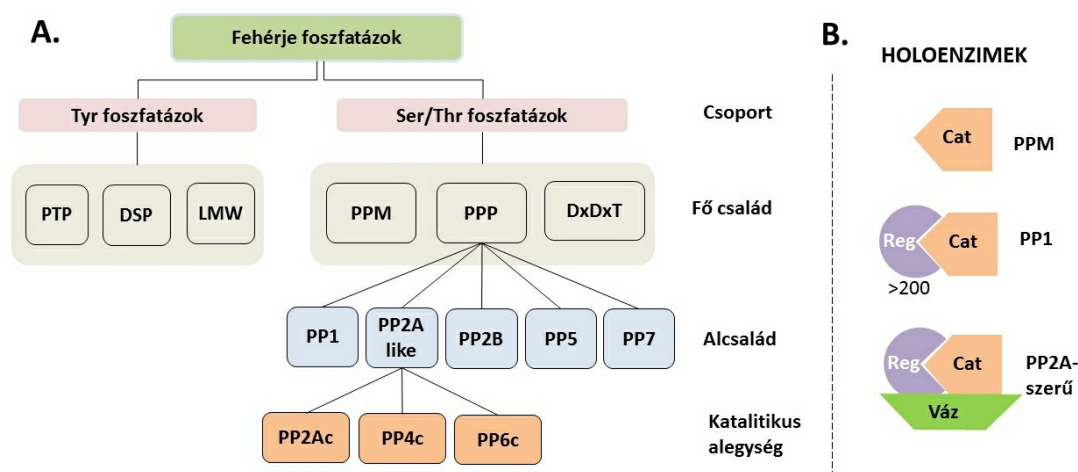
A technikai újításoknak köszönhetően a fehérje foszfatázok kutatása újra nyitott területté vált, amely a vállalkozó kedvű kutatók számára izgalmas felfedezéseket rejteget. Az MTA SZBK Biokémiai Intézetében induló Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoport célja csatlakozni ehhez a kihíváshoz, hogy részleteiben is megismerhessük a foszfatázok mitótikus szerepét.

### **A fehérje foszfatázok – szerepük a sejtsztódásban**

A fehérje foszfatázoknak alapvetően két nagy csoportja ismert: a tirozin (Tyr) [16] és szerin/treonin (Ser/Thr) [17] foszfatázok, melyek további szerkezeti eltérő szuperfamiliaira oszthatók (3A. ábra). Habár mindkét főcsoportba tartozó enzimek részt vesznek a tágabb értelemben vett sejtciklus szabályozásában, a mitótikus kinázok katalizálta folyamatok reverzióját főként a Ser/Thr csoportba tartozó ősi PPP foszfatázok végzik, melyek esszenciálisak és nagymértékű konzerváltságot mutatnak a különféle fajokban. Tagjai (főként a PP1, PP2A-szerű, PP2B, PP5 és PP7 alcsoportba tartozók) részt vesznek a kromoszóma szegregáció, centroméra és kinetokór integritás, mitótikus orsó kialakulás és dinamika, centroszóma duplikáció és érés, mitótikus ellenőrző mechanizmusok és citokinézis folyamatainak szabályozásában [4-5, 18-23]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a legtöbb idézett esetben csak a folyamatban nélkülözhetetlen szerepük tisztázódott, pontos funkciójuk, szubsztrátumaik vagy működésük molekuláris részletei nem teljesen ismertek.

A PPP foszfatázok viszonylag kisszámú katalitikus alegységei általában több alegységes holoenzimet alkotnak a hozzájuk tartozó különféle regulátor fehérjékkel (3B. ábra). Például a PP2A-típusú foszfatázok (PP2A, PP4 és PP6) általában heterotrimert alkotnak, melyben az evolúciósan konzerválódott katalitikus alegység (PP2Acat, PP4cat és PP6cat) egy szerkezeti fehérjével és a szubsztrátum-specifitását felelős regulátor alegységgel alkot holoenzimet [13-14, 18-19, 24].

Attól függően, hogy pl. a PP2Acat melyik regulátor fehérjével (4 típusú B alegység és azok különböző izoformái) képez holoenzimet, más és más funkciója lesz a sejtműködés szabályozásában. Így pl. a PP2A-B55/Twins holoenzim a centroszóma duplikációt beindító Plk4 [25-26] kináz stabilitását szabályozza [6], míg a PP2A-B56 holoenzim a mitótikus orsó összeszerelődését ellenőrző mechanizmus finomhangolásában játszik szerepet [5].



**3. ábra. A fehérje foszfatázok osztályozása. A)** A fehérje foszfatázok Tyr és Ser/Thr csoportokra oszthatók. A Tyr foszfatázok PTP (protein tyrosine phosphatase), DSP (dual-specificity phosphatases) és LMW (low molecular weight) szupercsaládba, míg a Ser/Thr foszfatázok PPP (phosphoprotein phosphatases), PPM (Mg/Mn-dependent phosphatases) és DxTxT szupercsaládba osztályozhatók. A PPP további alcsaládjai a PP1, PP2A-szerű, PP2B, PP5 és PP7 foszfatázok. **B)** A foszfatázok katalitikus alegységei különböző összetételű holoenzim komplexumokat alkothatnak.

A PP4 foszfatáz is főként heterotrimerként működik, melyben a PP4cat komplexet képez egy szerkezeti (R1 vagy R2 alegység) és egy regulátor (R3) alegységgel [18, 24]. A kanonikus PP4 komplex mellett ismertek más alegységösszetételű (di- és trimer) PP4 holoenzimek is, melyek különféle celluláris funkciót töltenek be [24, 27, 28]. Érdekesség, hogy bár a PP2A-típusú foszfatázok katalitikus alegységei rendkívül magas szintű aminosav szekvencia homológiát mutatnak (a humán PP2Acat és PP4cat >65% azonosságot mutat aminosav szinten), a

velük asszociáló regulátor alegység repertoár teljesen különböző. Ennek okát ma még nem tudjuk.

Korábbi elképzelések szerint a mitózis szabályozásában kizárólag két robusztus fehérje foszfatáz, a PP1 és PP2A (azok különböző alegység összetételű holoenzimek) vesznek részt. E két enzimcsaládról tudjuk, hogy a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje foszfatázok a sejtben és a mitózis (és tágabb értelemben vett sejtosztódási ciklus) minden szintjén regulációs funkcióval bírnak. Mitótikus kinázokkal összhangban olyan komplex folyamatok irányítását végzik, mint az ún. orsó-összeszerelődési ellenőrző mechanizmus (SAC, spindle assembly checkpoint), amely a megkettőződött genom túl korai szétválását és utódsejtekbe történő szegregációját gátolja [5]. Egyre több kutatás azonban azt sugallta, hogy némely mitótikus esemény szabályozása független a PP1 és PP2A-tól, és azok működésében más fehérje foszfatázok vehetnek részt. A genom projekteknek köszönhetően lehetőséggé vált teljes genomot lefedő géncsendesítési kísérletekből valóban kiderült, hogy kevésbé robusztus és ismert fehérje foszfatázok is szükségesek (és nélkülözhetetlenek) a mitózis levezényléséhez [20, 22, 29-30]. Fontos megjegyezni, hogy sok esetben nem ismert a foszfatáz pontos funkciója a mitózisban, szubsztrátumainak köre vagy a módosított aminosavak elhelyezkedése.

### **A csoportunk munkája**

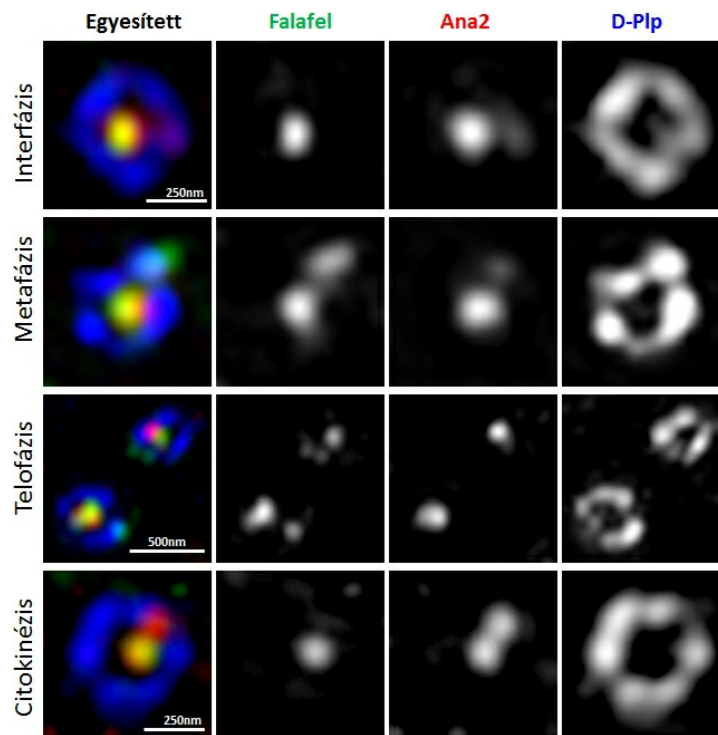
*Ecetmuslica* modellben leírták, hogy a PP4 foszfatáz centroszómális felhalmozódást mutat és szükséges az ún. centroszóma érés folyamatához, amely előfeltétele a mitótikus orsó kialakulásának [22], de a foszfatáz szubsztrátumait nem sikerült azonosítani. David Glover csoportjában (University of Cambridge) a PP4 újfajta mitótikus szerepét fedeztük fel. Kimutattuk, hogy a PP4 kölcsönhat a CENP-C-vel, amely a centromérát a kinetokórral összekötő esszenciális fehérje [18]. Bizonyítottuk, hogy a PP4 részt vesz a CENP-C foszforegulációjában, amely alapfeltétele a centroméra-kinetokór stabilitás fenntartásának a mitózis folyamán. Meghatároztuk a PP4 regulátor alegységének (Falafel) és a CENP-C

kölcsönható doménjeinek térszerkezetét (lásd címlap ábra), amely felfedte, hogy a PP4 teljesen más mechanizmussal köti meg szubsztrátumait, mint a PP1 vagy PP2A (és valószínűleg más PPP-k).

Hazatérve Szegedre, már egy OTKA-PD projekt keretein belül, újszerű technikát alkalmazva [31] további PPP foszfatáz szubsztrátumok és kölcsönható fehérjék azonosítását végeztük el. Ezek közül kiemelendő a PP4 Falafel alegységével kölcsönható Ana1 és Ana2 (Anastral spindle 1 és 2) centroszómális fehérjék. Az Ana1-ről korábban kimutattuk, hogy nélkülözhetetlen az ún. centroszóma konverzióhoz [32], amely alapfeltétele a centroszóma érésnek és ebből kifolyólag a mitotikus orsó kialakulásának, valamint a centroszóma duplikációnak. Az Ana2-ről pedig azt mutattuk ki, hogy foszforilált formájának jelenléte nélkülözhetetlen a centroszóma duplikáció beindulásához [25]. Szuperrezolúciós mikroszkópiát alkalmazva bizonyítottuk, hogy a PP4 Falafel alegysége megtalálható a centroszómák (az azt alkotó centriólum pár) központjában az Ana2 társaságában (4. ábra), az Ana1 által közrefogott zónában [32, 33]. Feltételezésünk szerint a PP4 foszfatáz mitotikus kinázokkal összhangban részt vehet az Ana2 és Ana1 fehérjék foszforegulációjában, ezáltal a centroszóma érési és replikációs folyamatainak irányításában (nem közölt adat).

A 2017 ősszén induló Lendület Kutatócsoport célja szisztematikusan megvizsgálni az összes olyan PPP foszfatázt, amely általános, illetve szövet és/vagy fejlődés-stádium specifikus [34] módon képes befolyásolni a mitózis folyamatát. Kutatásainkat eleinte ecetmuslicában végezzük, amely kiváló modellje a sejtciklus vizsgálatának, jól jellemzett és számtalan módszerrel vizsgálható modellorganizmus. Emellett, a humán mitotikus foszfatázok mindegyikének ismert a muslica ortológja, melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak (a humán PP4cat és muslica PP4cat >90% azonosságot mutat aminosav szinten). Célunk felderíteni az egyes foszfatáz holoenzimek alegység összetételét, specifikus mitotikus szubsztrátumainak körét, azonosítani és feltérképezni a célfehérjéken kialakult (de)foszforilációs helyeket és meghatározni a módosítás jelenlétének vagy

hiányának biológiai szerepét. Kutatásaink során klasszikus és újgenerációs genetikai, sejtbiológiai, molekuláris biológiai, proteomikai és biokémiai metódikákat fogunk alkalmazni.



**4. ábra. Szuperrezolúciós mikroszkópos felvétel a Falafel centroszómán belüli elhelyezkedéséről.** A sejtciklus különböző fázisaiban a PP4 foszfatáz Falafel regulátor alegysége a centroszómát alkotó hordó alakú centriólum pár közepében helyezkedik el. Az ábrán az érettebb ún. anyai centriólum felülnézeti képe látható. Az Ana2 a centriólum kialakulásához szükséges fehérje [25], amely a centriólum legbelső zónájában helyezkedik el és kolokalizál a Falafellel (a külső gyűrűn megjelenő Ana2 már a kevésbé érett, ún. leánycentriólumhoz tartozik – oldalsó nézet). A D-Plp (*Drosophila*-Pericentrin-like protein) a centriólum külső zónájában elhelyezkedő fehérje. Kép: George Tzolovsky (University of Cambridge).

Génkiütési, géncsendesítési és célzott fehérje degradációs kísérletekkel foszfatázok regulátor alegységeit fogjuk eltávolítani, így lehetőségünk lesz ismert alegység összetételű holoenzimek inaktiválására és ennek mitotikus figurákra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Távlati terveink között szerepel globális, a teljes proteómot lefedő foszforilációs térképezés elvégzése holoenzim-inaktivált szövetekben, foszfatáz komplexumok rekonstruálása rekombináns fehérjékből *in vitro* defoszforilációs tesztek létrehozásához, gátlószerek kidolgozásához és

szerkezetbiológiai kísérletekhez, valamint a vizsgálataink kiterjesztése emlős modellekre is. Úgy véljük, hogy a csoport munkája hozzájárul majd a mitózis irányítását végző folyamatok mélyebb megértéséhez, melyhez kalandvágó és a kutatási irány iránt elhivatott munkatársak jelentkezését várjuk.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA-PD115404), a Nemzetgazdasági Minisztérium (GINOP-2.3.2-15-2016-00001 és GINOP-2.3.2-15-2016-00032), valamint az MTA támogatja (Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (bo\_329\_15) és Lendület program (LP2017-7/2017)). A szerzők hálásak a *Drosophila* Genomics Resource Center-nek (NIH 2P40OD010949) a rendelkezésükre bocsátott reagensekért, George Tzolovsky-nak (University of Cambridge, Glover csoport) az OMX mikroszkópiában nyújtott segítségével, Martin Singleton-nak (The Francis Crick Institute, London) a 3D-s modellért, az Európai Bizottságnak az Erasmus+ Ösztöndíj támogatásért (N.ZS.), valamint az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskolának a doktorandusz ösztöndíj támogatásért (K.Z.).

### Irodalomjegyzék

- [1] Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **2 (1)**: 21-32.
- [2] Bettencourt-Dias, M., Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, A., Lock, W.G., Balloux, F., Zafiropoulos, P.J., Yamaguchi, S., Winter, S., Carthew, R.W., Cooper, M., Jones, D., Frenz, L., Glover, D.M. (2004) Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature*, **432 (7020)**: 980-7.
- [3] Brautigan, D.L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *The FEBS journal*, **280: (2)** 324-45.
- [4] Grallert, A., Boke, E., Hagting, A., Hodgson, B., Connolly, Y., Griffiths, J.R., Smith, D.L., Pines, J., Hagan, I.M. (2015) A PP1-PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature*, **517 (7532)**: 94-8.
- [5] Nijenhuis, W., Vallardi, G., Teixeira, A., Kops, G.J., Saurin, A.T. (2014) Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nature Cell Biology*, **16 (12)**: 1257-64.



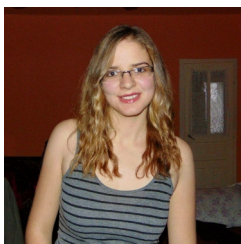
- [6] Brownlee, C.W., Klebba, J.E., Buster, D.W., Rogers, G.C. (2011) The Protein Phosphatase 2A regulatory subunit Twins stabilizes Plk4 to induce centriole amplification. *The Journal of Cell Biology*, **195 (2)**: 231-43.
- [7] Hammond, D., Zeng, K., Espert, A., Bastos, R.N., Baron, R.D., Gruneberg, U., Barr, F.A. (2013) Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *Journal of Cell Science*, **126 (Pt 15)**: 3429-40.
- [8] Lens, S.M., Voest, E.E., Medema, R.H. (2010) Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*, **10 (12)**: 825-41.
- [9] Berndt, N. (2000) Serine/threonine-specific protein phosphatases and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **4 (5)**: 581-608.
- [10] Ventura, J.J., Nebreda, A.R. (2006) Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clinical and Translational Oncology*, **8 (3)**: 153-160.
- [11] Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., Cesareni, G. (2012) The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Letters*, **586 (17)**: 2732-9.
- [12] Kiely, M., Kiely, P.A. (2015) PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers*, **7 (2)**: 648-69.
- [13] Hwang, J., Lee, J.A., Pallas, D.C. (2016) Leucine Carboxyl Methyltransferase 1 (LCMT-1) Methylates Protein Phosphatase 4 (PP4) and Protein Phosphatase 6 (PP6) and Differentially Regulates the Stable Formation of Different PP4 Holoenzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, **291 (40)**: 21008-21019.
- [14] Cho, U.S., Xu, W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*, **445 (7123)**: 53-7.
- [15] Voss, M., Campbell, K., Saranzewa, N., Campbell, D.G., Hastie, C.J., Pegg, M.W., Martin-Granados, C., Prescott, A.R., Cohen, P.T. (2013) Protein phosphatase 4 is phosphorylated and inactivated by Cdk in response to spindle toxins and interacts with gamma-tubulin. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **12(17)**: 2876-87.
- [16] Tonks, N.K. (2013) Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *The FEBS Journal*, **280 (2)**: 346-78.
- [17] Shi, Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, **139 (3)**: 468-84.
- [18] Lipinszki, Z., Lefevre, S., Savoian, M.S., Singleton, M.R., Glover, D.M., Przewlaka, M.R. (2015) Centromeric binding and activity of Protein Phosphatase 4. *Nat Commun*, **6**: 5894.

- [19] Barr, F.A., Elliott, P.R., Gruneberg, U. (2011) Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *Journal of Cell Science*, **124 (Pt 14)**: 2323-34.
- [20] Chen, F., Archambault, V., Kar, A., Lio, P., D'Avino, P.P., Sinka, R., Lilley, K., Laue, E.D., Deak, P., Capalbo, L., Glover, D.M. (2007) Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Current Biology : CB*, **17 (4)**: 293-303.
- [21] Cundell, M.J., Bastos, R.N., Zhang, T., Holder, J., Gruneberg, U., Novak, B., Barr, F.A. (2013) The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation. *Molecular Cell*, **52 (3)**: 393-405.
- [22] Helps, N.R., Brewis, N.D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K., Cohen, P.T.W. (1998) Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Science*, **111**: 1331-1340.
- [23] Mochida, S., Hunt, T. (2012) Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO Rep*, **13 (3)**: 197-203.
- [24] Gingras, A.C., Caballero, M., Zarske, M., Sanchez, A., Hazbun, T.R., Fields, S., Sonenberg, N., Hafen, E., Raught, B., Aebersold, R. (2005) A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **4 (11)**: 1725-40.
- [25] Dzhindzhev, N.S., Tzolovsky, G., Lipinszki, Z., Schneider, S., Lattao, R., Fu, J., Debski, J., Dadlez, M., Glover, D.M. (2014) Plk4 phosphorylates Ana2 to trigger Sas6 recruitment and procentriole formation. *Current Biology : CB*, **24 (21)**: 2526-32.
- [26] Ohta, M., Ashikawa, T., Nozaki, Y., Kozuka-Hata, H., Goto, H., Inagaki, M., Oyama, M., Kitagawa, D. (2014) Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat Commun*, **5**: 5267.
- [27] Cohen, P.T., Philp, A., Vazquez-Martin, C. (2005) Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Letters*, **579 (15)**: 3278-86.
- [28] Chen, G.I., Tisayakorn, S., Jorgensen, C., D'Ambrosio, L.M., Goudreault, M., Gingras, A.C. (2008) PP4R4/KIAA1622 forms a novel stable cytosolic complex with phosphoprotein phosphatase 4. *The Journal of Biological Chemistry*, **283 (43)**: 29273-84.
- [29] Wurzenberger, C., Gerlich, D.W. (2011) Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **12 (8)**: 469-82.
- [30] Zeng, K., Bastos, R.N., Barr, F.A., Gruneberg, U. (2010) Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *The Journal of Cell Biology*, **191 (7)**: 1315-32.

- [31] Lipinszki, Z., Wang, P., Grant, R., Lindon, C., Dzhindzhev, N.S., D'Avino, P.P., Przewloka, M.R., Glover, D.M., Archambault, V. (2014) Affinity purification of protein complexes from *Drosophila* embryos in cell cycle studies. *Methods in Molecular Biology*, **1170**: 571-88.
- [32] Fu, J., Lipinszki, Z., Rangone, H., Min, M., Mykura, C., Chao-Chu, J., Schneider, S., Dzhindzhev, N.S., Gottardo, M., Riparbelli, M.G., Callaini, G., Glover, D.M. (2016) Conserved molecular interactions in centriole-to-centrosome conversion. *Nature Cell Biology*, **18 (1)**: 87-99.
- [33] Fu, J., Glover, D.M. (2012) Structured illumination of the interface between centriole and peri-centriolar material. *Open Biology*, **2(8)**: 120104.
- [34] Miskei, M., Adam, C., Kovacs, L., Karanyi, Z., Dombradi, V. (2011) Molecular evolution of phosphoprotein phosphatases in *Drosophila*. *PLoS one*, **6 (7)**: e22218.



**Kármán Zoltán** biológus, 2014 első félévében az SZTE Gyógyszeranalitikai Intézet tudományos segédmunkatársaként dolgozott. A 2014 áprilisában Szegeden megrendezett ÁOK-FOK-GYTK-ETSZK TDK Konferencián különdíjat nyert „A humán TRPV1 csatorna C terminális doménjének szerkezeti vizsgálata” című előadásával. A 2016 tavaszán megrendezett Biológia TDK Konferencián „A *Drosophila* spermium proteom legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjecsaldójának genetikai vizsgálata” című pályamunkájával szintén különdíjat nyert. M.Sc. diplomáját 2016-ban szerezte az SZTE TTIK biológus szakán. 2016 szeptemberétől a Pszichiátriai Klinika Kutatólaboratóriumában béta-amiloid és egyéb neurotoxikus fehérjeaggregátumok metabolizmusát vizsgálta kerekeseféreg modellen. 2017 júniusától Ph.D. hallgatóként csatlakozott az MTA SZBK Biokémiai Intézet Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoporthoz.



**Nagy Zsuzsánna** 2014-ben kezdte tanulmányait a kolozsvári Babeş-Bolyai Tudományegyetemen, 2016-ban részt vett az Erasmus+ programban, így lehetősége nyílt egy félévet a Szegedi Tudományegyetemen tanulni, valamint Lipinszki Zoltán csoportjában elsajátítani az alapvető molekuláris biológiai technikákat. 2017-ben fejezi be a biológus B.Sc. képzést Kolozsváron, majd tanulmányait az SZTE biológus M.Sc szakán szeretné folytatni, valamint szeretne kutatni az MTA SZBK Biokémiai Intézet Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoportban.



**Lipinszki Zoltán** a SZTE biológus szakán szerzett diplomát 2006-ban, majd az MTA SZBK Biokémiai intézetében, Udvardy Andor csoportjában védte meg Ph.D. dolgozatát az ubiquitin-függő fehérje degradáció témakörben 2009-ben. FEBS posztdoktori ösztöndíjjal 4 évet töltött a Cambridge-i Egyetemen David Glover csoportjában. 2015 óta tudományos főmunkatárs, az SZBK Biokémiai intézetében a Sejtciklus és Transzkripció Szabályozás Csoport vezetője. 2017-től az MTA SZBK Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoport vezetője. Kutatási témája a mitózis irányítását végző ubiquitilációs és foszforilációs folyamatok feltárása. 2005-ben Pro Scientia Aranyéremet, 2010-ben Junior Prima Díjat és 2015-ben Bolyai Ösztöndíjat kapott. 2007 óta tagja az MBK-nek, 2012 óta a Biochemical Society-nak.

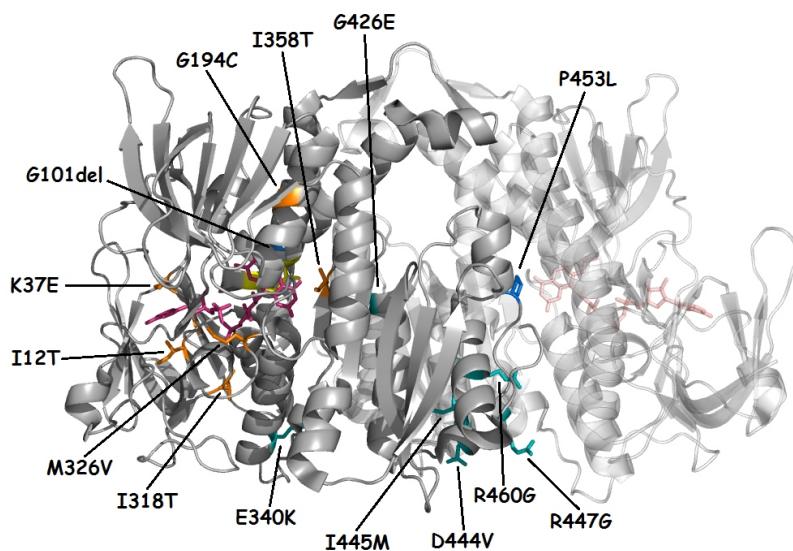
## A HUMÁN DIHIDROLIPOAMID-DEHIDROGENÁZ DEFICIENCIA MOLEKULÁRIS PATOMECHANIZMUSA

**Szabó Eszter és Ambrus Attila**  
**Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet,**  
**MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport**

### Bevezetés

A humán (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (hLADH) enzim deficienciája egy ritka, autoszómális recesszív öröklődésű genetikai kórkép [1-2]. Az askenázi zsidó populációban a leggyakoribb a betegség megjelenése (~1:40000), elsősorban egy bizonyos aminosavcsere miatt (Gly194Cys), amelynek az előfordulási aránya az érintett népességben megközelítőleg 1:100 [3]. A hLADH a metabolizmusban nélkülözhetetlen szerepet játszó mitokondriális  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz ( $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz (KGDH), piruvát-dehidrogenáz (PDH) és elágazó-szénláncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz (ESzKDH)) komplexek közös harmadik alegysége (hE3), illetve a glicinhasító-rendszernek (GHR) is része [1]. Az enzim diszfunkciója elsősorban az intenzív metabolizmust folytató, nagy oxigénfelhasználású szöveteket érinti és ebből kifolyólag a klinikai képet döntően a neurológiai és kardiológiai tünetek határozzák meg, bár a máj funkciózavarai is meglehetősen gyakoriak [2]. Jellemző fenotípusok a növekedés elmaradása, fejlődési rendellenességek, enkefalopátia, az izomzat tónustalansága, májelégtelenség, laktát-acidózis, hipoglikémia, Leigh-szindróma, hipertrófiás kardiomiopátia, látás-károsodás, ataxia és a mikrokefália [2, 4-5]. A tünetek gyakran már nagyon korán (sokszor a neonatális periódusban) jelentkeznek, míg bizonyos patogén mutációk esetén csak a felnőttkorban fejlődik ki a betegség. A diagnózisban meghatározó szerepet játszik - a releváns kórtörténet mellett - a hE3 alegységet tartalmazó enzimkomplexek csökkent aktivitásainak kimutatása [2]. Gyakori emellett a hE3 saját enzimaktivitásának diagnosztikus célú mérése is fibroblasztokból, limfocitákból, illetve máj- és izomszövet mintákból [4]. Biztos diagnózis ugyanakkor csak a hE3-at kódoló *dld* gén genetikai variációinak (pl. patogén

mutációinak) kimutatása után állítható fel. Mindezidáig 14 betegséget okozó aminosavcserét (vagy deléciót) írtak le a klinikai irodalomban (eredeti referenciákért lásd: [1]), melyek a hE3 kristályszerkezetének ismeretében csoportosíthatóak aszerint, hogy az enzimszerkezet mely funkcionálisan meghatározó részét érintik: az Ile12Thr, Lys37Glu, Gly194Cys, Ile318Thr, Met326Val, Ile358Thr aminosavcserék a kofaktor-kötő régiókban, a Gly101del, Pro453Leu módosulások az aktív centrumban, míg a Glu340Lys, Gly426Glu, Asp444Val, Ile445Met, Arg460Gly és Arg447Gly cserék a homodimerizációs felszínen jönnek létre [6] (1. ábra).



**1. ábra. A hE3 homodimer szerkezete a patogén aminosav-szubsztitúciók feltüntetésével.** A betegséget okozó aminosavcserék elhelyezkedése a vad típusú enzim (PDB kód: 1ZMD) egyik monomerjében, funkcionális régióként eltérő színekkel van feltüntetve (aktív centrum: sötétkék, kofaktor-kötőhely: narancssárga, dimerizációs felszín: zöldeskék). A FAD prosztetikus csoport pálcikamodellje rózsaszín, míg az aktív centrumban lévő ciszteinek sárga színűek. Az ábrán az aminosavak egybetűs kódjait alkalmaztuk (az ábra zsúfoltságának elkerülése érdekében).

A betegség kezelésére jelenleg mindössze egy étrendi megköötéseken alapuló, empirikus, kombinációs megközelítés lehetséges, amely esetenként antioxidánsok és vitaminok adásával egészíthető ki [2]. Akut epizódok során a legfontosabb a metabolikus acidózis kezelése és a normoglikémia fenntartása, a rohamok sikeres megelőzésére azonban jelenleg nincs elfogadott klinikai protokoll egyik típusú E3-deficienciában sem [2].

### Az E3-deficiencia molekuláris patomechanizmusa

Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexekben az E3-komponens az E2 alegységhez kovalensen kötött dihidroliponsav (DHLS) liponsavvá (LS) történő oxidációjáért felel (LADH-aktivitás). Ehhez az aktivitáshoz FAD prosztetikus csoport, két redox-aktív Cys, egy His bázis (mind az aktív centrumban) és NAD<sup>+</sup> kosubsztrát (mint elektronakceptor) jelenléte is szükséges. Az izolált patogén hE3 variánsok LADH-aktivitása – különböző mértékben – csökkent (a vadtypushoz képest), mind a fiziológiás (*forward*), mind pedig a fordított irányú (*reverz*) reakcióban (ez utóbbi esetben a NADH szolgál elektrondonorként a modellvegyületként alkalmazott LS vagy lipoamid redukciójához) [7]. Az általános tendenciától eltérést mutat a Gly194Cys-hE3 mutáns gyakorlatilag változatlan aktivitása és a Lys37Glu-hE3 variáns emelkedett *reverz* irányú aktivitása (csökkent *forward* irányú aktivitás mellett) [7]. A betegekből származó mintákban mérhető LADH-aktivitás-csökkenés mértéke azonban többnyire nem korrelál a tünetek súlyosságával [4]. Feltételezhető tehát, hogy egyéb súlyosbító mechanizmusok is hozzájárulnak a patogenezishez. Az eddigi eredmények alapján ilyen mechanizmus lehet potenciálisan a hE3 egyes patogén variánsainak megnövekedett reaktív oxigénszármazék (ROS) képző aktivitása (különösen acidózisban, amely E3-deficienciában nagyon gyakori) [7-8], a hE3-mutánsokat tartalmazó enzimkomplexek disszociációja [9-13] (acidózisban akár még kifejezettebben [14]) és a hKGDH komplex (hKGDHk) tekintetében az esetleges disszociáció után visszamaradó E1-E2 alkompex erőteljes ROS termelése [15].

#### ROS-képzés

A hKGDHk rendkívül érzékeny az oxidatív behatásokra, ugyanakkor az általa termelt ROS a mitokondriális oxidatív stressz egyik legjelentősebb forrása [16-19]. A hKGDHk ROS-termelő aktivitása akkor kerül előtérbe, amikor a fiziológiás elektronakceptor, a NAD<sup>+</sup> nem áll rendelkezésre kellő mennyiségben (a *forward* reakcióban), vagy ha a NADH/NAD<sup>+</sup>-arány megemelkedik (amely

pedig a ROS-képző *reverz* E3-reakciót támogatja) [14-15, 18-19] (2. ábra). A NADH/NAD<sup>+</sup>-arány számottevően megemelkedik például iszkémia, Komplex I elégtelenség vagy fokozott kalóriabevitel esetén [20-22]. A hKGDHk ROS-képzése az E3 alegységen keresztül valósul meg mindkét katalitikus irányban és az irodalomban a komplex szuperoxid-, illetve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-termelését detektálják (a szuperoxid az elsődleges termék, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pedig spontán diszmutációval (diszproporcionálódással) keletkezik a szuperoxidból) [15, 18-19]. Érdekes módon a hPDHk ugyanezen aktivitása, a hE3 jelenléte ellenére, *in vivo* körülmények között sokkal kevésbé szignifikáns [15-17, 19, 23]. Az izolált hE3 szintén mindkét irányú (*forward* és *reverz*) reakcióban képes elvileg ROS-t termelni, a szakirodalom azonban - metodikai okok miatt [14, 24] - kizárólag a *reverz* reakció tanulmányozásáról számol be [7, 14, 15, 25].

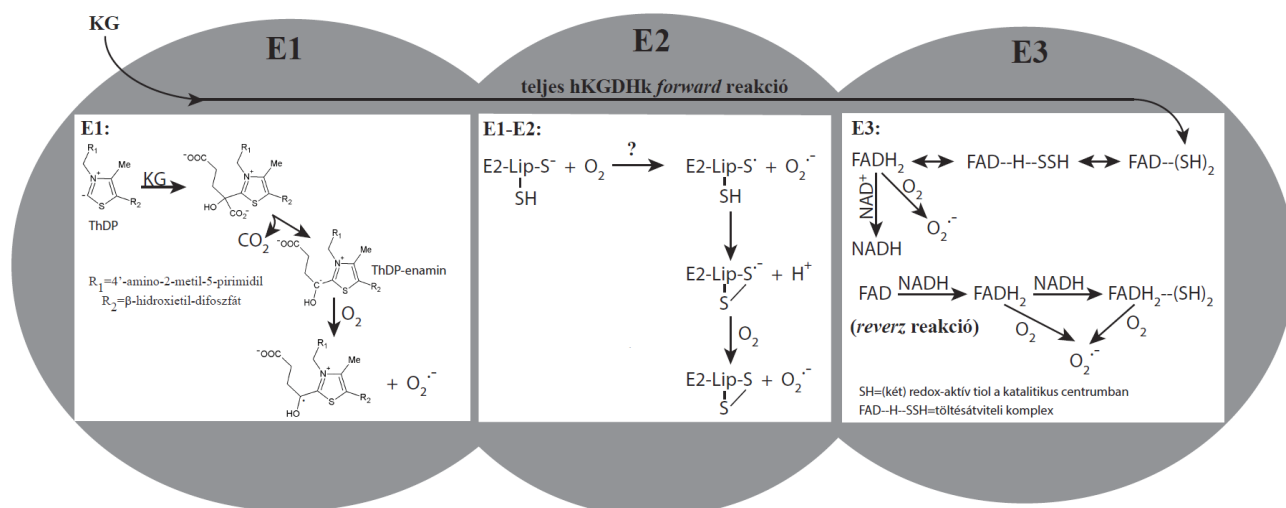
Kis mértékű acidózis kedvez a fiziológias KGDHk-reakciónak [15], kivéve az agyban, ahol a pH-optimum 7,2 és 7,4 közötti [26]. Emellett azonban az E3 ún. diaforáz-aktivitása – különböző szerves és szervetlen kismolekulás elektronakceptorok NADH (és E3) általi redukciója meglehetősen savas pH-optimum mellett –, illetve az ezzel analóg mechanizmusú *reverz* irányú ROS-képző aktivitása is fokozódik savas körülmények között [14, 27, 28]. A hKGDHk általi ROS-képzés sebessége ugyancsak megnő acidózisban, de csak a *reverz* reakcióban [14]. A hE3 ROS-képzését a Zn<sup>2+</sup> is fokozza, amelynek az iszkémia-reperfúzióban, illetve Alzheimer-kórban lehet jelentősége, ahol a Zn<sup>2+</sup> megnövekedett koncentrációban van jelen [25]. Ezzel ellentétben az LS gátolja a *reverz* irányú ROS-képzést mind a hKGDHk, mind pedig a hE3 esetén, azonban csak acidózisban (pH<6,8) [14]. Az LS a KGDHk *forward* irányú ROS-képzését is gátolja, bár ebben az esetben az E2 alegységen hat egy eltérő mechanizmussal [14].

Egyes betegséget okozó hE3-mutánsok ROS-termelő képessége - és annak pH-érzékenysége is - megnövekedett a vad típusú enzimhez képest (Asp444Val-,

Glu340Lys-, Pro453Leu- és Gly194Cys-hE3; a 14 eddig leírt patogén mutáns közül eddig nyolc vizsgálata történt meg) [7]. Az említett Asp444Val-, Glu340Lys- és Gly194Cys-hE3 variánsokról, valamint az Arg460Gly- és Arg447Gly-hE3 mutánsokról élesztő modellben kimutatták továbbá, hogy az E2-kötött LS kofaktor oxidatív károsodását okozzák a KGDHk és a PDHk enzimkomplexekben (Asp444Val-homozigóta betegből származó fibroblasztokban ugyanez a hatás volt megfigyelhető [8]). A ROS-termelő aktivitás fokozódása mellett a megfelelő mutánsok LADH-aktivitása általában - a várakozásnak megfelelően - kisebbnek adódott a kontrollhoz (hE3) képest. Érdekes jelenség, hogy a Pro453Leu-hE3 variáns fiziológiás aktivitása csaknem teljes egészében elveszett, míg ezzel szemben a Gly194Cys-hE3 mutánsban a LADH-aktivitás gyakorlatilag nem károsodott [7]. A Pro453Leu szubsztitúció esetében súlyos klinikai képről számoltak be [29-30], amelyhez feltehetően hozzájárul a megfelelő hE3 variáns erősen fokozott ROS-termelő képessége is [7]. A Gly194Cys aminosavcsere által kiváltott E3-deficienciára ezzel szemben inkább a tünetek felnőttkori megjelenése a jellemző [3, 31], amely összhangban van a megtartott LADH-aktivitás mellett megemelkedett ROS-termelő kapacitással (a fokozott oxidatív stressz okozta károsodások valószínűleg akkumulálódnak a betegekben a korábbi, tünetmentes életévek során [7]). Fontos megállapítás, hogy a patogén aminosav-szubsztitúció lokalizációja nem mutat összefüggést a ROS-termelő képességgel [7].

Amennyiben a komplex-kötött hE3 mennyisége szuboptimális (pl. E3-deficiencia vagy acidózis esetén - ez utóbbi körülményben valószínűsítik a hE3 affinitásának csökkenését a hKGDHk-hez [14], amely összhangban van azzal, hogy az E3 kötődése eleve meglehetősen gyenge a komplexen belül [32-34]), a hKGDHk E1-E2 alkomplexe ugyancsak képes lehet számottevő mennyiségben ROS-t termelni [15].





**2. ábra. A hKGDHk E1-, E1-E2- és E3-alegységei/alkomplexei, illetve a teljes hKGDHk által katalizált szuperoxid-képzés javasolt mechanizmusai.** A szuperoxid mellett diszmutációval keletkezett  $\text{H}_2\text{O}_2$  is kimutatható minden esetben a fenti rendszerekben. A szabad E1 alegységen szuperoxid a viszonylag stabil, enzim-kötött enamin  $\text{O}_2$  általi oxidációjával keletkezik. Az E1-E2 alkomplex szuperoxid-képzése valószínűleg az E2-alegységhez kötött redukált liponsav részvételével valósul meg (a mechanizmus részletei még tisztázásra várnak). A szabad, illetve komplexben levő hE3 - forward és reverz irányú - ROS-képzésében a FAD prosztetikus csoport kitüntetett szerepet játszik az ábrán feltüntetett mechanizmusok szerint. KG:  $\alpha$ -ketoglutarát, ThDP: tiamin-difoszfát, Lip: E2-kötött liponsav, FAD: flavin-adenin-dinukleotid,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ : nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált, illetve redukált forma).

A jelenség *in vitro* körülmények között az izolált alegységekből rekonstitúcióval létrehozott hKGDHk E1-E2 alkomplexe esetén volt megfigyelhető, másik három hasonló módon létrehozott komplex (hPDHk, *E. coli* KGDHk, *E. coli* PDHk) E1-E2 alkomplexeire nem volt jellemző [15]. A mechanizmus hátterében a DHLS pro-oxidáns sajátsága feltételezhető (az E2-kötött DHLS – E3-katalizált oxidáció hiányában – molekuláris oxigénnel reagálva potenciálisan szuperoxidot képezhet, lásd 2. ábra) [35-37]. Azon patológiás körülmények között tehát, amikor a hE3 vagy annak betegséget okozó mutánsai részben vagy teljesen disszociálnak a hKGDHk-ról, nem csak a szabad vagy még komplex-kötött hE3, illetve mutánsai lehetnek képesek ROS-képzésre (elsősorban a reverz reakcióban), hanem egyidőben, tőlük függetlenül a visszamaradó E1-E2 alkomplex is termelhet számottevő mennyiségben ROS-t a forward reakcióban, amennyiben az  $\alpha$ -ketoglutarát szubsztrát megfelelő koncentrációban rendelkezésre áll [1].

Érdekes módon a hKGDHk E1 alegysége is képes ROS-termelésre (lásd 2. ábra). Ennek mértéke - más  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplexek E1 alegységeivel történő összehasonlításban - erősen szignifikánsnak bizonyult *in vitro* kísérletben [15, 38]. A hKGDHk E1 alegységének ROS-képző aktivitása patológiás jelentőséggel bírhat például E2-deficienciában [39-45].

#### *Az E3 alegység disszociációja az érintett enzimkomplexekről*

E3-deficienciában az E3 alegységet tartalmazó  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek diszfunkciója nem csak a LADH-aktivitás csökkenéséből eredhet. A hPDHk alulműködéséhez például nagy valószínűséggel hozzájárul az is, hogy egyes patogén hE3 variánsok (Glu340Lys-, Asp444Val-, Arg447Gly-, Arg460Gly-, Lys37Glu-, Pro453Leu-hE3) a hPDHk-ben jelenlevő E3-kötő fehérjéhez (E3KF) csökkent affinitással kötődnek [10-11, 13]. Ugyanez feltételezhető a hE3-E3KF-komplex kristályszerkezetei [12-13] és hidrogén/deutérium-csere tömegspektro-metria (HDX-MS) eredmények alapján további három variáns esetében (Ile318Thr-, Ile358Thr-, Ile445Met-hE3) [9]. Klinikai eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az E3-deficienciában előforduló betegséget okozó aminosavcserék a hE3 hKGDH- és hESzKDH-komplexekre vonatkoztatott kötődési állandóit is befolyásolják [46-47].

#### *Szerkezeti változások*

##### *1. Monomerizáció*

Az E3 alegység egy nem-kovalens, funkcionális (obligát) homodimert alkot, amelyben a fiziológias aktivitáshoz mindkét aktív centrumban a szomszédos monomer meghatározott aminosavai is szükségesek [6]. A dimerizációs domént érintő aminosav-szubsztitúciók esetén a patogenitás elsődleges okának a homodimer monomerizációját feltételezték korábban [6, 48]. Extrém kísérleti körülmények között – pl. erősen savas közegben vagy apomerizáció, fagyasztás-olvasztás ciklusok, nagymértékű hígítás, denaturáció, magas sókoncentráció, illetve kémiai módosítások hatására [27-28, 49-54] – valóban megfigyelhető a hE3-dimer disszociációja, miközben a felszabaduló monomerek

diaforáz-aktivitása megmarad [50-51] (a diaforáz-aktivitáshoz a FAD prosztetikus csoport szükséges elsősorban, a szomszédos monomer interakciója nem [27, 51]). Ebből kifolyólag a patológiás körülmények között fellépő acidózis, valamint a dimerizációs felszín érintő egyes mutációk okozta diaforáz/ROS-képző aktivitás növekedés hátterében is a hE3 monomerizációját és annak szerkezeti következményeit feltételezték [27, 55]. Számos biokémiai/biofizikai módszerrel – analitikai ultracentrifugálás, kalibrált gélszűrés, nano-LC MS, 1D  $^1\text{H}$  és DOSY-NMR spektroszkópia – bizonyították azonban, hogy sem a patológiásan releváns acidózis, sem pedig az eddig vizsgált betegséget- okozó dimerizációs felszín mutációk nem vezetnek a dimer disszociációjához [7, 13-14]. Később molekuláris dinamika (MD) szimulációk, majd HDX-MS analízis eredmények ugyancsak ezt a megfigyelést támasztották alá [9, 56-57]. Ezen cikk szerzői rendelkeznek nagyfelbontású kristályszerkezettel a vad típusú hE3 és öt patogén variánsa tekintetében (amelyből négy a dimerizációs domént érinti; közlésre előkészítés alatt), mely adatok szintén megerősítik a fenti konklúziókat.

## 2. A FAD prosztetikus csoport részleges elvesztése

Egy hE3 monomer egy FAD molekulát mint prosztetikus csoportot köt erős, de nem-kovalens kölcsönhatások által [6]. A hE3 kristályszerkezete alapján monomerenként legalább 36 aminosav oldallánc játszik szerepet a FAD stabilizálásában [6]. A patogén aminosav-szubsztitúciók távolra ható szerkezeti változások révén képesek befolyásolni a FAD-kötést és ezáltal a mutánsok FAD-tartalmát és enzimaktivitását [6-7, 9, 58]. Az eddig vizsgált hE3-variánsok FAD tartalma (mol FAD/1 mol hE3 monomer egységben kifejezve): Pro453Leu-hE3 (0,66), Gly194Cys-hE3 (0,72), Glu340Lys-hE3 (0,99), Asp444Val-hE3 (0,95), Lys37Glu (0,76 ill. 0,67) [7, 58]. HDX-MS analízis alapján megállapítást nyert, hogy az egyes mutációk fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásai a FAD-kötésben szerepet játszó aminosavak változó százalékát érintette (lásd alább) [9].

### 3. A hE3 finomszerkezetében bekövetkező változások

Kizárva annak lehetőségét, hogy a patogén mutációk a hE3 dimer disszociációját eredményeznék, a mutánsokban megfigyelt funkcionális eltérések okai egyéb szerkezeti változásokban keresendők. A hE3 és számos patogén variánsa cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszópiával történő összehasonlítása során szignifikáns eltérések nem voltak kimutathatóak a globális konformációban [7, 58]. A patogén aminosav-szubsztitúciók okozta enzimaktivitás-csökkenés, valamint a korábban említett négy variánsban mutatkozó fokozott ROS-termelő aktivitás finomszerkezeti okainak felderítésére az eddigi egyedüli kísérletes eredmények egy tíz patogén mutánson elvégzett HDX-MS analízisből származnak [9]. A HDX-MS technika révén vizsgálható, hogy milyen mértékben képes a deutérium beépülni a vad típusú vagy egy mutáns enzim egyes peptidszakaszaiba. A kísérletet a fiziológiás állapotot közelítő oldatkörülmények között is el lehet végezni. Összehasonlítva a vad típusú, illetve egy mutáns enzimben mért deutérium-beépüléseket, információt nyerhetünk a különböző peptidszakaszok dinamikájában és oldószer általi hozzáférhetőségében bekövetkező, mutáció okozta változásokról. Az eredményekből fény derült arra, hogy a vizsgált tíz patogén mutáns mindegyikében számos FAD-kötésben résztvevő aminosavakat tartalmazó peptidszakasz hozzáférhetősége és/vagy dinamikája megváltozott, amely magyarázatul szolgálhat az egyes hE3 variánsokban tapasztalt FAD-vesztésre és összefüggésbe hozható a megváltozott enzimaktivitásokkal. Szintén HDX-MS adatok alapján valószínűsíthető, hogy a Gly194Cys- és Pro453Leu-hE3 mutánsok esetében a fokozott ROS-termelés hátterében az LS-kötő zsebben, a FAD izoalloxazin-gyűrűjének *si* oldalán bekövetkező szerkezeti változások állnak. A Glu340Lys-hE3 esetében egy LS-kötő zsebhez közeli peptidszakasz (275-289) elmozdulása, illetve a FAD izoalloxazin-gyűrűjének megváltozott konformációja/reaktivitása stimulálhatja a ROS-képző aktivitást. Nem volt ugyanakkor kimutatható az LS-kötőhely érintettsége az Asp444Val szubsztitúció esetében, az erősödő szuperoxid-képzésnek más mechanizmus által kell megvalósulnia, feltehetőleg a FAD prosztetikus csoport érintettségével. Bizonyos aminosav-szubsztitúciók

esetében (Glu340Lys, Asp444Val, Arg447Gly, Arg460Gly, Lys37Glu, Ile318Thr, Ile358Thr, Ile445Met) kimutatható volt ezen felül egyes, hPDHk-E3KF-vel való interakcióban szerepet játszó peptidfragmensek [12-13] megváltozott mozgékonyága is. Ennek köszönhetően szerkezetalapú bizonyítást nyertek korábbi disszociációs állandó mérések eredményei öt patogén mutáns esetében (lásd fent).

Munkacsoportunkban tovább folyik a betegséget-okozó hE3 variánsok, illetve a hE1 és hE2 komponensek biokémiai, biofizikai és szerkezeti analízise a humán E3-deficiencia molekuláris patomechanizmusainak minél pontosabb megértése és potenciális farmakológiai támadáspontok kijelölése céljából.

### **Terápiás konklúziók**

A fokozott ROS-termelő kapacitással rendelkező patogén hE3 variánsok és a hKGDHk E1-E2 alkompexe általi szignifikáns ROS-termelés tekintetében ténylegesen indokolt lehet egy kiegészítő antioxidáns-terápia alkalmazása is a humán E3-deficiencia bizonyos típusainak kezelése során. Kifejezetten hatásosnak bizonyulhat a liponsav antioxidáns adása, mivel az direkt módon gátolhatja a patogén hE3 mutánsok ROS-termelését, elsősorban az E3-deficienciát általában kísérő acidózisban. Flavinok adása ugyancsak ésszerű terápiás lehetőség lehet azon mutációk esetében, amelyek a hE3 FAD-tartalmának csökkenéséhez vezetnek, ehhez azonban mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* körülmények között vizsgálni szükséges a szóban forgó mutáns enzimek flavinpótlásra adott válaszát. A jövőben terápiás megoldást jelenthetne a vad típusú hE3-mal végzett ún. enzimhelyettesítő-terápia, melynek hatékonyságára vonatkozóan biztató eredmények születtek egér-modellben és humán sejtek vizsgálatakor [59-63].

**Irodalomjegyzék**

- [1] Ambrus, A., Adam-Vizi, V. (2017) Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism. *Neurochemistry International*, in press.
- [2] Quinonez, S.C., Thoene, J.G., (2014) Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency, In: R.A. Pagon, Adam, M. P., Ardinger, H. H., et al. (Eds.) GeneReviews® [Internet] 1993-2016, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, pp. 1-37.
- [3] Shaag, A., Saada, A., Berger, I., Mandel, H., Joseph, A., Feigenbaum, A., Elpeleg, O.N. (1999) Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *American Journal of Medical Genetics*, **82 (2)**: 177-182.
- [4] Quinonez, S.C., Leber, S.M., Martin, D.M., Thoene, J.G., Bedoyan, J.K. (2013) Leigh Syndrome in a Girl With a Novel DLD Mutation Causing E3 Deficiency. *Pediatric Neurology*, **48 (1)**: 67-72.
- [5] Cameron, J.M., Levandovskiy, V., MacKay, N., Raiman, J., Renaud, D.L., Clarke, J.T.R., Feigenbaum, A., Elpeleg, O., Robinson, B.H. (2006) Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **140A (14)**: 1542-1552.
- [6] Brautigam, C.A., Chuang, J.L., Tomchick, D.R., Machius, M., Chuang, D.T. (2005) Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD(+)/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *Journal of Molecular Biology*, **350 (3)**: 543-552.
- [7] Ambrus, A., Torocsik, B., Tretter, L., Ozohanics, O., Adam-Vizi, V. (2011) Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase. *Human Molecular Genetics*, **20 (15)**: 2984–2995.

- [8] Vaubel, R.A., Rustin, P., Isaya, G. (2011) Mutations in the Dimer Interface of Dihydrolipoamide Dehydrogenase Promote Site-specific Oxidative Damages in Yeast and Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **286 (46)**: 40232-40245.
- [9] Ambrus, A., Wang, J.J., Mizsei, R., Zambo, Z., Torocsik, B., Jordan, F., Adam-Vizi, V. (2016) Structural alterations induced by ten disease-causing mutations of human dihydrolipoamide dehydrogenase analyzed by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry: Implications for the structural basis of E3 deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1862 (11)**: 2098-2109.
- [10] Park, Y.-H., Patel, M.S. (2010) Characterization of interactions of dihydrolipoamide dehydrogenase with its binding protein in the human pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **395 (3)**: 416-419.
- [11] Patel, M.S., Korotchkina, L.G., Sidhu, S. (2009) Interaction of E1 and E3 components with the core proteins of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **61 (1-2)**: 2-6.
- [12] Ciszak, E.M., Makal, A., Hong, Y.S., Vettaikkorumakankauv, A.K., Korotchkina, L.G., Patel, M.S. (2006) How dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein binds dihydrolipoamide dehydrogenase in the human pyruvate dehydrogenase complex. *Journal of Biological Chemistry*, **281 (1)**: 648-655.
- [13] Brautigam, C.A., Wynn, R.M., Chuang, J.L., Machius, M., Tomchick, D.R., Chuang, D.T. (2006) Structural insight into interactions between dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) and E3 binding protein of human pyruvate dehydrogenase complex. *Structure*, **14 (3)**: 611-621.
- [14] Ambrus, A., Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *Journal of Neurochemistry*, **109**: 222-229.

- [15] Ambrus, A., Nemeria, N.S., Torocsik, B., Tretter, L., Nilsson, M., Jordan, F., Adam-Vizi, V. (2015) Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. *Free Radical Biology and Medicine*, **89**: 642-650.
- [16] Mailloux, R.J., Gardiner, D., O'Brien, M. (2016) 2-Oxoglutarate dehydrogenase is a more significant source of O<sub>2</sub>·-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than pyruvate dehydrogenase in cardiac and liver tissue. *Free Radical Biology and Medicine*, **97**: 501-512.
- [17] Quinlan, C.L., Goncalves, R.L., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V.I., Brand, M.D. (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. *Journal of Biological Chemistry*, **289 (12)**: 8312-25.
- [18] Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience*, **24 (36)**: 7771-7778.
- [19] Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, **24 (36)**: 7779-7788.
- [20] Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, **27 (12)**: 639-645.
- [21] Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360 (1464)**: 2335-2345.
- [22] Adam-Vizi, V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7 (9-10)**: 1140-1149.



- [23] Fisher-Wellman, K.H., Gilliam, L.A.A., Lin, C.T., Cathey, B.L., Lark, D.S., Neuffer, P.D. (2013) Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-emitting source under conditions of nutrient overload. *Free Radical Biology and Medicine*, **65**: 1201-1208.
- [24] Tretter, L., Ambrus, A. (2014) Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria. *Methods in Enzymology*, **547**: 199-223.
- [25] Gazaryan, I.G., Krasnikov, B.F., Ashby, G.A., Thorneley, R.N.F., Kristal, B.S., Brown, A.M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, **277 (12)**: 10064-10072.
- [26] Lai, J., Cooper, A. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, **47 (5)**: 1376-86.
- [27] Klyachko, N.L., Shchedrina, V.A., Efimov, A.V., Kazakov, S.V., Gazaryan, I.G., Kristal, B.S., Brown, A.M. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state - Response to mitochondrial matrix acidification. *Journal of Biological Chemistry*, **280(16)**: 16106-16114.
- [28] Massey, V. (1960) The identity of diaphorase and lipoyl dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **37**: 314-322.
- [29] Liu, T.C., Kim, H., Arizmendi, C., Kitano, A., Patel, M.S. (1993) Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90 (11)**: 5186-5190.
- [30] Sakaguchi, Y., Yoshino, M., Aramaki, S., Yoshida, I., Yamashita, F., Kuhara, T., Matsumoto, I., Hayashi, T. (1986) Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency - a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction. *European Journal of Pediatrics*, **145 (4)**: 271-274.
- [31] Hong, Y.S., Korman, S.H., Lee, J., Ghoshal, P., Qu, Q., Barash, V., Kang, S., Oh, S., Kwon, M., Gutman, A., Rachmel, A., Patel, M.S. (2003)

- Identification of a common mutation (Gly194Cys) in both Arab Moslem and Ashkenazi Jewish patients with dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Possible beneficial effect of vitamin therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **26 (8)**: 816-818.
- [32] Poulsen, L.L., Wedding, R.T. (1970) Purification and properties of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex of cauliflower mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **245**: 5709-5717.
- [33] Erfle, J.D., Sauer, F. (1969) The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and  $\alpha$ -oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **178**: 441-452.
- [34] Reed, L.J., Oliver, R.M. (1968) The multienzyme  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes. *Brookhaven Symp. Biol.*, **21**: 397-412.
- [35] Bunik, V.I., Sievers, C. (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *European Journal of Biochemistry*, **269 (20)**: 5004-5015.
- [36] Mottley, C., Mason, R.P. (2001) Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **276 (46)**: 42677-42683.
- [37] Kooyman, E.C. (1967) Thiyl radicals. *Pure and Applied Chemistry*, **15 (1)**: 81-88.
- [38] Nemeria, N.S., Ambrus, A., Patel, H., Gerfen, G., Adam-Vizi, V., Tretter, L., Zhou, J., Wang, J., Jordan, F. (2014) Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex E1 Component Forms a Thiamin-derived Radical by Aerobic Oxidation of the Enamine Intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, **289 (43)**: 29859-29873.

- [39] Heggermont, W.A., Papageorgiou, A.P., Quaegebeur, A., Deckx, S., Carai, P., Verhesen, W., Eelen, G., Schoors, S., van Leeuwen, R., Alekseev, S., Elzenaar, I., Vinckier, S., Pokreisz, P., Walravens, A.S., Gijssbers, R., Van Den Haute, C., Nickel, A.G., Schroen, B., van Bilsen, M., Janssens, S., Maack, C., Pinto, Y.M., Carmeliet, P., Heymans, S. (2017) Inhibition of MicroRNA-146A and Overexpression of its Target Dihydrolipoyl Succinyltransferase Protect Against Pressure-Overload Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction. *Circulation*, 2017 Jun 13. pii: CIRCULATIONAHA.116.024171. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024171.
- [40] Diaz-Munoz, M.D., Bell, S.E., Fairfax, K., Monzon-Casanova, E., Cunningham, A.F., Gonzalez-Porta, M., Andrews, S.R., Bunik, V.I., Zarnack, K., Curk, T., Heggermont, W.A., Heymans, S., Gibson, G.E., Kontoyiannis, D.L., Ule, J., Turner, M. (2015) The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nature Immunology*, **16 (4)**: 415-425.
- [41] Dumont, M., Ho, D.J., Calingasan, N.Y., Xu, H., Gibson, G., Beal, M.F. (2009) Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *Free Radical Biology and Medicine*, **47 (7)**: 1019-1027.
- [42] Shi, Q.L., Chen, H.L., Xu, H., Gibson, G.E. (2005) Reduction in the E2k subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex has effects independent of complex activity. *Journal of Biological Chemistry*, **280 (12)**: 10888-10896.
- [43] Gibson, G.E., Zhang, H., Sheu, K.F.R., Bogdanovich, N., Lindsay, J.G., Lannfelt, L., Vestling, M., Cowburn, R.F. (1998) alpha-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Annals of Neurology*, **44 (4)**: 676-681.
- [44] Cruts, M., Backhovens, H., Vangassen, G., Theuns, J., Wang, S.Y., Wehnert, A., Vanduijn, C.M., Karlsson, T., Hofman, A., Adolfsson, R.,

- Martin, J.J., Vanbroeckhoven, C. (1995) Mutation analysis of the chromosome 14q24.3 dihydrolipoyl succinyltransferase (dlst) gene in patients with early-onset Alzheimer-disease. *Neuroscience Letters*, **199 (1)**: 73-77.
- [45] Nakano, K., Takase, C., Sakamoto, T., Nakagawa, S., Inazawa, J., Ohta, S., Matuda, S. (1994) Isolation, characterization and structural organization of the gene and pseudogene for the dihydrolipoamide succinyltransferase component of the human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *European Journal of Biochemistry*, **224 (1)**: 179-189.
- [46] Quintana, E., Pineda, M., Font, A., Vilaseca, M.A., Tort, F., Ribes, A., Briones, P. (2010) Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) deficiency in a Spanish patient with myopathic presentation due to a new mutation in the interface domain. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **33**: S315-S319.
- [47] Odievre, M.H., Chretien, D., Munnich, A., Robinson, B.H., Dumoulin, R., Masmoudi, S., Kadhom, N., Rötig, A., Rustin, P., Bonnefont, J.P. (2005) A novel mutation in the dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency. *Human Mutation*, **25 (3)**: 323-324.
- [48] Shany, E., Saada, A., Landau, D., Shaag, A., Hershkovitz, E., Elpeleg, O.N. (1999) Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **262 (1)**: 163-166.
- [49] Sahlman, L., Williams, C.H. (1989) Titration studies on the active sites of pig heart lipoamide dehydrogenase and yeast glutathione reductase as monitored by the charge transfer absorbance. *Journal of Biological Chemistry*, **264 (14)**: 8033-8038.
- [50] Tsai, C.S., Templeton, D.M., Wand, A.J. (1981) Multifunctionality of lipoamide dehydrogenase: Activities of chemically trapped monomeric and dimeric enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **206 (1)**: 77-86.

- [51] Visser, J., Veeger, C. (1968) Relations between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. 3. Protein association-dissociation and the influence on catalytic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, **159 (2)**: 265-275.
- [52] Kalse, J.F., Veeger, C. (1968) Relation between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. I. Relation between diaphorase and lipoamide dehydrogenase activities upon binding of FAD by the apoenzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, **159 (2)**: 244-56.
- [53] Massey, V., Gibson, Q.H., Veeger, C. (1960) Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase). *Biochemistry Journal*, **77**: 341-51.
- [54] Massey, V. (1960) The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, **38**: 447-460.
- [55] Babady, N.E., Pang, Y.P., Elpeleg, O., Isaya, G. (2007) Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104 (15)**: 6158-6163.
- [56] Ambrus, A., Mizsei, R., Adam-Vizi, V. (2015) Structural alterations by five disease-causing mutations in the low-pH conformation of human dihydrolipoamide dehydrogenase (hLADH) analyzed by molecular dynamics – Implications in functional loss and modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic hLADH forms. *Biochemistry and Biophysics Reports*, **2**: 50-56.
- [57] Ambrus, A., Adam-Vizi, V. (2013) Molecular dynamics study of the structural basis of dysfunction and the modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic mutants of human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **538 (2)**: 145-155.

- [58] Liu, T.C., Korotchkina, L.G., Hyatt, S.L., Vettakkorumakankav, N.N., Patel, M.S. (1995) Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its side-directed mutants. *Journal of Biological Chemistry*, **270 (26)**: 15545-15550.
- [59] Tischner, C., Wenz, T. (2015) Keep the fire burning: Current avenues in the quest of treating mitochondrial disorders. *Mitochondrion*, **24**: 32-49.
- [60] Lin, B.Y., Kao, M.C. (2015) Therapeutic applications of the TAT-mediated protein transduction system for complex I deficiency and other mitochondrial diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1350**: 17-28. doi: 10.1111/nyas.12858.
- [61] Rapoport, M., Salman, L., Sabag, O., Patel, M.S., Lorberboum-Galski, H. (2011) Successful TAT-mediated enzyme replacement therapy in a mouse model of mitochondrial E3 deficiency. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, **89 (2)**: 161-170.
- [62] Papadopoulou, L.C., Tsiftoglou, A.S. (2011) Transduction of Human Recombinant Proteins into Mitochondria as a Protein Therapeutic Approach for Mitochondrial Disorders. *Pharmaceutical Research*, **28 (11)**: 2639-2656.
- [63] Rapoport, M., Saada, A., Elpeleg, O., Lorberboum-Galski, H. (2008) TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Molecular Therapy*, **16 (4)**: 691-697.



**Szabó Eszter** a Semmelweis Egyetemen szerezte gyógyszerész diplomáját 2014-ben, azt megelőzően három évben Köztársasági Ösztöndíjbanrészesült. Doktori munkáját 2015 óta a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetében, az MTA-SE Neurobiokémiai Munkacsoportban végzi Ambrus Attila témavezetésével. Nem sokkal Ph.D.-tanulmányai megkezdése után két hónapos külföldi tanulmányúton vett részt a Helmholtz-Zentrum Berlin kutatóintézet Makromolekula Krisztallográfia csoportjában, melynek során megismerkedhetett a röntgenkrisztallográfia alapjaival. Doktori témája a humán  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex E3 alegysége patogén mutánsainak röntgenkrisztallográfiás szerkezetmeghatározása.



**Ambrus Attila** a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetének adjunktusa, az MTA-SE Neurobiokémiai Munkacsoportban tudományos főmunkatárs, végzettségét tekintve okleveles vegyész. A Debreceni Egyetemen a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezte doktori munkáját, doktori értekezését 2001-ben védte meg. Az Arizonai Egyetemen volt posztdoktori ösztöndíjas 2000 és 2006 között, ahol fehérje- és nukleinsav-szerkezetkutatással foglalkozott. A Semmelweis Egyetemen érdeklődésének középpontjában a humán  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex által katalizált ROS-képzésnek, illetve a humán E3-deficiencia betegség molekuláris patomechanizmusának a vizsgálata áll. Fontosabb szakmai elismerései: kétszeri Bolyai Ösztöndíj, Bolyai Plakett, Fulbright Ösztöndíj, EMBO Ösztöndíj („short-term”), Merit Díj (SE).

Haracska, L. and Udvardy, A. (1995)  
Cloning and sequencing a non-ATPase subunit  
of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S  
protease. *Eur. J. Biochem.*, 231: 720–725.

## **A 26S PROTEASZÓMA POLIUBIKVITIN RECEPTOR ALEGYSÉGÉNEK KALANDOS AZONOSÍTÁSA**

**Haracska Lajos<sup>1</sup>, Lipinszki Zoltán<sup>2</sup> és Udvardy Andor<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>MTA SZBK, Genetikai Intézet, <sup>2</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet

### **Összefoglaló**

A szabályozott intracelluláris proteolízis a sejt számára aktuálisan sürgős vagy káros fehérjék eltávolítását végzi. A proteolízis irreverzibilis változásokat hoz létre a sejtben, ami a folyamat szigorú szabályozottságát teszi szükségessé. Két független folyamat biztosítja a proteolízis szigorú szelektivitását. Az ubikvitinációs enzim kaskád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése és egy specifikus poszt-szintetikus módosítással, a poliubikvitinációval a fehérjék bontásra történő kijelölése. A 26S proteaszóma, az intracelluláris fehérje bontást végző multiprotein enzim komplexum felismeri képes a poliubikvitin láncot, mint bontási szignált, megköti és egy többlépcsős folyamat végeredményeként lebontja a kijelölt fehérjét. A 26S proteaszóma első, és talán legfontosabb feladata a poliubikvitin lánc felismerése és megkötése, így rendelkeznie kell egy olyan alegységgel, amely poliubikvitin receptoroként funkcionál. Ennek az alegységnek az azonosítása egy sok éves, kalandos történet. Kezdeti gyors sikernek számított, hogy *in vitro* kötési teszttel magasabbrendű eukariótákban, majd élesztőben is azonosítottak egy alegységet, amely kielégítette egy poliubikvitin receptorral szemben felállított kritériumokat. Problémát jelentett azonban, hogy az élesztő ortológ deléciója nem eredményezett letalitást és a poliubikvitinált fehérjék *in vivo* felhalmozódását – amit a poliubikvitin receptor deléciójától elvártak. Ezek alapján rögtön elvetették még azokat a pozitív eredményeket is, melyeket más eukarió-



ta ortológok tanulmányozásával nyertek és a továbbiakban 6 év kemény munkája kellett annak bizonyítására, hogy a korábban azonosított 26S proteaszóma alegység valamennyi eukariótában poliubikvitin receptorként funkcionál. *Drosophila melanogaster*ben végzett *in vivo* és *in vitro* munkáink ehhez a bizonyítási folyamathoz szolgáltatott új eredményeket.

### **Poliubikvitinált fehérjék szabályozott lebontása**

A sejtek homeosztázisát több különböző, de egymással kölcsönható szabályozó rendszer biztosítja. A legrégebben, és talán legrészletesebben tanulmányozott rendszer a gén-expresszió transzkripcionális szintű szabályozása volt. A fehérjék intracelluláris irányított lebontásának felismerése a múlt század utolsó évtizedében nagymértékben tágította, és újabb szintre, a fehérjék szintjére terjesztette ki ismereteinket a homeosztázis fenntartásáért, és flexibilitásának biztosításáért felelős szabályozási rendszerek sorában. A proteolitikus szabályozás jelentőségét, a biológiai rendszerekben megismert számos reverzibilis regulációs mechanizmussal ellentétesen, irreverzibilis volta határozza meg. A fehérje lebontását követően a folyamatok iránya egyértelműen, visszafordíthatatlanul meghatározottá válik. Számos példa bizonyítja ennek jelentőségét a sejtciklus szabályozásában. A fehérjék lebontását kísérő változások irreverzibilitása természetesen azt igényli, hogy a bontási folyamat rendkívül szigorúan szabályozott legyen, kizárólag csak azokat a fehérjéket érintse, melyek eltávolítása a sejt pillanatnyi homeosztázisa szempontjából elengedhetetlen. E szigorú specificitási feltétel biztosítása érdekében a bontandó fehérje kiválasztását, illetve magát a proteolízis folyamatát két különböző, független rendszer végzi. Az ubikvitinációs enzim kaszkád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése, és ezen fehérjék bontásra történő kijelölése egy specifikus poszttranszlációs módosítással. E módosítás során a bontandó fehérje egy lizin aminosav oldalcsoportjához az enzim kaszkád poliubikvitin láncot szintetizál, amely felismerési jelként szolgál a fehérje bontást végző speciális proteolitikus komplex, a csaknem 50 alegységből felépülő 2,4 MDa nagyságú 26S proteaszóma számára. A szabályozott intracelluláris prote-

olízis specificitását tehát a 26S proteaszóma azon képessége biztosítja, hogy szelektíven csak a poliubikvitinált fehérjéket bontja, tehát egyik – talán legfontosabb – szerepe a poliubikvitinált fehérjék felismerése, megkötése és proteolitikus processzálása.

### **A 26S proteaszóma poliubikvitin receptorának azonosítása**

Az 1990-es évek elején nagyon éles verseny alakult ki több vezető amerikai és európai laboratórium között a 26S proteaszóma szerkezetének, és poliubikvitinált fehérje-felismerő mechanizmusának megismerése terén. Három publikációnkkal kapcsolódtunk be ennek a kérdésnek a megközelítésébe. Sikerült homogenitásig tisztítani a 26S proteaszómát ecetmuslicából (*Drosophila melanogaster*), meghatározni pontos alegységösszetételét, igazolni poliubikvitinált fehérje-bontó képességét és kimutatni két alkompexumának ATP-függő *in vitro* összeszerelődését [1]. Ezt követően klónoztuk és molekulárisan jellemeztük egyik alegységét [2], melyről később bizonyítottuk, hogy a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, a komplexumnak azon alegysége, mely szelektíven képes felismerni és megkötni a poliubikvitinált fehérjéket, és e kötés affinitása a poliubikvitin láncot alkotó ubikvitin egységek számával arányosan nő [3]. Deléciós térképezéssel behatároltuk az alegység azon szakaszait is, melyek a poliubiquitin lánc felismerésében és kötésében részt vesznek.

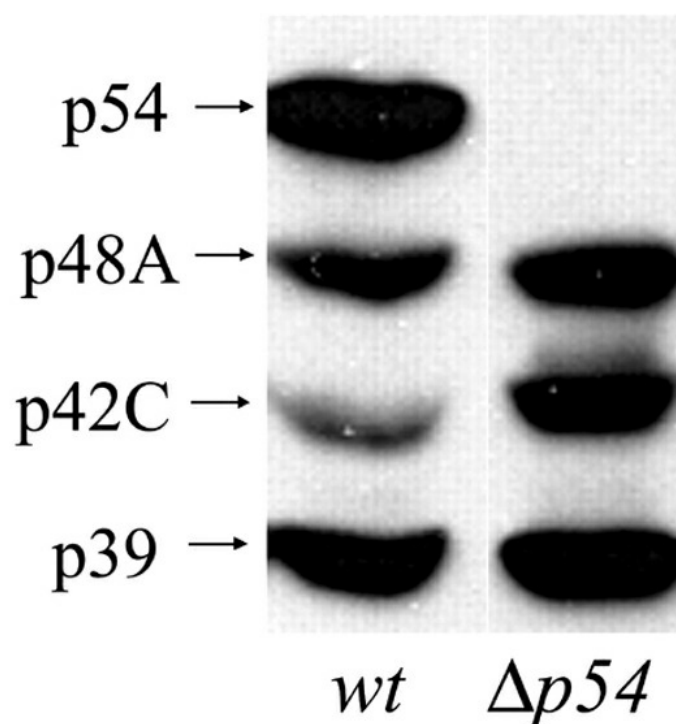
A 26S proteaszóma poliubikvitin receptor alegységét *in vitro* kötési teszttel több eukarióta fajban azonosították (S5a/Rpn10/p54 a humán/élesztő/*Drosophila* ortológok). Ezek az alegységek magas fokú szekvencia homológiát mutattak [4], ennek ellenére fiziológiás szerepüket kérdésessé tette az a megfigyelés, hogy élesztőben az Rpn10-t kódoló gén deletálása nem letális és nem eredményezi a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását [5]. A megfigyelésből a Harvard Egyetem kutatói arra a következtetésre jutottak, hogy vagy a poliubikvitin lánc kötésének kimutatására alkalmazott *in vitro* kötési tesztek aspecifikus kötést detektáltak, vagy pedig léteznek más, nagyobb affinitású poliubikvitin receptorok, melyek *in vivo* képesek komplementálni ennek a fehérjének a funk-

cióját. Az extraproteasómális ubiquitin receptorok felfedezése feloldani látszott ezt a problémát. Ezek a fehérjék (Rad23, Dsk2 és Ddi1) hordoznak egy UBA domént, mely a poliubikvitin lánc szelektív felismeréséért és megkötéséért felelős, valamint egy UBL domént, mely a 26S proteaszómához kötődve lehetővé teszi a szállított poliubikvitinált fehérje proteaszómális betáplálását és lebontását. Rad23 $\Delta$  és Dsk2 $\Delta$  deléciós élesztő mutánsokban a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását észlelték [6], melyet annak megerősítéseként tekintettek, hogy nem az Rpn10 alegység, hanem ezek az extraproteaszómális fehérjék működnek poliubikvitin receptorként. A Harvard Egyetem egy laboratóriumából közölt eredmény évekre felfüggesztette a 26S proteaszóma ezen alegységének funkcionális vizsgálatát. Ha lassan is, de gyűltek az adatok, melyek a Harvard kutatóinak tekintélyét lebontva, kizárólag a tudományos tények alapján lehetővé tette a proteaszóma ubiquitin receptor alegységének azonosítását és működésének tisztázását: a Rad23 $\Delta$  élesztő mutáns sejtekhez viszonyítva a Rad23 $\Delta$ Rpn10 $\Delta$  kettős mutáns élesztő sokkal súlyosabb pleiotróp fenotípusa azt sugallta, hogy az Rpn10 fehérje részt vesz a Rad23 által prezentált poliubikvitinált fehérjék proteaszómális processzáálásában [7]. Végül az élesztő 26S proteaszóma proteolitikus funkciójának tisztított komponensekből történő *briliáns in vitro* rekonstrukciójával Verma és mtsai egyértelműen bizonyították, hogy az Rpn10 alegység valóban poliubikvitin receptorként működik élesztőben [8].

### **Poliubikvitin receptor funkciót alátámasztó *Drosophila* genetikai bizonyítékok**

Az élesztő Rpn10 deléciós mutáns fenotípusának hibás értelmezése azért meglepő, mert az Rpn10 és magasabb eukarióta ortológjainak szekvenciája korábban már ismert volt. A szekvencia adatokból nyilvánvaló volt, hogy bár az Rpn10 magas fokú szekvencia homológiát mutat a magasabb eukarióta ortológokkal, az alegység azonban lényegesen rövidebb, a C-terminálisáról hiányzik egy jelentősen hosszú, magasabbrendű eukariótákban nagymértékben konzerválódott szakasz.

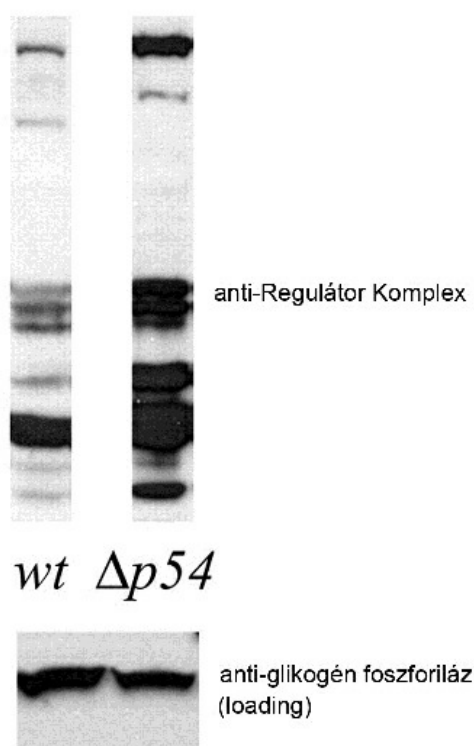
Ezeknek a szekvencia adatoknak ismeretében további vizsgálatainkban feltételeztük, hogy az élesztő deléciós mutáns nem nyújthat teljes információt az S5a vagy a p54 tényleges funkciójáról. Annak bizonyítására, hogy a *Drosophila* p54 alegység valóban a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, konstruáltunk egy p54 $\Delta$  deléciós mutánst (1. ábra).



**1. ábra. A 26S proteaszóma regulátor komplexum p54 alegységének detektálása vad típusú és p54 $\Delta$  deléciós *Drosophila* törzsekben.** Vad típusú (wt) ill. p54 $\Delta$  *Drosophila* lárvákból készített teljes fehérje kivonatot 8%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk, majd 4 különböző regulátor komplex specifikus monoklonális ellenanyaggal immunoblotos technikával vizsgáltuk.

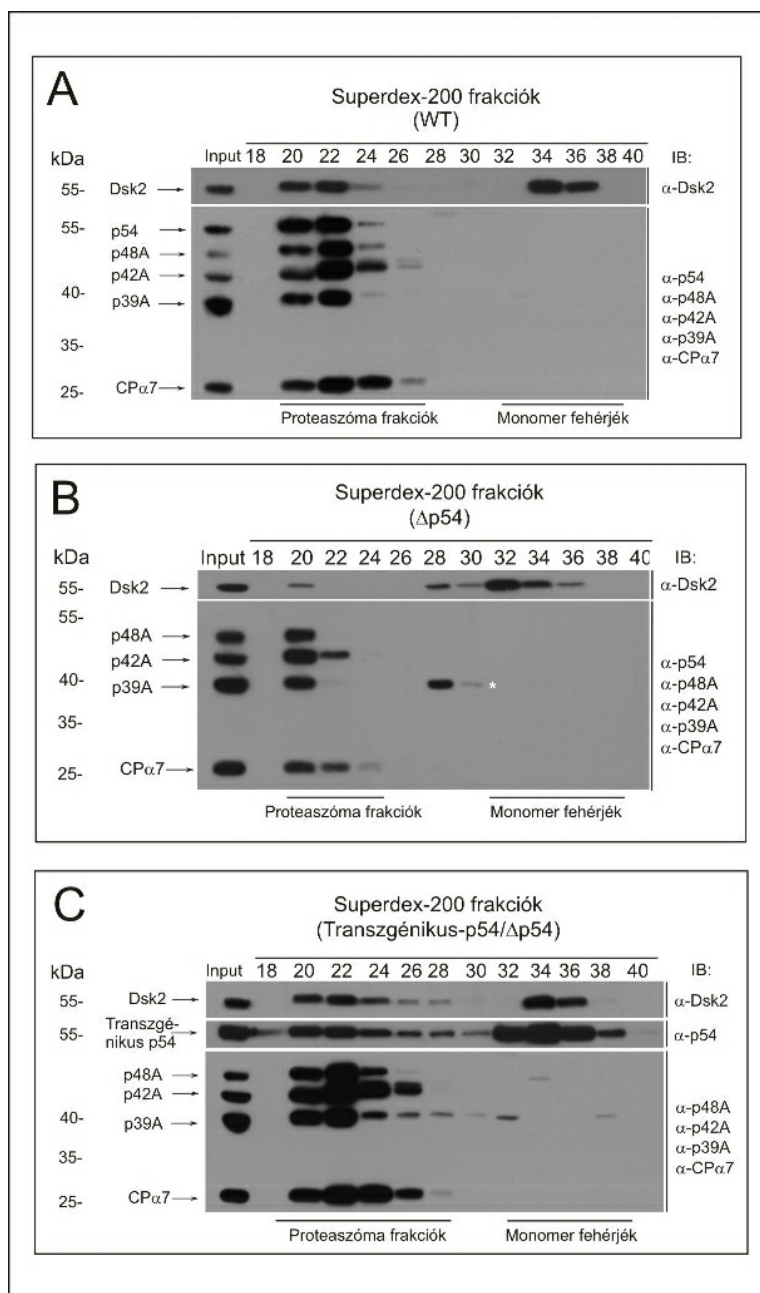
Várakozásunknak megfelelően a deléciós mutáns azt a fenotípust mutatta, amit egy esszenciális poliubikvitin receptor deléciós mutánstól elvárhatunk: a deléció mitótikus hibákat, fejlődési rendellenességeket és korai báb letalitást, valamint a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte [9]. Vizsgálataink, Verma és mtsai egy évvel később élesztőben végzett *in vitro* kísérleteivel együtt nyugvó pontra juttatták a 26S proteaszóma poliubikvitin receptor azonosításának kalandos útját. A tudomány legnagyobb ereje, hogy a tekintély erejével szemben is önkorrekcióna képes.

A deléció váratlan és érdekes következménye volt a csaknem 50 proteaszómális alegység koordinált, extrém fokú túltermelődése (2. ábra).



**2. ábra. A 26S proteaszóma nagyfokú túltermelődést mutat p54Δ deléciós *Drosophila* törzsben.** Egyetlen 20 órás vad típusú (wt), illetve p54Δ deléciós báb teljes fehérje extraktumában a 26S proteaszóma katalitikus és regulátor komplexum alegységeinek immunoblotos detektálása. Alsó panel: glikogén foszforiláz (bemérési kontroll).

A túltermelődött alegységek összeszerelődtek egy defektív 26S proteaszóma partikulummá, amelyből csak a p54 alegység hiányzott. A túltermelődés koordináltságát az bizonyította, hogy szabad proteaszómális alegységet a deléciós mutánsban kimutatni nem lehetett, valamennyi alegység fehérje 26S proteaszóma partikulummá összeszerelt állapotban volt jelen a deléciós mutánsban. Ez a koordináltság azért is érdekes, mert az alegységeket kódoló gének a *Drosophila* genom legkülönbözőbb pontjain helyezkednek el. A jelenség pontos mechanizmusa mindmáig ismeretlen.



**3. ábra. A Dsk2 csak a p54 jelenlétében kötődik a proteaszómához. A)** Gélszűrési-kromatográfiával (Superdex 200) igazoltuk, hogy a vad típusú (WT) bábokban a Dsk2 egy része a proteaszómához kötődik (fr. 20-24), míg a többi extraproteaszómálisan halmozódik fel (fr. 34-36). **B)** Δp54-es állatokban a Dsk2 csak nyomokban mutatható ki a proteaszómában. **C)** A transzgénikus p54, amely beépül a Δp54-es proteaszómába a Dsk2 újbóli proteaszómális kötődését hozza létre. IB – immunoblot a következő ellenanyagokkal: anti-Dsk2, anti-p54, anti-p48A, anti-p42A és anti-p39A (a 19S regulátor komplexum alegységei), anti-CPα7 (a 20S katalitikus mag alfa alegysége).

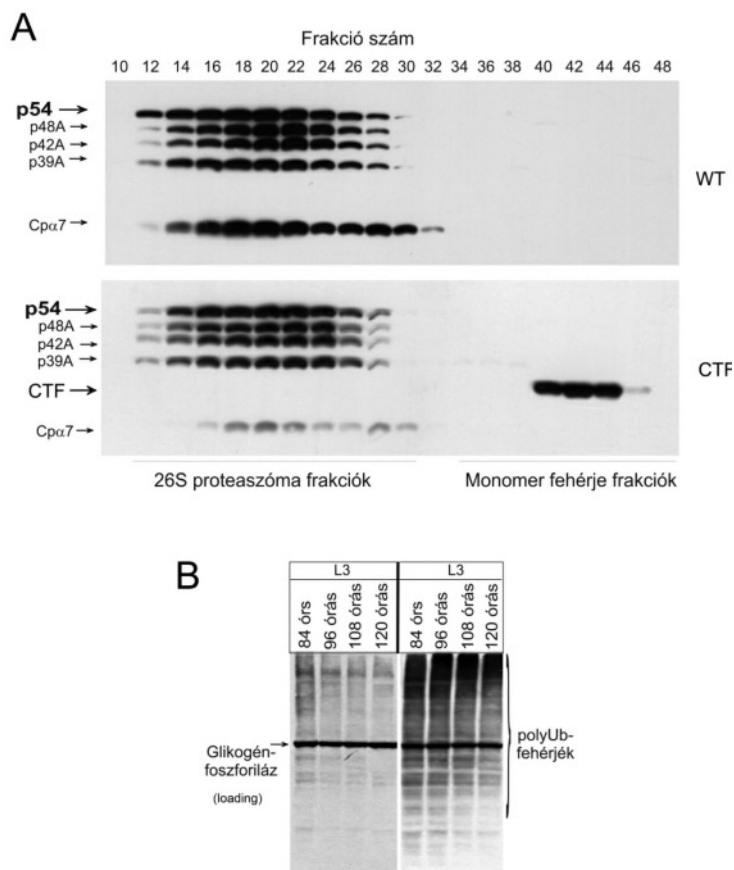
A p54 alegység esszenciális poliubikvitin receptor funkciójának igazolása után részletesen vizsgáltuk az extraproteaszómális ubiquitin receptorok kölcsönhatásait a 26S proteaszómával, ezen belül is a p54 alegységgel, és ezeknek a

kölcsönhatásoknak szabályozását. Ha ecetmuslicában RNAi technikával a Dsk2 poliubikvitin receptor szintjét csökkentettük vagy transzgénikus állatokban túltermeléssel növeltük a poliubiquitinált fehérjék felhalmozódását figyeltük meg és az állatok bábstádiumban elpusztultak, ami a Dsk2 esszenciális szerepét bizonyítja [10]. Tehát szemben az élesztő sejtekkel, magasabb eukariótákban a poliubiquitin receptorok nem képesek komplementálni egymás funkcióit, valamennyi poliubikvitin receptor specifikus szubsztrát garnitúrával rendelkezik, melyek proteaszómális processzálásáért kizárólagosan felelősek. *In vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletekben kimutattuk, hogy a proteaszómális p54 alegység fizikai kölcsönhatásba lép a Dsk2 UBL doménjével, amit később transzgénikus állatokkal végzett kísérletekkel *in vivo* is igazoltunk. A várakozásnak megfelelően a Dsk2 és a 26S proteaszóma kölcsönhatása p54 $\Delta$  deléciós mutáns törzsben nem mutatható ki. Ha a p54 $\Delta$  háttéren transzgénikus p54-et termeltettünk, a transzgénikus fehérje beépült a proteaszómába, és ezzel együtt az endogén Dsk2 ismét képes volt kölcsönhatást kialakítani a 26S proteaszómával (3. ábra) [10]. Ennek ismeretében kijelenthetjük, hogy a *Drosophila* Dsk2 a p54-en alegységen keresztül kapcsolódik a proteaszómához, a p54 alegységen keresztül tudja az általa szállított poliubikvitinált fehérjét a proteaszómának proteolitikus lebontásra átadni. Ez a mechanizmus szöges ellentétben áll az élesztőben megfigyelttel, ahol a Dsk2 és az Rpn10 versengenek egy közös proteaszómális kötőhelyért [11].

### **A poliubikvitin receptor szabályozása**

Az élesztő és a magasabb eukarióta sejtek poliubikvitinált fehérjeproccesszálási mechanizmusában kimutatott alapvető különbségek további vizsgálatánál abból a megfigyelésből indultunk ki, hogy proteaszómális poliubikvitin receptorjaik (p54 ortológok) között a lényeges különbség e fehérjék C-terminális részében van. Ezért célszerűnek látszott megvizsgálni a p54 alegység C-terminális felének kölcsönhatásait az extraproteaszómális poliubikvitin receptorokkal, valamint e kölcsönhatások szabályozási mechanizmusait.

A p54 fehérje N-terminális felében lévő vWA domén felelős az alegységnek a 26S proteaszómához történő kapcsolódásáért, ezért olyan transzgénikus *Drosophila* törzset konstruáltunk, amelyben a p54 C-Terminális Felét (CTF) lehet túltermeltetni.

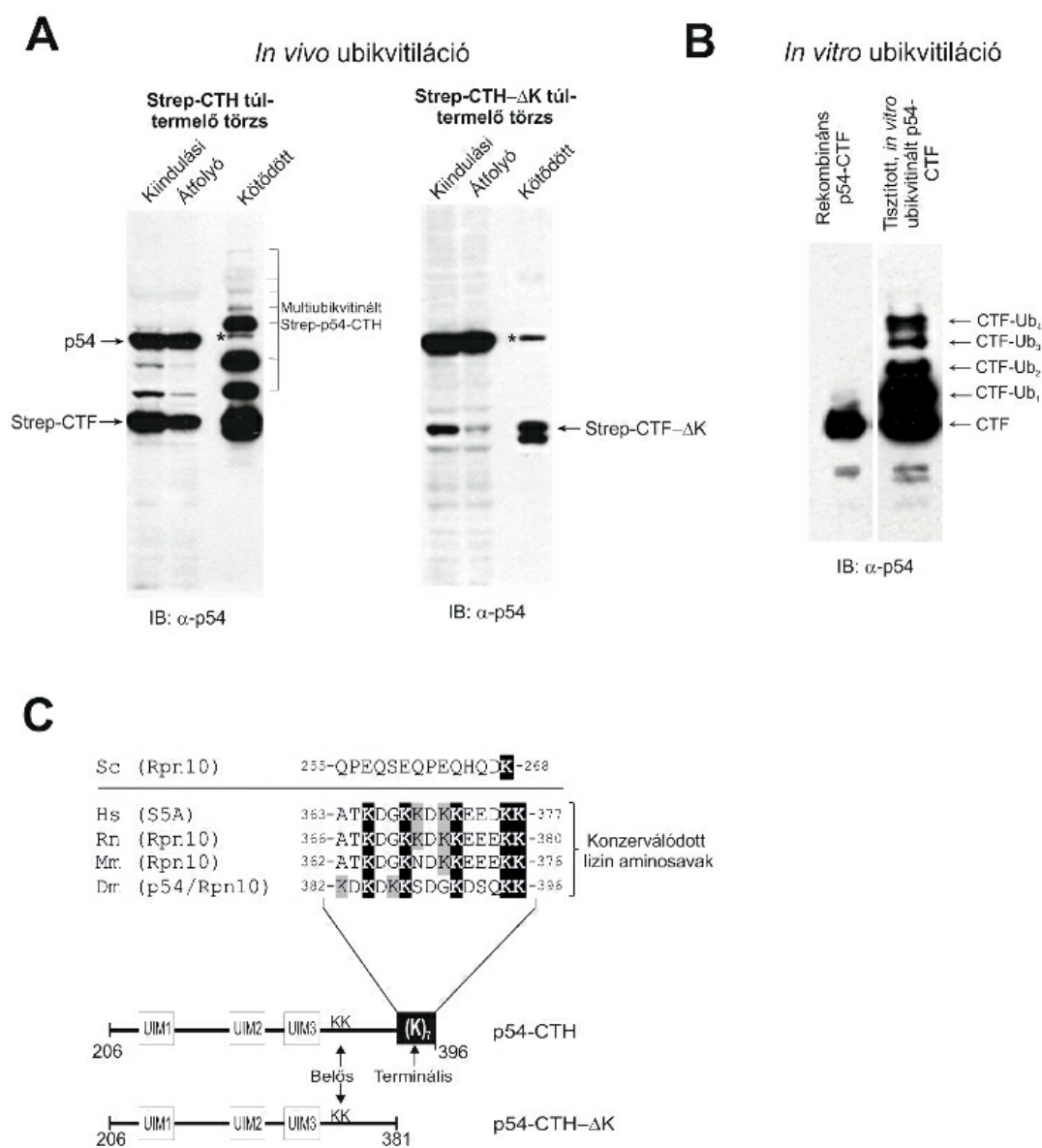


**4. ábra. A transzgénikusan túltermeltetett p54-CTF fehérje nem kötődik a proteaszómához és a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felhalmozódását idézi elő. A)** Vad típusú (WT) és CTF transzgénikus lárvák teljes fehérje extraktumát Superose 6 FPLC oszlopon frakcionáltuk. A 26S proteaszóma alegységeit immunoblotos technikával detektáltuk. **B)** Poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását a CTF transzgénikus lárvákban anti-ubikvitin ellenanyaggal detektáltuk.

Várakozásunknak megfelelően ez a fehérje nem kapcsolódott a 26S proteaszómához, extraproteaszómálisan halmozódott fel, a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte, és az állatok lárvastádium végi pusztulását okozta (4. ábra). Affinitás-kromatográfiával tisztított transz-génikus CTF tömegspektrometriai elemzése kimutatta, hogy a CTF *in vivo* ubikvitilálódik, amit *in vitro* is sikerült reprodukálnunk [12]. A CTF-ben található egy, a magasabbrendű eukariótákban konzerválódott, terminálisan elhelyezkedő lizin csoport (5. ábra). Ha ezeket a lizineket eltávolítottuk és az így csonkolt fehérje



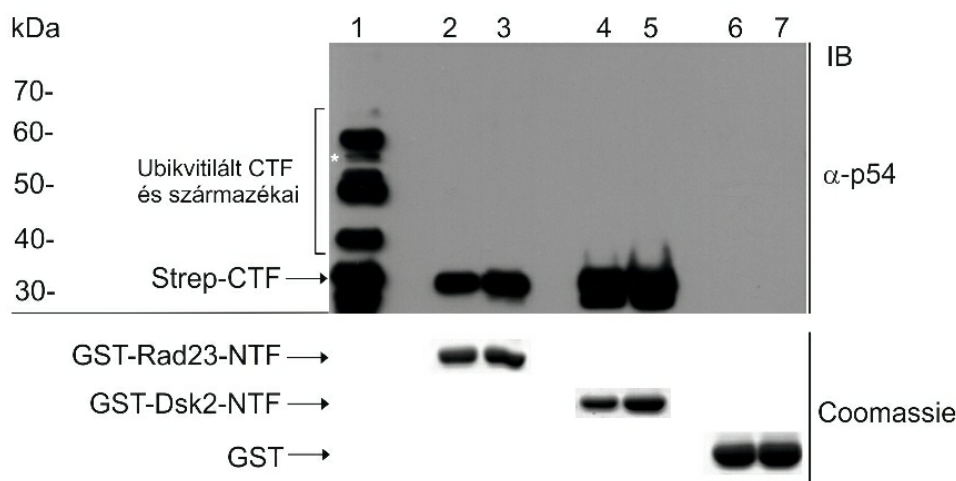
expressziójára készítettünk transzgénikus *Drosophilát* (CTF-ΔK), a transzgénikus fehérjében ubikvitilációt nem lehetett kimutatni, tehát az ubikvitiláció a terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki.



**5. ábra. Transzgénikus CTF *in vivo* multiubikvitinált, *in vitro* multiubikvitinálható. A)** Strep-oszlopon tisztított p54-CTH fehérjén a módosítás a C-terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki, ami a CTF-ΔK fehérjén nem alakul ki. **B)** Rekombináns p54-CTF-et *Drosophila* embrió extraktumban inkubálva a CTF poszttranszlációs módosítása *in vitro* is kialakul. **C)** A multiubikvitináció a p54 terminális, magasabbrendű eukariótákban konzerválódott lizin oldalcsoportjain alakul ki.

Bizonyítottuk, hogy a p54 C-terminális lizinjein multiubikvitiláció (több lizin oldalcsoport egyidejű monoubiquitinációja) történik, és ez a módosítás – szem-

ben a poliubikvitinációval - nem degradációs jel; az ubiquitilált CTF féléletideje ugyanis több mint 2 nap. Fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérleteink azt igazolták, hogy az ubikvitilált CTF nem képes kapcsolódni a Dsk2 UBL doménjéhez, a módosítás gátolja a két fehérje közti interakciót, tehát ez a poszt-szintetikus módosítás regulációs szerepű (6. ábra). A módosítás nemcsak a p54 fehérje CTF-ben alakul ki, teljes hosszúságú p54-et termelő transzgénikus törzsekben hasonlóan kimutatható, s itt is a terminális lizinek multiubikvitilációja következik be, viszont a módosított formák soha nem épülnek be a proteaszómában, kizárólag extraproteaszómális halmazokba kerülnek fel (7. ábra).

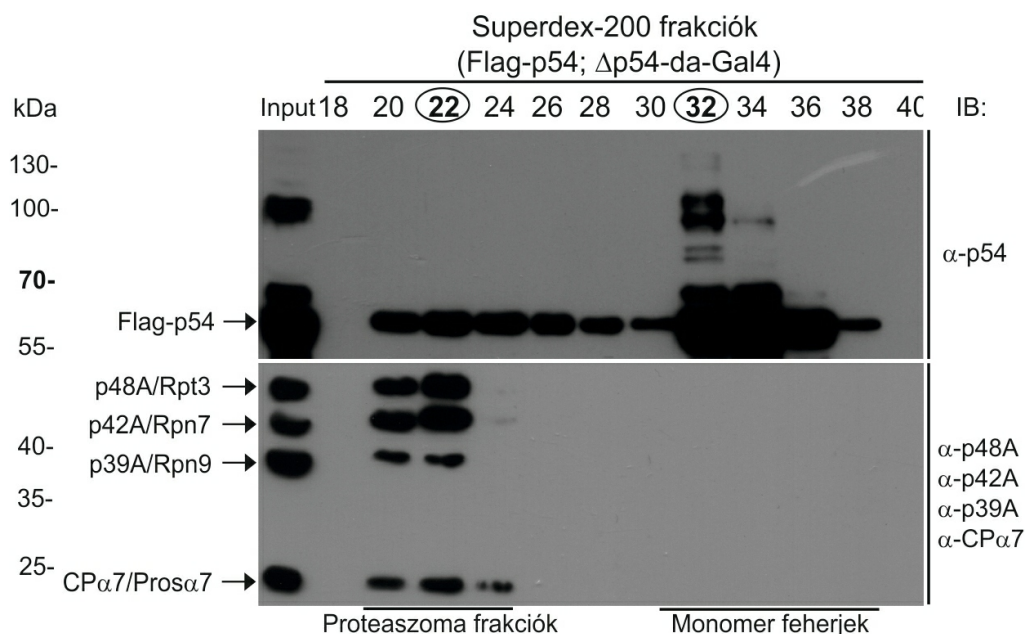


**6. ábra. A CTF multiubikvitilálása felfüggeszti a Rad23 és Dsk2 extraproteaszó-mális poliubikvitin receptorok CTF-lel történő kölcsönhatását.** Tisztított Strep-CTF és multiubikvitinált származékait affinitás oszlopokhoz kötött GST-Rad23, illetve GST-Dsk2 fehérjékkel (azok N-terminális felével (NTF)) inkubáltuk. Az affinitás oszlophoz kötődő CTF származékokat eluáltuk és immunoblot technikával azonosítottuk. Csak a módosítatlan CTF kötődött a Rad23, illetve Dsk2 fehérjékhez.

Ez a megfigyelés is a multiubikvitiláció szabályozó szerepét bizonyítja. Ezeknek a csak magasabb eukariótákban megtalálható terminális, konzerválódott lizin oldalcsoporthoz fontos vitális szerepük van. Vizsgálataink szerint a *Drosophila* p54 $\Delta$  deléciós törzs letális fenotípusát tökéletesen menekíteni lehet, ha transzgénikus p54 fehérjét fejeztetünk ki a mutáns háttéren.

A transzgénikus p54 fehérje beépül a 26S proteaszómába és komplementálja a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását és a letális fenotípust. Olyan transzgénikus p54 fehérje, amelyből a terminálisan elhelyezkedő, konzerválódott lizin

oldalcsoportokat tartalmazó utolsó 14 aminosavat eltávolítottuk, beépül ugyan a 26S proteaszmába, kölcsönhatásba lép a Dsk2-vel, de nem képes teljesen komplementálni az endogén p54 funkcióját [13].



**7. ábra. Transzgénikus p54 fehérje in vivo multiubikvitilálódik, de a poszttranszlatív módon módosított formái nem épülnek be a 26S proteaszmába.** p54Δ deléziós mutánsban transzgénikus p54 fehérjét (Flag-p54) termeltettünk, a teljes lárvális fehérje extraktumot Superdex 200 FPLC oszlopon frakcionáltuk és a proteaszmába beépült, illetve extraproteaszmális p54 fehérjéket immunoblotos technikával azonosítottuk.

Emiatt az állatok elpusztulnak. Laboratóriumunkban jelenleg a terminális lizin oldalcsoportok ezen esszenciális funkciójának molekuláris elemzése folyik.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA-PD115404), a Nemzetgazdasági Minisztérium (GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00032 és GINOP-2.3.2-15-2016-00020), valamint az MTA támogatja (Bolyai János Kutatási Ösztöndíj).



**Haracska Lajos**, molekuláris biológus, az MTA SZBK Biokémiai Intézetében Udvardy Andor témavezetésével védte meg Ph.D. dolgozatát fehérje ubikvitiláció és szabályozott lebontás témakörben. Posztdokorként többek között az USA-ban a UTMB-n az ubikvitiláció DNS hibajavításban betöltött szerepét tanulmányozta. Jelenleg az SZBK Genetikai Intézetében vezetője a Mutagenesis és Karcinogenesis Kutatócsoportnak, amely az elmúlt években több új, a DNS hibatoleranciában szerepet játszó ubikvitin-ligáz és ubikvitin-kötő fehérje szerepét tárta fel.



**Lipinszki Zoltán** a Szegedi Tudományegyetemen szerzett biológus diplomát 2006-ban, majd az MTA SZBK Biokémiai intézetében Udvardy Andor csoportjában védte meg Ph.D. dolgozatát a poliubikvitin receptorok jellemzése és szabályozása témakörben 2009-ben. FEBS posztdoktori ösztöndíjjal 4 évet töltött a Cambridge-i Egyetemen, ahol David Glover témavezetésével a sejtosztódás szabályozásában résztvevő fehérje módosítások regulációs szerepét vizsgálta. 2015 óta tudományos főmunkatárs, az SZBK Biokémiai intézetében a Sejtciklus és Transzkripció Szabályozás Csoport vezetője. Kutatási témája a mitózis irányítását végző ubiquitilációs és foszforilációs folyamatok feltárása.



**Udvardy Andor** a Budapesti Orvostudományi Egyetemen 1962-ben orvosi diplomát, az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen 1968-ban pedig matematikusi diplomát szerzett. 1971 óta az MTA SZBK kutatója. 1974-ben nyerte el a kandidátusi fokozatot, 1987-ben a tudományok doktora címet. 1989-től az EMBO tagja. Tanulmányúton járt Marburgban, Göttingenben és Princetonban. Kutatási területe a molekuláris biológia, különös tekintettel a génextresszió, a kromatin szerkezete és a fehérjebontás szabályozása.

### Irodalomjegyzék

- [1] Udvardy, A. (1993) Purification and characterization of a multiprotein component of the Drosophila 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **268 (12)**: 9055-62.
- [2] Haracska, L., Udvardy, A. (1995) Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the Drosophila 26S protease. *Eur J Biochem*, **231 (3)**: 720-5.
- [3] Haracska, L., Udvardy, A. (1997) Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the Drosophila 26S protease. *FEBS Letters*, **412 (2)**: 331-6.
- [4] Ferrell, K., Deveraux, Q., van Nocker, S., Rechsteiner, M. (1996) Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *FEBS Letters*, **381 (1-2)**: 143-8.

- [5] vanNocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H.Y., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Molecular and Cellular Biology*, **16 (11)**: 6020-6028.
- [6] Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature Cell Biology*, **3 (10)**: 939-43.
- [7] Lambertson, D., Chen, L., Madura, K. (1999) Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **153 (1)**: 69-79.
- [8] Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, **118 (1)**: 99-110.
- [9] Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., Deak, P., Kurucz, E., Ando, I., Viragh, E., Udvardy, A. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **116 (Pt 6)**: 1023-33.
- [10] Lipinszki, Z., Pal, M., Nagy, O., Deak, P., Hunyadi-Gulyas, E., Udvardy, A. (2011) Overexpression of Dsk2/dUbq1n results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit. *The FEBS Journal*, **278 (24)**: 4833-44.
- [11] Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N., Glickman, M.H. (2008) Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Molecular Cell*, **32 (3)**: 415-25.
- [12] Lipinszki, Z., Kiss, P., Pal, M., Deak, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradzsky, K.F., Udvardy, A. (2009) Developmental-stage-specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **122 (Pt 17)**: 3083-92.
- [13] Lipinszki, Z., Kovacs, L., Deak, P., Udvardy, A. (2012) Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors. *Biochemistry*, **51 (12)**: 2461-70.

## MOLEKULÁRIS ÉLETTUDOMÁNYI KONFERENCIA 2017

Ez év március 31. és április 2. között került megrendezésre - immáron harmadik alkalommal - a „Molekuláris Élettudományi Konferencia 2017 (Hungarian Molecular Life Sciences 2017)” Egerben, a Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE), Magyar Genetikusok Egyesülete (MAGE) és annak Sejt- és Fejlődésbiológiai Tagozatának szervezésében. A konferencia lebonyolítását ismételten a Diamond Congress Kft. csapata végezte a rájuk jellemző professzionálissal. Munkájuknak köszönhetően a konferencia nem csak szakmailag volt kifogástalan.

Az első ilyen típusú konferenciát 2013-ban rendezték Siófokon. Mára a legnagyobb magyarországi élettudományi szimpóziummá nőtte ki magát a rendezvény, melynek célja már akkor is egy közös fórum létrehozása volt a biokémia, a genetika, a molekuláris-, sejt- és fejlődésbiológia területén tevékenykedő kutatók számára, illetve a felsőoktatási intézményekben és akadémiai kutatóhelyeken dolgozó csoportok közötti kommunikáció és együttműködés elősegítése. Ez a cél mára sem veszítette el aktualitását, sőt, a biológiai kutatások komplexitásának folyamatos növekedése miatt időszerűbb, mint valaha.

Az idei konferencián összesen 365 fő vett részt. Pénteken és szombaton 2-2 plenáris előadás, majd 12 párhuzamos szekcióban összesen 66 beszámoló hangzott el változatos témákban. A szervezőknek nem volt könnyű dolga, amikor az előadásokat tematikus csoportokba kellett rendezniük úgy, hogy az azonos érdeklődési körre számot tartó témák lehetőség szerint ne kerüljenek párhuzamos szekcióba és azonos időbe. Dicséretükre szóljon, hogy e lehetetlennek tűnő vállalkozást remekül oldották meg, ezért csak elvétve kellett a szekciók között ingázni. Külön említésre méltó a szervezők által biztosított mobil applikáció. Ez - az előzetesen vagy a helyszínen letölthető alkalmazás - lehetővé tette a gyors és problémamentes keresést az előadások/poszterek között, és könnyedén elérhetőek voltak az absztraktok is. Külön érdekesség, hogy az

előadásokat értékelni is lehetett, ami hasznos visszajelzést nyújtott az előadók számára.

A színvonalas előadások mellett 174 poszter került kiállításra, melyeket két poszter szekció keretében mutattak be a résztvevők. A posztereken bemutatott eredmények iránt igen nagy volt az érdeklődés. A szekciók kellemes, baráti hangulatban zajlottak, ahol igen változatos témák kerültek megvitatásra, és sok hallgató is lehetőséget kapott munkájának bemutatására. Általánosságban elmondható, hogy a program összeállításakor mindvégig kiemelt hangsúlyt kapott, hogy a plenáris előadásokat tartó „nagy öregek” mellett a fiatalabb nemzedék is szót kapjon. Mivel a konferencia nyelve az angol volt, ez jó alkalmat biztosított a gyakorlásra, elősegítve, hogy a fiatalok a nemzetközi konferenciákon is megállják a helyüket.

A konferencia zárásakor a legjobb poszterek elismerésben részesültek. Az értékelő bizottság két első és két második díjat ítelt oda:

1. díj: *Berecz Tünde, illetve Hegedűs Lili*
2. díj: *Hajdu-Soltész Borbála, illetve Laurinyecz Barbara.*

A tudományos program mellett a biotechnológiai és laborfelszereléseket kínáló cégek is lehetőséget kaptak a bemutatkozásra. Idén 23 cég képviselői mutatták be termékeiket. Ez remek lehetőséget kínált arra, hogy megismerkedjünk a legfrissebb termékekkel és szolgáltatásokkal. Külön köszönet illeti meg azokat a cégeket, amelyek szponzorként is hozzájárultak a konferencia megrendezéséhez.

Összességében elmondhatjuk, hogy egy szakmailag magas színvonalú, alkotószellemű rendezvényen vehettünk részt.

Köszönet a szervezőknek (Virág László, Kovács Mihály, Erdélyi Miklós, Mihály József, Sass Miklós, Szabó Gábor) áldozatos munkájukért!

*Hegedűs Lili*

*Ph.D. hallgató*

*MTA SZBK, Genetikai Intézet, Mutagenézis és Karcinogenezis Csoport*

*Kiss Ernő*

*tudományos főmunkatárs*



**1. kép. Nagy népszerűségnek örvendett mindkét poszter szekció. (Fotó: Thaler Tamás)**



**2. kép. Buday László (az MBKE elnöke) és Hajdu-Soltész Borbála poszterdíjas. (Fotó: Thaler Tamás)**





**3. kép. 23 cég képviselői mutatták be termékeiket. (Fotó: Thaler Tamás)**



**4. kép. Gálavacsora a Hotel Eger-Park nagytermében. (Fotó: Thaler Tamás)**



**5. kép.** A szervezők által biztosított mobil applikáció nagymértékben segítette az eligazodást az egyes előadások/szekciók között.

**BESZÁMOLÓ A PEPTIDKÉMIAI MUNKABIZOTTSÁG  
2017. ÉVI TUDOMÁNYOS ÜLÉSÉRŐL**

Az MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Tudományos Bizottság keretében működő Peptidkémiai Munkabizottság ez évi tudományos ülését május 29.-31. között a szokásokhoz híven a Richter Gedeon Nyrt. üdülőjében tartotta Balatonszemesen. A rendezvényen a munkabizottság tagjain kívül számos előadó, érdeklődő és kiállító, összesen 83 fő vett részt.

A gazdag tudományos program 8 szekciójában igen sok, a tavalyi 35 előadással szemben 45 előadás hangzott el. Örvendetesen sok Ph.D. hallgató vehetett részt és számolt be a kutatási eredményeiről, ami az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért, a Pázmány-Eötvös Természettudományi Információs Alapítvány és a MedInprot által nyújtott anyagi támogatásnak köszönhető. Két angol nyelvű szekció keretében 8 előadás hangzott el, részben Magyarországon dolgozó külföldi kutatók, részben hazai előadók által. Meghívott előadóként Prof. Dirk Tourwe (Vrije Universiteit, Brussels, Belgium), a European Peptide Society korábbi titkára tartott előadást *Multitarget peptides for chronic and neuropatic pain* címen. A további szekciók a következő témaköröket ölelték fel: *Peptidek kórokozók ellen, Biokonjugátumok I.-II., Proteinek, Peptid szintézisek, analitika, szerkezetvizsgálat, Modellezés, receptorok.*

Első este a bőséges, finom vacsora után került sor a Peptidkémiai Munkabizottság ülésére, ahol frissen sült pogácsa és remek borok kóstolása mellett került sor a MB ügyeinek megtárgyalására. Második délután céges előadásokra is sor került, a Simkon Kft. „*Analitikai megoldások a Shimadzutól a peptidkémia szolgálatában*”, a Gen-Lab Kft. „*Mit tehetünk HPLC oszlopaink védelmében?*” címmel tartott előadást. Ezután az érdeklődők ellátogathattak a Léglí birtokra és borkóstolón vehettek részt.

A rendezvényen 6 cég (ABL&E-JASCO Magyarország Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Gen-Lab Kft., LAB-EX Kft., a Sigma-Aldrich Kft, Merck Kft., Simkon Kft.) mutatta be a termékeit kiállítás formájában, és szponzori támogatással, illetve a most is igen népszerű, a cégek által feltett kérdéseket tartalmazó Totóhoz felajánlott nyereményekkel támogatta a Munkabizottsági Ülést, amelyet ezúton is köszönünk.

A családi környezet, az ízletes ételek, a szép környezet, a remek időjárás, bátrabbaknak a balatoni csobbanás remek háttérrel nyújtottak a magas szintű tudományos programnak és a tudományos eszmecseréknek.

*Tóth Gábor*  
elnök

*Szűcs Mária*  
titkár



## EGYPERCESEK

### Beszélő

Megszületik és testbeszél. Gügyög. Szavakat alkot és alkalmaz.  
 Karattyol. Fecseg.  
 Beszélget. Elbeszél.  
 Áthallással beszél. Metakommunikál. Asszociál.  
 Beszél magához. Gondolattársnak félszavakkal. Hallgatónak parttalanul.  
 Félrebeszél, szavakat téveszt.  
 Suttog. Motyog. Grimaszol.  
 Abbahagyja.

### TŰZkeresztség

Tűzrakás: ősi, zsigeri, varázsos, bátor. *Áldassék a Tűz csiholója.*  
 Alkímia: a természetfilozófus *Marat* az égő anyagból látni vélte a *flogiszonok* elillanását.  
 A vegyész *Lavoisier* varázstalanította a tüzet. Bizonyította: egyesülés a levegő oxigénjével.  
 Az alkímiának befellegzett, a középkor bealkonyult. Elhamvadtak.  
 Hamvaikból *főnix*ként kelt életre egy új kor és a modern kémia.  
 A francia forradalomban *Marat kinyírva*, *Lavoisier* lefejezve végezte.  
 Legalább nem máglyán.

### Popzene

Szent István napi koncert, reneszánsz zene. A XVI. században populáris volt.  
 Most gyönyörű.  
 Karizmatikus előadó éneke. Most szívbe markoló.  
 Ráadás dal. Nyilvános könyörgés az államalapítóhoz. Most szép.  
 Vajon milyen lenne ez a könyörgés prózában? Áthallásos? Most kijózanító.  
 A zene konzervál. Nélküle a szöveg elévül. Mai környezetben alig értelmezhető.

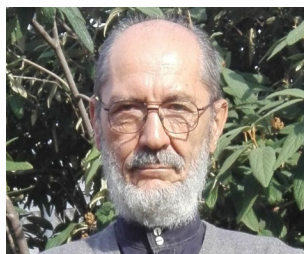
Tánc: szólóban, párban és csoportosan. Tánciskolában, tereken. Testrészeink közvetítésével.  
 Az ének és élvezete a legősibb kölcsönhatás, zsigeri kommunikáció: torkod és belsőm, lelkeink között.  
 Baktériumtörzsek, hangyaboly, méh- és vándorsáska-rajok, lemmingek is.  
 Csík-koncert, világzene. Világi. Mélabús ének. Elnyújtott, fájdalmas. Eufórikus, hullámzó tömeg.  
 Egymásra hangolódás: együtt-tátogás, bólogatás, vonaglás, imbolygás, csápolás. Egyek leszünk. Pszichológusok szerint *beat entrainment*: a ritmus felvétele, tömegek összehangolódása. Sámánhoz, hordószónokhoz, karizmatikus előadóhoz. Papagájok és fókák képesek rá, majmok nem. Ugra-bugráló evolúció.

**Értékrend? Mondd, mit érlel?**

**Sport.** Évekig készülnek. Cirkuszi játékok, olimpia. Szurkolunk és szórakozunk. Másodperceken, centiken, kapufán, bírói döntésen, szerencsén múlik. Érmeseink specialisták, együgyes, egydimenziós hősök: idő, hossz, súly. Csodálat. Életfogytos tiszteletdíj. Sporttörténelem. Hol sírjaik domborulnak. Félrevizelő, géndoppingolt. Előbb-utóbb utoléri. Sánta kutya. Ami ritka, értékes. Ami hibás, még értékesebb: sziámi iker, kék Mauritius bélyeg. Hátrányos helyzetű sportoló. Paralimpia, félpénzért?

**Kultúra.** A költő - ajkán csörömpöl a szó.  
Neve, ha van, csak áruvédjegy?  
Vers, szeretőnek? Csokorba szedve, kiadónak? Ki veszi?  
Önboncolás? Halhatatlanság...  
Két deci fröccsel becsüljük magunk'

**Tudomány.** Kíváncsi kutat. Kutató matat, éveken át. Támogatása csordogál. Gondolatban kísérletezik, számítógépen szimulál.  
Előadás: a szó elszáll. Megtiszteltetés, ha meghallgatják. Udvarias taps. Tanácsot ad. Kit érdekel?  
Írásban közöl: fiókban marad. Közleménye, ha megalapozott, felszáll az internet felhőjébe.  
Kézfogás, plecsni. Nobel-díj? Dízsírhely...  
„Kuncog a krajcár: ennyiért dolgoztál”  
JA!



**Maksay Gábor** neurobiokémikus, molekuláris farmakológus, az MTA Természettudományi Kutatóközpont kutató emeritus professzora. Érdeklődési területek: kémiai kommunikáció, fehérjék szimmetriáértéke, interdiszciplináris ismeretterjesztés, ismeretelmélkedés, film-elemzés, vitorlázás.

## FELHÍVÁS

A Biokémia folyóirat szerkesztőbizottsága egy új rovatot indít „**Olvasói levelek**” címen, ahová az olvasók beküldhetik az újság jelen rovataiba nem besorolható írásaikat, illetve a korábban megjelent cikkekre reflektáló gondolataikat, véleményüket. Az írások csak abban az esetben kerülnek közlésre, ha azok nyelvezetét és tartalmát a szerkesztőbizottság a Biokémia szellemiségével összeegyeztethetőnek tartja.

A leveleket Gallyas Ferenc szerkesztőbizottsági tagnak kérjük küldeni a következő e-mail címre: [ferenc.gallyas@aok.pte.hu](mailto:ferenc.gallyas@aok.pte.hu).



## Kutatói állás



Az MTA-SZBK Biokémiai Intézet *Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoport* **posztdoktor** keres tudományos munkatársi munkakör betöltésére

A 2017 őszén induló Lendület Kutatócsoport célja a mitózist irányító fehérje foszfatázok szerepének molekuláris szintű megismerése. *Ecetmuslica* modellorganizmust használva, a széleskörű genetikai módszerek adta lehetőségek mellett, sejtbiológiai, biokémiai, molekuláris biológiai és proteomikai megközelítésekkel kívánjuk feltárni, hogy a mitotikus kinázok által szabályozott sejtosztódási folyamatokat miként ellensúlyozzák e kevésbé ismert funkciójú enzimek. Célunk a foszfatázok célfehérjéinek azonosítása, valamint a módosítás jelenlétének vagy hiányának biológiai szerepének megértése. Ezért olyan kutatók jelentkezését várjuk, akik szívesen csatlakoznának egy újonnan alakuló, fiatalos kutatócsoporthoz, kalandvágyók és otthonosan mozognak a molekuláris biológia és muslicagenetika területén.

**Helyszín:** MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged

**Kezds:** 2017. október 1.

**Időtartam:** 1 év határozott idejű (3 hónap próbaidő), hosszabbítható 3-5 évre

**A foglalkoztatás jellege:** Teljes munkaidős, heti 40 óra

**Feladatok:** Kutatómunka, témavezetés, közleményírás és pályázatírás

**Követelmény:** szakirányú végzettség (biológia, biológus, genetikus, orvos, stb.), élettudományok területén szerzett PhD fokozat, jó kommunikációs- és alkalmazkodó képesség, megbízhatóság, csapatszellem, angol nyelvtudás

**Előnyt jelent:** szakmai tapasztalat molekuláris biológiai és muslicagenetikai laboratóriumban, bioinformatikai és proteomikai ismeretek

**Amit mi adunk:** izgalmas kihívások, fiatalos és barátságos légkör, felújított laborok, state-of-the-art műszerek és technikák

**Benyújtandó:** PhD oklevél másolata, részletes szakmai önéletrajz publikációs listával, 1 oldalas **angol** nyelven írt motivációs levél és legalább egy ajánlólevél

**Jelentkezés:** [lipinszki.zoltan@brc.mta.hu](mailto:lipinszki.zoltan@brc.mta.hu)

**Infó:** 06-62-599-664 vagy emailben

**Határidő:** 2017. augusztus 10.





## Laborasszisztensi állás



Az MTA-SZBK Biokémiai Intézet *Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoport* **laborasszisztentst** keres szakmai szolgáltató munkakör betöltésére

A 2017 őszén induló Lendület Kutatócsoport célja a sejtosztódást irányító fehérje foszfatázok szerepének molekuláris szintű megismerése. *Ecetmuslica* modellorganizmust használva, a széleskörű genetikai módszerek adta lehetőségek mellett, sejtbiológiai, biokémiai, molekuláris biológiai és proteomikai megközelítésekkel kívánjuk feltárni, hogy a mitotikus kinázok által szabályozott sejtosztódási folyamatokat miként ellensúlyozzák e kevésbé ismert funkciójú enzimek. Olyanok jelentkezését várjuk, akik szívesen csatlakoznának egy újonnan alakuló, fiatalos kutatócsoporthoz, és otthonosan mozognak molekuláris biológia- és genetika laboratóriumokban.

**Helyszín:** MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged

**Kezds:** 2017. október 1.

**Időtartam:** 1 év határozott idejű (3 hónap próbaidő), hosszabbítható 3-5 évre

**A foglalkoztatás jellege:** Teljes munkaidős, heti 40 óra (vagy megbeszélés szerint rész munkaidős)

**Feladatok:** *Muslica* törzsek fenntartása, laborasszisztensi feladatok elvégzése a molekuláris-, genetikai- és szövettani laboratóriumokban

**Követelmény:** közép- vagy felsőfokú szakképesítés, szakirányú végzettség (lehetőleg biológia, laboratóriumi technikus vagy operátor), szakmai tapasztalat élettudományi laboratóriumban

**Előnyt jelent:** több éves szakmai tapasztalat molekuláris biológiai és muslicagenetikai laboratóriumban, angol nyelvtudás, jó kommunikációs képesség

**Benyújtandó:** *szakmai végzettséget igazoló oklevelek másolata, szakmai önéletrajz módszertani tapasztalatok részletezésével, korábbi munkahelyek feltüntetésével*

**Jelentkezés:** [lipinszki.zoltan@brc.mta.hu](mailto:lipinszki.zoltan@brc.mta.hu)

**Infó:** 06-62-599-664 vagy emailben

**Határidő:** 2017. augusztus 1.