

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület
tájékoztatója

Quarterly Review of the
Hungarian Biochemical Society

Szerkesztő bizottság : Alkonyi István, Bagdy Dániel, Bánfalvi
Gáspár, Elődi Pál, Falus András, Fésüs
László, Gergely Pál, Hudecz Ferenc,
Nyeste László és Sarkadi Balázs

Felelős szerkesztő : Bagdy Dániel
Technikai szerkesztő : Bölöni Erzsébet

A tartalomból : Az opioid receptorok szerkezete
Korszerű módszerek a biomedicinális kutatásban :
egy oktatási program. TEMPUS Joint European
Project (JEP) 2113 (1991-1994)
Intramembrán sókötések szerepe a transzport-
fehérjék működésében
Neuroprotekción - nemzetközi szimpózium
Kiroptikai mérések
Hírek és események

Contents Structure of the opioid receptors
Modern Techniques in Biomedical Sciences
TEMPUS Summer School 1994, Budapest, May 30-
June 4
Peptides in molecular recognition :
synthetic and conformational aspects
Biological Nuclear Magnetic Resonance
Spectroscopy: Applications to the study
of peptides and proteins
Mechanism and regulation of lysosomal
protein degradation
Biochemistry of Molecular Chaperons
The role of intramembrane salt-bindings in the
function of transport proteins
Neuroprotection - an International Symposium
News and events

E számunk szerzői:

Benyhe Sándor MTA SzBK Biokémiai intézet, Hudecz Ferenc MTA
Peptidkémiai kutatócsoport, Ernest Giralt Univ.of Barcelona,
Saul J.B.Tendler Univ.of Nottingham, Réz Gábor ELTE Dept.General
Zoology, Csermely Péter. Gergely Péter, Nardai Gábor, Schneider Tamás, Ső-
ti Csaba, Szántó Ildikó és Somogyi János SOTE I.sz.Kémiai-Biokémiai Intézet,
Sahin Tóth Miklós The Scripp Res.Inst.La Jolla,CA, Tarnawa István
Gyógyszerkutató Intézet, Gergely András és Horváth Péter SOTE Gyógyszerészi
Kémiai Intézet.

Az opioid receptorok szerkezete

Az opioid receptorok az opiát-érzékeny neuronok felszínén lokalizált integráns membránfehérjék [1-4]. Funkciójuk kettős: felismerő és jelátviteli. A felismerésen opiát hatású molekulák (pl. morfin) megkötését értjük, a jelátvitel pedig mindazon biokémiai változások összességét jelenti, ami az elsődleges szignál (opioid agonista) hatására celluláris szinten bekövetkezik. Az opioid receptorok számos sejten belüli (biokémiai) és az organizmus egészére jellemző (fiziológiai) folyamatban vesznek részt, utóbbiak közül a fájdalominger küszöbének jelentős emelése (analgézia) a legismertebb. Az opioid receptorok heterogének, a három fő típus (μ , δ , κ) mellett receptor altípusokat μ_1 , μ_2 , κ_1 , κ_2 stb. is leírtak [5, 6]. A receptorok heterogenitására biokémiai (elsősorban ligand kötési), anatómiai és farmakológiai adatok utaltak. A különféle μ -receptorokhoz például eltérő fiziológiai aktivitást rendelnek: így a μ_1 a fájdalomcsillapítás közvetítője, a μ_2 altípus a morfin származékoknak a légzést centrálisan gátló hatásaiért felelős. A κ receptor altípusai számottevő faji és regionális eloszlásbeli [7] különbségeket mutattak, emellett eltérő neuroendokrin hatásokat közvetítettek [8]. A κ_1 és κ_2 receptor izoformák a ligandkötő helyek sztereoselektivitásában is markánsan különböztek [9]. Az opioid receptorok multiplicitásának háttere azonban mindezidáig ismeretlen volt. Most, amikor molekuláris biológiai módszerekkel felderítették az opioid receptor fő típusainak elsődleges szerkezetét, az altípusok elkülönítése is elérhető közelségbe került.

Az elkövetkező néhány oldalon az opioid receptorok molekuláris szerkezetét kívánom bemutatni. A receptor típusok cDNS szekvencia analízisével nyert adatokat összevetem a biokémia hagyományos módszereivel feltárt megfigyelésekkel. A kérdéskör előzményeihez és korábbi irodalmához Wollemann Mária összefoglalója (BIOKÉMIA 1989/4.) nyújt további hasznos információkat.

A receptor klónozása

Annak ellenére, hogy az opioid receptor típusokat rendre homogenitásig tisztították [10-12], és többféle anti-receptor antitestet is kifejlesztettek [13-15], a szerkezetfelderítés viszonylag sokáig sikertelen maradt. Az opioid receptor alacsony szöveti koncentrációja (agyszövetben < 1 pmol/mg fehérje) és nagy érzékenysége nem tette lehetővé még részleges aminosav-sorrend kémiai meghatározását sem. Így nem készítettek olyan 'best guess' oligonukleotidokat sem, amelyeket hibridizációs próbaként használhattak volna genomiális vagy cDNS könyvtárak átvizsgálása során. A *Xenopus laevis* oocita transzlációs rendszert sem alkalmazhatták opioid receptorok expresszáltatására, mivel ismert volt, hogy a béka petesejtek felszínén opioid kötőhelyek találhatóak [16].

Az "áttörést" két sikeres receptor klónozás jelentette, amelyekről a beszámolók 1992. végén jelentek meg [17, 18]. A cDNS klóntárakat NG108-15 szövetkultúrából* izolálták: ez a rendszer az opioid δ -receptorokat expresszálja, és a biokémiai munkák során (tisztítás, affinitásjelölés), mint viszonylag homogén receptor forrás vált be. A frakcionált cDNS-sel majomvese eredetű COS-7 szövetkultúrát transzfektáltak. A receptor kifejeződését ligand autoradiográfiával, illetve 'poolwise' ligand kötés módszerével követték. Utólagos megfigyelések alapján a klónozás sikerét elsősorban annak tulajdonították, hogy az NG108-15 sejtekben a δ -opioid receptor mRNS-ek mennyisége mintegy százszorosa az agyban expresszált hasonló RNS-ekének [19]. A további klónozási munkák a δ -receptor szekvencia ismeretéből indultak ki és változatos módszerekkel (PCR amplifikáció, 'low stringency' hibridizáció, stb.) értek el eredményeket.

* egér neuroblasztóma x patkány glióma hibrid sejtvonal

G-proteinekhez kötődő membránreceptor család: a közös ismérv
hét hidrofób transzmembrán domén

Jelen összefoglaló írása idején már húsznál több, függetlenül izolált, opioid receptort kódoló szekvencia állt rendelkezésre. A cDNS könyvtárak NG108-15 sejtvonalból [17, 18], patkány- [20-30], egér- [31], tengeri malac [32] agyból, valamint humán mintákból [33, 34] készültek (I. táblázat). Az aminosavsorrendek ismeretében az opioid receptorokat egyértelműen a G-proteinekhez kapcsolt membránreceptorok családjába sorolhatjuk (1. ábra). Jelenleg több száz, ebbe a csoportba tartozó receptor elsődleges szerkezete ismert: a klasszikus neurotranszmitter-receptorok közül az α - és a β -adrenerg-, a muszkarinos kolinerg-receptorokat, a dopamin- és hisztamin-receptorokat, valamint számos neuropeptid receptorát (P anyag, neuromedin K, angiotenzin, endothelin stb.) sorolják ide. Ezekben a fehérjékben a hidrofób aminosavak a teljes szekvencia hét elkülönült régiójában koncentrálnak. Ezt a hét erősen lipofil szakaszt a sejtmembrán lipid kettősrétegét harántoló doméneknek ún. transzmembrán szegmentumoknak ('membrane spanning region') nevezik (2. ábra). A G-fehérjékhez kapcsolt receptorok családjá egyébként az összes ismert receptor féleség mintegy 80 %-át öleli fel.

I. Táblázat
Az opioid receptorok ezidáig izolált cDNS klónjai

Klón	Adatbanki azonosító	Szöveti forrás	Receptor típus	Irodalom
K-56	L 06322	NG108-15 sejtvonal	δ	Kieffer et al. [17]
DOR-1	L 07271	NG108-15 sejtvonal	δ	Evans et al. [18]
MOR-1	L 13069	patkány agy	μ	Chen et al. [20]
mORK1	L 11064	egér agy	κ	Yasuda et al. [31]
mORD1	L 11065	egér agy	δ	Yasuda et al. [31]
ROR-A	D 16378	patkány nagyagy	δ	Fukuda et al. [21]
ROR-B	D 16349	patkány nagyagy	μ	Fukuda et al. [21]
pKOPR2	–	patkány talamusz	κ	Minami et al. [22]
ROR-D	D 16534	patkány nagyagy	κ	Nishi et al. [23]
MUOR1	L 20684	patkány agy	μ	Wang et al. [24]
KOR-1	L 22001	patkány agy	κ	Chen et al. [26]
RKOR-1	L 22536	patkány striátum	κ	Li et al. [25]
rK1OR	U 00442	patkány striátum	κ	Meng et al. [28]
pRMuR-12	L 22445	patkány striátum	μ	Thompson et al. [27]
h μ OR1	L 25119	emberi agykéreg	μ	Wang et al. [33]
OP 48	–	patkány agy	μ	Zastawny et al. [29]
ROR-C	D 16438	patkány nagyagy	?	Fukuda et al. [57]
gpK ₁ OR	U 04092	tengeri malac agy	κ	Xie et al. [32]
rDOR 1	U 00475	patkány szaglógumó	δ	Abood et al. [30]
hDOR	U 07882	humán striátum	δ	Knapp et al. [34]
ORL 1	–	emberi agytörzs	?	Mollereau et al. [58]

? kérdéses típusú 'orphan' receptor

Az aminosav összetétel alapján számított méretük szerint az opioid receptorok a "kisebkek" közé tartoznak: a μ -receptor 398, a δ -receptor 372, a κ -receptor 380 aminosavból épül fel. A fehérje családon belül a 324 aminosavból álló *mas*-onkogén, illetve a 744 aminosavat

Opioid receptor fehérjék aminosav-sorrendjei

ROR-A	δ	MEPV-----PSARAEIQFSLLANVSDTFPSA-----FPSASANASGSPG-----ARSA-SSLALALAIATAIYALSIVCAVGL	TM-1
ROR-B	μ	MDSS-----TGP-GNTSDCSDPLAQASCSPAPGSLWNLNLSHVDGNQSDPCGLNRTGLGGNDSLCPQTGS-PSMVTAITIMALYSIVCVVGL	
ROR-D	κ	MESPIQIFRGEPTCAPSACLLPNSSSWFPN-----WAEDSDNSGSGVEDQQ-----LEPAHISPAIPVITAVYSVVFFVVG	

TM-2

δ	LGNVLMFGIVRYT [*] KLKKTATNIYI FNLALADALATSTL [*] PFQSAKYLMETW [*] PFGELLCKAVLSIDY [*] NMFTSIF [*] TLTMSVDRYIAVCH [*] PVKALDFRTPAK
μ	FGN [*] FLVMYIVRYT [*] KMKTATNIYI FNLALADALATSTL [*] PFQSVNYLMGTW [*] PFGLILCKIVISIDY [*] NMFTSIF [*] TLCTMSVDRYIAVCH [*] PVKALDFRTPRN
κ	VGN [*] SLVMEVIRY [*] T [*] KMKTATNIYI FNLALADALVTT [*] TM [*] PFQSAVYLLN [*] SWPFGDV [*] LCKIVISIDY [*] NMFTSIF [*] TLTMSVDRYIAVCH [*] PVKALDFRTPLK

TM-3

TM-4

δ	AKL [*] INICIVWLASGVPI [*] MVAVTQ [*] PRDGA--VV [*] CTLQ [*] FPSPW--Y [*] WDTV [*] TKICV [*] FLFAFV [*] PI [*] LIITV [*] CYGLMLLR [*] LSVRL [*] LSGSKEKDRSLRRITR
μ	AKI [*] VNCWILSSAIGL [*] PV [*] MFA [*] TKYRQGS--ID [*] CTL [*] FSHPTW--Y [*] WENLLKICV [*] FI [*] FAFIM [*] PI [*] LIITV [*] CYGLMLLR [*] LKSV [*] RMLSGSKEKDRNLRITR
κ	AKI [*] INICIVLWLVSSVIGSAI [*] VLGGT [*] KVREDV [*] DVIECSLQ [*] FPDD [*] EYSWWD [*] LFM [*] KICV [*] FVFAFV [*] IPV [*] LI [*] IIVCY [*] TLMLLR [*] LKSVRL [*] LSGSREKDRNLRITK

TM-5

TM-6

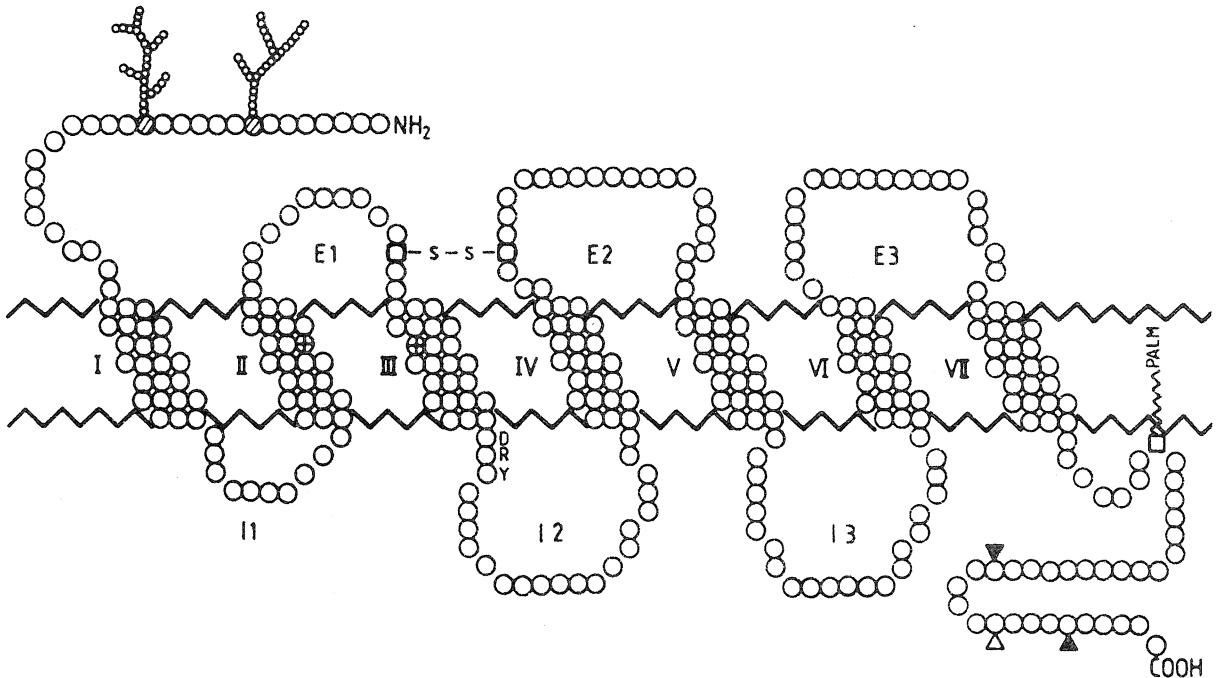
δ	MVLVVGA [*] FVVCWAPIHIFVIVVTLVDINRRDPLV [*] AAHL [*] LCIALGYANSSL [*] NPVLYAF [*] LDFKRCFRQLCRAPCGGQ [*] EPGSLRRPRQ [*] ATARERV-TAC
μ	MVLVVAV [*] FIVCWTPIHIV [*] IIKALIT [*] IPET-TFQ [*] T [*] VSWHF [*] CIALGYT [*] N [*] SCLN [*] PVLYAF [*] LDFKRCFR [*] EF [*] CIPT [*] S [*] TIEQQ [*] N [*] STRV [*] RQNT-REHPSTAN
κ	LVLVVAV [*] FII [*] ICWTPIHIFIL [*] VEALG [*] STSHS-TAV [*] LSSYF [*] FCIALGYT [*] NSSL [*] NPVLYAF [*] LDFKRCFRDF [*] CFPI-----KMRMERQ [*] STNRV [*] RN-TVQ

δ	TPSDGPGGGAAA
μ	TVDRTNHQLENLEAETAPLP
κ	DPASMRDVGGMKNKPV

A transzmembrán régiókat (TM-1-7) aláhúzás, a mindhárom fehérjében közös aminosavakat * jelöli. A homológia optimalizálása során hézagok (-) beiktatása volt szükséges. A szekvencia az egybetűs aminosav-kódok alapján íródott.

tartalmazó TSH (thyroid stimulating hormone) receptor jelenti az ismert mérethatárokat. A hidrofób aminosav oldalláncok dominanciája az opioid receptor molekulák egészét erősen hidrofóbbá teszi. A fehérje hidrofób jellegét a receptor tisztítása során is ki lehetett használni: a béka agyból szolubilizált opioid receptorokat fenil-szefaróz, vagy oktil-szefaróz kromatográfiával eredményesen tisztítottuk [35].

2. ábra
Az opioid receptor "átlagos" szerkezete



Az ábrán a hidrofób régióival az egységmembrán síkjába "merül" receptor fehérje kétdimenziós, sematikus ábrázolása látható. Az egyes aminosavakat \circ -ök, a szénhidrát láncokat $\circ\circ\circ\circ$ jelek szimbolizálják. Palm = ciszteinhez kapcsolt palmitinsav; $\nabla \nabla$ = protein kinázok felismerő helyei; \oplus = a ligandkötésben szerepet játszó aszparaginsav oldalláncok; \square = cisztein oldalláncok; A transzmembrán régiókat római számok (I - VII) jelölik. Az extracelluláris hurkok az E1 - E3, az intracelluláris (citoplazmatikus) hurkok az I1 - I3 jelölést kapták.

A 2. ábrán az opioid receptorok idealizált szerkezeti sémája látható. A modell szerint a fehérje N terminális régiója az extracelluláris tér felé tekint, míg a C terminális a citoplazma irányába orientálódik. A helikális szerkezetű intramembrán szegmentumok (TM1-7) a plazmamembrán síkját többé-kevésbé merőlegesen harántolják. A szerkezetet hidrofób kölcsönhatások stabilizálják. A transzmembrán domének térbeli elhelyezkedése és a fehérje natív térszerkezete jelenleg nem ismert. Feltételezik viszont, hogy a hét hidrofób α -helix egy hengerpalást mentén elhelyezkedve ún. ligandkötő zsebet alakít ki, tehát a kötődés viszonylag mélyen, a membránstruktúra belsejében valósul meg. A μ -receptor, és egy μ -opioid ligand, a fenilpiperidin származékok közé tartozó lofentanil energia-minimumait, valamint a rodopszin molekula röntgensugár-diffrakció alapján megállapított, a G fehérje-receptorok struktúrájában is iránymutatónak tartott szerkezetét alapul véve modellezték a μ -receptor ligandkötő helyét [19]. Azt találták, hogy a lofentanil megkötésében az Asp¹⁴⁷, Asn¹⁵⁰ (TM3), valamint a Thr²⁹⁴ és a His²⁹⁷ (TM6) aminosavak vesznek részt.

Homológia viszonyok

A faji eltérések részletes vizsgálatát egyelőre korlátozza a viszonylag kevés adat. Teljes adatsor csak a patkány μ -, κ - és δ -receptorra van, ismert továbbá az egér κ - és δ -receptor [31], a tengeri malac κ -receptor [32], valamint a humán μ - [33] és δ -receptorok [34] elsődleges szerkezete. Az egér és patkány eredetű hibrid sejtvonalból klónozott δ -receptor keresztezési és hibridizációs kísérletek alapján egyébként egér-eredetűnek bizonyult [36]. Egérben és patkányban az opioid receptorok megfelelő formái csak néhány aminosavban, tehát a pontmutációk szintjén térnek el egymástól. Ennek megfelelően a δ receptor 7, a κ receptor mindössze 4 aminosavban különbözik a két állatfajban. Az egyes receptor típusok között az aminosav hasonlóság ('similarity') mintegy 70 %, a szoros homológia ('identity') kb. 60 %-os (II. táblázat). Viszonylag nagy homológia jellemzi az intramembrán szakaszokat, különösen a TM1, TM2 és a TM7 szegmentumokat. Az intracelluláris hurkok (I1-I3 'loop') konzerválódása is szembevetendő, így pl. az I2 szakaszban a homológia 90 % felett van. Az N terminális szakasz, a harmadik extracelluláris hurok (E3), valamint – egy rövid konzervatív szerkezetű szakaszt leszámítva – a receptorok C terminálisa jelentős különbségeket mutat (1. ábra). A tengeri malac κ -receptora 90 %-ban azonos a patkány és az egér κ -receptorral és minden valószínűség szerint a κ_1 -altípust reprezentálja. Aminosav szinten az emberi μ -receptor 95 %-ban identikus a patkány megfelelő receptorával. Az emberi δ -opioid receptor elsődleges szerkezete 93 %-ban egyezik úgy a patkány, mint az egér δ -receptorok aminosavsorrendjével.

A nem opioid receptorok közül a tachikinin- és a szomatosztatin (~ 45 %) receptorokkal [37] találták a legnagyobb szekvencia homológiákat. Egy, humán placenta eredetű, κ -opioid receptor cDNS-nek vélt szekvenciáról később azt állapították meg, hogy nem opioid receptor fehérjét, hanem egy 440 aminosav hosszúságú neurokinin típusú receptort kódol [38]. A szomatosztatin receptorokkal való rokonság viszont olyan mértékű, hogy eredendően szomatosztatin receptor cDNS-eknek tartott 'orphan' klónok bizonyultak a későbbiek során opioid receptorokat kódoló szekvenciáknak [31]. A G fehérjékhez kapcsolt receptorok családján belül egyre csökkenő mértékű homológiát találtak az angiotenzin II, az interleukin 8 és a muszkarinos kolinerg (< 25 %) receptorokkal. Érdekes, hogy a szintén pszichoaktív, és kábítószerként is ismert kannabisz vegyületek (marijuana) receptora [39] aminosav szinten csak 15 %-ban egyezik meg a μ -opioid (morfin) receptorral.

II. Táblázat

Egér és patkány agyi opioid receptor típusok homológia viszonyai

	Egér μ *	Egér δ	Egér κ	Patkány μ	Patkány δ	Patkány κ
Egér μ	-	-	-	-	-	-
Egér δ	-	100	-	-	-	-
Egér κ	-	61	100	-	-	-
Patkány μ	-	64	61	100	-	-
Patkány δ	-	97	63	61	100	-
Patkány κ	-	59	99	58	59	100

A táblázat adatainak többsége a forrás-közleményekből származik és aminosav szintű homológiát jelent. A hiányzó megfeleltetéseket a MicroGenie program alapján magunk számítottuk. A feltüntetett értékek az identikus aminosavak alapján számított homológiát tükrözik, és %-ban értendők. * Az egér μ -receptor szerkezete még nem ismert.

A szekvenciákból levonható egyéb következtetések

Valamennyi eddig megismert opioid receptorban fellelhető néhány aszparagin ('N-linked') glikozilációs hely konszenzus aminosav szekvenciája: Asp-Xxx-Thr/Ser (NXT/S) [40]. A κ - és a δ -receptor két-két, a μ -receptor öt ilyen felismerő helyet tartalmaz (táblázat). A potenciális szénhidrát kapcsolódási helyek jelenléte valószínűsíti az opioid receptorok poszttranszlációs glikozilációját. A natív opioid receptort korábban is glikoproteineknek tartották, mert a szolubilizált fehérje jól kötődött egyes lektinekhez és azt búzacsíra lektin ('wheat germ agglutinin') kromatográfiával eredményesen tisztították is [41]. A glikoziláció eltérő mértéke magyarázhatja a receptorok különböző módon meghatározott molekulatömegének ellentmondásait is. A μ -receptor aminosav összetételéből számított molekulatömege ~ 40 kDa, azonban az érett (glikolizált) fehérje 66 kDa-os [42]. Ennek az egyébként streptavidin-agaróz-biotinilált β -endorfin affinitás-kromatográfiával tisztított receptornak az egyik proteolitikus hasítási termékét kémiaiag szekvenálták és az aminosavsorrend azonosnak bizonyult a klónozott μ -receptor megfelelő szakaszának cDNS-ből visszafordított aminosav-szekvenciájával. Egy másik közlemény pedig a μ -receptorok cukor oldalláncainak méretében talált alapvető faji különbségekről számolt be [43]. Deléciós mutagenézis segítségével azt is kimutatták, hogy a μ -receptor fehérje teljes N terminális régiójának hiánya sem csökkentette a receptor ligandkötő képességét [19]. Úgy tűnik tehát, hogy az oligoszacharidokat tartalmazó extracelluláris domén nem a receptor-ligand kölcsönhatásban, hanem a fehérje immunológiai tulajdonságainak meghatározásában játszik szerepet. Affinitáskromatográfiával tisztított receptorok esetében az elektroforetikus mobilitás alapján meghatározott molekulatömeg 58-65 kDa-nak adódott, míg az aminosav összetétel alapján számított érték "csak" kb. 40 kDa. Az opioid receptor fehérje kovalensen is jelölhető alkalmas radioligandokkal (affinitásjelölés), a radioaktív jel pedig vizualizálható SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően (fluorográfia). Patkány agyi μ -opioid receptorok affinitásjelölése során az 58 kDa molekulatömegű polipeptid mellett egyéb, közöttük $M_r \sim 40$ kDa specifikusan jelölődött polipeptid is kimutatható [44, 45]. A digitoninnal szolubilizált receptor natív molekulatömege (pontosabban a kötési aktivitással még rendelkező protein - lipid - detergens komplex micellák mérete) ennél lényegesen nagyobb lehet [46]. Az egyes receptor típusok natív mérete tapasztalatunk szerint különbözik: béka agyból szolubilizált κ -receptorok fiziko-kémiai módszerekkel szeparálhatók voltak a μ - és a δ -receptortól [47].

Az opioid receptor fehérje intracelluláris régióiban, különösen pedig a 3. citoplazmás hurokban (I3) és a protein karboxi terminálisán olyan Ser és Thr oldalláncok találhatóak, amelyek különféle protein kinázok (cAMP dependens protein kináz, cGMP dependens protein kináz, protein kináz C, stb.) által katalizált fehérje-foszforiláció szubsztrátjai lehetnek [48]. Ezen target helyek száma a forrásközleményekben a használt felismerőhely-kereső számítógépes programok különbözősége miatt változó (III. táblázat). A receptor-foszforiláció fontos szerepet tölthet be a morfin-tolerancia folyamatában is. A viszonylag kis számú kísérleti adat közül Reisine és mtsai. megfigyelését említem, akik megállapították, hogy a COS-1 sejtekben expresszált κ -receptorok deszenzitizálásában a β -adrenerg receptor kináz (BARK) vesz részt [49].

A TM2 és a TM3 transzmembrán szegmentumban konzervált aszparaginsav oldalláncok találhatóak. A katekolamin receptorokban az előbbi az agonista kötés Na^+ ion érzékenységében, utóbbi pedig ionpár képzés révén a ligandok amino csoportjának megkötésében játszik szerepet [50]. Az opioid receptorok TM3 doménjében megőrződött Asp oldallánc a fenti analógia és az előzőek során ismertetett számítógépes szimuláció alapján szerepet játszhat mind az enkefalinok N terminális amino-csoportjának, mind pedig a morfin protonált piperidin nitrogénjének megkötésében is. Az egér agyi δ -opioid receptor TM2 régiójában lokalizált

Asp⁹⁵ oldalláncot aszparaginra (Asn⁹⁵) cserélték ki *in vitro* mutagenézissel [51]. A mutáns receptor már nem rendelkezett δ -agonista szelektivitással, azonban a nem szelektív agonistákat és az összes vizsgált antagonistá ligandot a vad típusú receptorra jellemző affinitással kötötte. Az eredményekből arra lehetett következtetni, hogy az opioid receptor farmakológiai specifitását elsősorban a TM2 régió határozza meg. Az Asp⁹⁵ mutáns ligandkötési mintázata azt is alátámasztotta, hogy a δ -opioid receptor fehérjében, egyéb receptorokhoz hasonlóan, az agonista és antagonistá ligandok felismerő helyei a protein molekula más-más részletében helyezkednek el.

Az extracelluláris hurkokban található konzervatív cisztein oldalláncok a receptor harmadlagos szerkezetének kialakításában lehetnek fontosak. Diszulfid hidak jelenlétére, illetve a ligandkötés szulfhidril-reagens érzékenységre korábbi irodalmi adatok is utaltak [52, 53]. *In vitro* mutagenézis technikával azt is kimutatták, hogy az extracelluláris diszulfid hidak jelenléte vagy hiánya a μ -opioid receptor funkcionális expresszióját is jelentősen befolyásolja [19]. Egy további, a fehérje C terminálisához közeli cisztein oldallánc viszont palmitoiláció révén vehet részt a protein térszerkezetének és integrálódásának stabilizálásában (1. ábra).

Mindhárom opioid receptor típusban megtalálható a TM3 szakaszt követő Asp-Arg-Tyr (DRY) szekvencia, amely számos peptid receptorban közös, funkcionális jelentősége azonban nem ismert. Az opioid receptorok viszonylag rövid, 23 aminosavból álló harmadik citoplazmás hurokja is egyes peptid receptorok felé mutat rokonságot. Ez nem meglepő, hiszen az opioid receptorok *természetes* ligandjai is peptidek. Ugyanez a szakasz a katekolamin-receptorokban lényegesen hosszabb [50]. A 2. és különösen a 3. intracelluláris hurkok minden bizonnyal a receptor és a guanin nukleotid kötő, reguláló fehérjék (G proteinek), így opioid receptorok esetében a G_i és G_o fehérjék kapcsolódásáért felelős domének.

Az opioid receptor mRNS-ek és fehérjék jellegzetes expressziós mintázatot mutatnak a központi idegrendszerben. A lokalizációs vizsgálatokat RNS-blot analízis, *in situ* hibridizáció, RNáz protekciós analízis és immunohisztokémiai módszerekkel végezték. A μ -receptor nagy molekulatömegű mRNS-e (III. táblázat) a talamuszban expresszálódik a legnagyobb mennyiségben. A locus coeruleus neuronjaiban, amelyek μ -opioid receptor aktiválta K⁺ csatornáit az elektrofiziológusok intenzíven tanulmányozzák, szintén sok μ -mRNS íródik át [27]. A δ -receptor mRNS-ek jellegzetesen a striátumban találhatóak, és még gyakoribbak a vér-agy gáton kívül eső területeken, pl. a hipofízisben és a tobozmirigyben [36]. Erre a megfigyelésre támaszkodva a δ -receptornak és az enkefalinoknak alapvető neuroendokrin funkcióit kell hangsúlyoznunk. A δ -receptorok expressziója kifejezett még a csigolyaközi dúcsejtekben ('dorsal root ganglion') és a gerincvelő hátsó szarvába futó primér afferensek szinaptikus végződéseiben. A κ -receptor kisméretű mRNS-e a hipotalamusz paraventriculáris és mediális magvaiban mutatható ki. Az eufória egyik feltételezett központjában, a középagyi ventrális tegmentális areában érdekes módon nem a μ -, hanem a κ -receptor mRNS-ek dominálnak [19], némiképpen kérdésessé téve a μ -opioidoknak az eufóriában, és a κ -opioidoknak a diszfóriában tulajdonított szerepét.

Néhány más olyan fehérjestruktúrát is azonosítottak, amelyek képesek opioid ligandokat kötni. Schofield és munkatársai még 1989-ben közölték az általuk OBCAM-nak nevezett ('opioid binding cell adhesion molecule') polipeptid aminosav sorrendjét [54]. A kiindulási anyag ez esetben marha agyból tisztított μ -receptor volt [10]. A 345 aminosavból álló, 37,9 kDa molekulatömegű fehérje az *immunoglobulin fehérjékkel* (amalgam, mielin asszociált glikoprotein, interleukin receptor) áll rokonságban, ezért a tudományos közvélemény nem fogadta el opioid *receptorként*. Legújabbán egy bakteriális eredetű proteinnek, az envelope Y fehérjének, ami

egyébként az E. coli sejt falának egyik alkotóeleme, opioid ligandkötő képességéről számoltak be [55].

III. Táblázat
Az opioid receptor típusai

	μ -receptor	δ -receptor	κ -receptor
Agonista prototípus	morfin	enkefalinok	dinorfinok
Endogén opioidok affinitási sorrendje	end>din>met>leu*	met=leu>end>din	din>>end>leu=met
Méret	398 aminosav; ~40 kDa	372 aminosav; ~38 kDa	380 aminosav; ~39 kDa
Szerkezet	7 TM régió	7 TM régió	7 TM régió
Glikozilációs helyek száma az N-terminálison	5	2	2
Foszforilációs helyek száma	3-4	4-7	5-7
Génszerkezet	legalább 2 intron	legalább 1 intron	legalább 1 intron
Génlokalisasió	humán 6. kr. q25-ös lókuszt	egér 4. kr. disztális régió; humán 1. kr. p34-es lókuszt	humán 8. kr. q11.2-es lókuszt
Primér transzkriptum	10-22 kb	8-12 kb	5-6 kb

* end = β -endorfin; din = dinorfin A; met = [Met]⁵-enkefalin; leu = [Leu]⁵-enkefalin

Receptor típusok és altípusok

A klónozott receptorok farmakológiai besorolása transzformált sejt vonalak (COS-7 vagy CHO kultúrák) radioligand kötési mintázatának meghatározásán alapult [56]. A típus-specifikus radioligandok segítségével többnyire egyértelműen meghatározható az adott receptor farmakológiai (μ , δ , κ) jellege. Mivel azonban az expressziós rendszerek, a használt radioligandok és a kísérleti körülmények nem azonosak a különböző laboratóriumokban, a klónok precíz farmakológiai besorolása jelenleg is folyamatban van. A μ -, δ - és κ -receptor szekvenciák néhány szekvenálási hibát (vagy allelikus polimorfizmust?) leszámítva azonosnak találtak, és ma még nem tudjuk pontosan, hogy azok mely altípusaival azonosak. Az egér és az emberi δ -receptort δ_2 altípusúnak tekintik azon az alapon, hogy az expresszált fehérje kb. nyolcszor nagyobb affinitással köti a naltribent, mint a benzilidennaltrexont (BNTX) [34, 51]. Ugyancsak a ligand kötési mintázat alapján a patkány [23, 28] és a tengeri malac [32] κ -receptort a κ_1 altípusba sorolták. A μ -receptorok esetében a szerzők csupán egyetlen közleményben foglaltak állást; a patkány agyból klónozott μ -receptort μ_2 altípusúnak vélik [27]. A bizonytalan farmakológiai specifitással rendelkező, de szekvencia-homológiák alapján opioid receptoroknak tartott 'orphan' klónok [57, 58] is biztató altípus-jelöltnek számítanak. Az expresszált receptorok fiziológiai relevanciáját több esetben a receptor közvetített jelátviteli folyamatok tanulmányozása szintjén (pl. adenilcikláz enzimaktivitás, cAMP produkció, celluláris elektrofiziológia) is ellenőrizték [22, 26]. Noha az opioid receptor típusok strukturális különbségei a fentiek alapján tényszerűen kezelendők, az altípusok elsődleges szerkezetében is kifejeződő eltérésekre jelenleg még nem találunk példákat. Valószínűsíthető

azonban, hogy a további klónozási munkák ezt az érdekes kérdést is megnyugtatóan tisztázní fogják.

Az opioid receptorok szerkezetének felderítése a neurokémia egyik meghatározónak tekintett területének (opioid rendszerek kutatása) kiemelkedő teljesítménye volt, és egy húszéves, a kérdéskör sok lényeges eredményét hozó időszakának a betetőzését jelenti [59, 60]. Ugyanakkor azt is látnunk kell, hogy ez a felfedezés számos új lehetőséget teremt a további intenzív munka számára. A receptor működésének megértéséhez és a funkcionális domének térképezéséhez az irányított mutagenézis és a 'protein engineering' technikák vezethetnek el. Sok még a nyitott kérdés az opioid receptorok jelátviteli (szignál transzdukciós) folyamataiban is; nem ismerjük eléggé a receptor – G protein kölcsönhatás molekuláris mechanizmusát sem. A ligandkötő-hely és a receptor térszerkezetének meghatározását számítógépes modellezés, és sikeres kristályosítás esetén röntgendiffrakciós vizsgálatok segíthetik elő. Fontosnak tartom azt is, hogy az izolált klónok expresszálása receptor-deficiens sejtekben lehetővé teszi az adott receptor típus *önmagában való* vizsgálatát, amire az idegszöveti preparátumokban nemigen volt és jelenleg sincs módunk. A heterológ expressziós kísérletek új receptor-ligandok kifejlesztésével, egyben olyan potenciális gyógyszermolekulák tervezésével kecsegtetnek [61], amelyek a drogfüggőség kezelésében válhatnak be, vagy a jelenlegieknél kedvezőbb analgetikumokként vehetik fel a harcot az elviselhetetlen fájdalommal szemben.

Benyhe Sándor
MTA Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézet

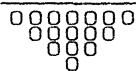
Irodalmi hivatkozások

- 1 Wollemann, M. (1990) Recent developments in the research of opioid receptor subtype molecular characterization. J. NEUROCHEM. **54**: 1095-1101.
- 2 Borsodi, A. (1991) What is the basis of opioid receptor types and the interaction between them? In: Towards a new pharmacotherapy of pain. (Eds.: Basbaum, A.I. and Besson, J.-M., John Wiley & Sons Ltd.) pp. 241-255.
- 3 Simon, E.J. (1991) Opioid receptors and endogenous opioid peptides. MED. RES. REV. **11**: 357-374.
- 4 Pasternak, G.W. (1993) Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. CLIN. NEUROPHARM. **16**: 1-18.
- 5 Pasternak, G.W. (1988) Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. J. AMER. MED. ASSOC. **259**:
- 6 Wollemann, M., Benyhe, S. and Simon, J. (1993) The kappa opioid receptor: evidence for the different subtypes. LIFE SCI. **52**: 599-611.
- 7 Zukin, R.S., Eghbali, M., Olive, D., Unterwald, E.M. and Tempel, A. (1988) Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for κ_1 and κ_2 opioid receptors. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, **85**: 4061-4065.
- 8 Iyengar, S., Kim, H.S. and Wood, P.L. (1986) Effects of kappa opiate agonists on neurochemical and neuroendocrine indices: evidence for kappa receptor subtypes. LIFE SCI. **39**: 637-644.
- 9 Benyhe, S., Szűcs, M., Borsodi, A. and Wollemann, M. (1992) Species differences in the stereoselectivity of kappa opioid binding sites for [³H]U-69593 and [³H]ethylketocyclazocine. LIFE SCI. **51**: 1647-1655.
- 10 Cho, T.M., Hasegawa, J.I., Ge, B.L. and Loh, H.H. (1986) Purification of apparent homogeneity of a μ -type opioid receptor from rat brain. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, **83**: 4138-4142.
- 11 Simon, J., Benyhe, S., Hepp, J., Varga, É., Medzihradzsky, K., Borsodi, A. and Wollemann, M. (1990) Method for isolation of kappa-opioid binding sites by dynorphin affinity chromatography. J. NEUROSCI. RES. **25**: 549-555.
- 12 Gomathi, K.G. and Sharma, S.K. (1993) Purification and reconstitution of the d opioid receptor. FEBS LETTERS, **330**: 146-150.

- 13 Gramsch, C., Schulz, R., Kosin, S. and Herz, A. (1988) Monoclonal anti-idiotypic antibodies to opioid receptors. *J. BIOL. CHEM.* **263**: 5853-5859.
- 14 Roy, S., Zhu, Y.X., Loh, H.H. and Lee, N.M. (1988) A monoclonal antibody that inhibits opioid binding to rat brain membranes. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **154**: 688-693.
- 15 Maderspach, K., Németh, K., Simon, J., Benyhe, S., Szűcs, M. and Wollemann, M. (1991) A monoclonal antibody recognizing κ - but not μ - and δ -opioid receptors. *J. NEUROCHEM.* **56**: 1897-1904.
- 16 Bakalkin, G.Y., Yakovleva, T.V., Nikitina, L.A., Korobov, N.V., Vinogradov, V.A. and Titov, M.I. (1983) Opiate binding sites and endogenous opioids in *Bufo viridis* oocytes. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **117**: 718-724.
- 17 Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. and Hirth, C.G. (1992) The δ -opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **89**: 12048-12052.
- 18 Evans, C.J., Keith Jr., D.E., Morrison, H., Magendzo, K. and Edwards, R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *SCIENCE*, **258**: 1952-1955.
- 19 Uhl, G.R., Childers, S. and Pasternak, G.W. (1994) An opiate-receptor gene family reunion. *TRENDS NEUROSCI.* **17**: 89-93.
- 20 Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A. and Yu, L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *MOL. PHARMACOL.* **44**: 8-12.
- 21 Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M. and Takeshima, H. (1993) Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. *FEBS LETTERS*, **327**: 311-314.
- 22 Minami, M., Toya, T., Katao, Y., Maekawa, K., Nakamura, S., Onogi, T., Kaneko, S. and Satoh, M. (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat κ -opioid receptor. *FEBS LETTERS*, **329**: 291-295.
- 23 Nishi, M., Takeshima, Fukuda, K., Kato, S. and Mori, K. (1993) cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for κ -subtype selective ligands. *FEBS LETTERS*, **330**: 77-80.
- 24 Wang, J.B., Imai, Y., Eppler, C.M., Gregor, P. and Spivak, C.E. (1993) Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**: 10230-10234.
- 25 Li, S., Zhu, J., Chen, C., Chen, Y.W., Deriel, J.K., Ashby, B. and Liu-Chen, L.Y. (1993) Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. *BIOCHEM. J.* **295**: 629-633.
- 26 Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. and Yu, L. (1993) Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *BIOCHEM. J.* **295**: 625-628.
- 27 Thompson, R.C., Mansour, A., Akil, H. and Watson, S.J. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *NEURON*, **11**: 903-913.
- 28 Meng, F., Xie, G.X., Thompson, R.C., Mansour, A., Goldstein, A., Watson, S.J. and Akil, H. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat κ opioid receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**: 9954-9958.
- 29 Zastawny, R.I., George, S.R., Nguyen, T., Cheng, R., Tsatsos, J., Briones-Urbina, R. and O'Dowd, B.F. (1994) Cloning, characterization, and distribution of a μ -opioid receptor in rat brain. *J. NEUROCHEM.* **62**: 2099-2105.
- 30 Abood, M.E., Noel, M.A., Farnsworth, J.S. and Tao, Q. (1994) Molecular cloning and expression of a δ -opioid receptor from rat brain. *J. NEUROSCI. RES.* **37**: 714-719.
- 31 Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T. and Bell, G.I. (1993) Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**: 6736-6740.
- 32 Xie, G.X., Meng, F., Mansour, A., Thompson, R.C., Hoversten, M.T., Goldstein, A., Watson, S.J. and Akil, H. (1994) Primary structure and functional expression of guinea pig κ opioid (dynorphin) receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **91**: 3779-3783.
- 33 Wang, J.B., Johnson, P.S., Persico, A.M., Hawkins, A.L., Griffin, C.A. and Uhl, G.R. (1994) Human μ opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacological characterization and chromosomal assignment. *FEBS LETTERS*, **338**: 217-222.

- 34 Knapp, R.J., Malatynska, E., Fang, L., Li, X., Babin, E., Nguyen, M., Santoro, G., Varga, E., Hruby, V.J., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1994) Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. LIFE SCI. **54**: PL463-PL469.
- 35 Borsodi, A., Khan, A., Simon, J., Benyhe, S., Hepp, J., Wollemann, M. and Medzihradzky, K. (1986) Purification of kappa opioid receptor subtype to homogeneity from frog brain. NIDA Research Monograph Series, **75**: Progress in opioid research (Eds.: Holaday, J. W., Law, P. Y. and Herz, A., NIDA Office of Sciences, Rockville, Maryland) pp. 1-4.
- 36 Bzdega, T., Chin, H., Kim, H., Jung, H.H., Kozak, C.A. and Klee, W.A. (1993) Regional expression and chromosomal localization of the δ opiate receptor gene. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **90**: 9305-9309.
- 37 Yamada, Y., Post, S.R., Wang, K., Tager, H.S., Bell, G.I. and Seino, S. (1992) Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **89**: 251-255.
- 38 Xie, G-X., Miyajima, A. and Goldstein, A. (1992) Expression cloning of cDNA encoding a seven-helix receptor from human placenta with affinity for opioid ligands. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **89**: 4124-4128.
- 39 Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. Bonner, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. NATURE, **346**: 561-564.
- 40 Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. ANN. REV. BIOCHEM. **50**: 555-583.
- 41 Gioannini, T.L., Foucaud, B., Hiller, J.M., Hatten, M.E. and Simon, E.J. (1982) Lectin binding of solubilized opiate receptors: evidence for their glycoprotein nature. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. **105**: 1128-1134.
- 42 Eppler, C.M., Hulmes, J.D., Wang, J.B., Johnson, B., Corbett, M., Luthin, D.R., Uhl, G.R. and Linden, J. (1993) Purification and partial amino acid sequence of a μ opioid receptor from rat brain. J. BIOL. CHEM. **268**: 26447-26451.
- 43 Liu-Chen, L.Y., Chen, C. and Phillips, C.A. (1993) β -[³H]funtrexamine-labeled μ -opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex type, N-linked oligosaccharides. MOL. PHARMACOL. **44**: 749-756.
- 44 Szűcs, M., Belcheva, M., Simon, J., Benyhe, S., Tóth, G., Hepp, J., Wollemann, M. and Medzihradzky, K. (1987) Covalent labeling of opioid receptors with [³H]-D-Ala²-Leu⁵-enkephalin chloromethyl ketone: I. Binding characteristics in rat brain membranes. LIFE SCI. **41**: 177-184.
- 45 Öktem, H.A., Moitra, J., Benyhe, S., Tóth, G., Lajtha, A. and Borsodi, A. (1991) Opioid receptor labeling with the chloromethyl ketone derivative of [³H]Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe-Gly-ol (DAMGO) II: Covalent labeling of mu opioid binding site by [³H]Tyr-D-Ala-Gly-(Me)Phe chloromethyl ketone. LIFE SCI. **48**: 1763-1768.
- 46 Simon, J., Benyhe, S., Borsodi, A. and Wollemann, M. (1986) Hydrodynamic parameters of opioid receptors from frog brain. NEUROPEPTIDES, **7**: 23-26.
- 47 Simon, J., Benyhe, S., Borsodi, A., Szűcs, M. and Wollemann, M. (1985) Separation of kappa-opioid receptor subtype from frog brain. FEBS LETTERS, **183**: 395-397.
- 48 Kemp, B.E. and Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. TRENDS BIOCHEM. **15**: 342-346.
- 49 Reisine, T. and Bell, G.I. (1993) Molecular biology of opioid receptors. TRENDS NEUROSCI. **16**: 506-510.
- 50 Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. ANNU. REV. BIOCHEM. **60**: 653-688.
- 51 Kong, H., Raynor, K., Yasuda, K., Moe, S.T., Portoghese, P.S., Bell, G.I. and Reisine, T. (1993) A single residue, aspartic acid 95, in the δ -opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. J. BIOL. CHEM. **268**: 23055-23058.
- 52 Kamikubo, K., Murase, H., Murayama, M., Matsuda, M. and Miura, K. (1988) Evidence for disulfide bonds in membrane-bound and solubilized opioid receptors. J. NEUROCHEM. **50**: 503-509.

- 53 Zawilska, J., Lajtha, A. and Borsodi, A. (1988) Selective protection of benzomorphan binding sites against inactivation by N-ethylmaleimide. Evidence for κ -opioid receptors in frog brain. *J. NEUROCHEM.* **51**: 736-739.
- 54 Schofield, P. R., McFarland, K. C., Hayflick, J. S., Wilcox, J. N., Cho, T. M., Roy, S., Lee, N. M. Loh, H. H. and Seeburg, P. (1989) Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J.* **8**: 489-495.
- 55 Cabon, F., Morser, J., Parmantier, E., Solly, S.K., Pham-Dinh, D. and Zalc, B. (1993) The *E. coli* EnvY gene encodes a high affinity opioid binding site. *NEUROCHEM. RES.* **18**: 795-800.
- 56 Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I. and Reisine, T. (1993) Pharmacological characterization of the cloned κ -, δ -, and μ -opioid receptors. *MOL. PHARMACOL.* **45**: 330-334.
- 57 Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N., Miyata, T., Houtani, T. and Sugimoto, T. (1994) cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS LETTERS*, **343**: 42-46.
- 58 Mollereau, M.C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butuor, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. and Meunier, J.C. (1994) ORL 1, a novel member of the opioid receptor family. *FEBS LETTERS*, **341**: 33-38.
- 59 Brownstein, M.J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**: 5391-5393.
- 60 Barnard, E.A. (1993) Opioid receptors: Pipe dreams realized. *CURRENT BIOLOGY*, **3**: 211-214.
- 61 Luyten, W.H.M.L. and Leysen, J.E. (1993) Receptor cloning and heterologous expression - towards a new tool for drug discovery. *TRENDS BIOTECH.* **11**: 247-254.



Szerkesztőségi hír

HUDECZ FERENC személyében új tagja van lapunk szerkesztő bizottságának. Okleveles vegyészdiplomát 1977-ben szerzett az ELTE TTK-n. 1980-ban nyerte el az egyetemi doktori címet az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén, a kémiai tudomány kandidátusa 1986-ban (Immunmodulátor hatású elágazó láncú polipeptidek szintézise és szerkezet-hatás összefüggések), a kémiai tudomány doktora 1993-ban (Protein illetve polipeptid tartalmú biokonjugátumok : tervezés és szintézis szerkezet-hatás összefüggések alapján). 1993 óta a MTA Peptidkémiai kutató csoportja tudományos főmunkatársa, majd tudományos tanácsadója. 1978 óta számos külföldi tanulmányúton vett részt európai és tengerentúli államokban, 1986 óta több nemzetközi tudományos konferencia meghívott résztvevője volt. Szakirodalmi és szakmai közéleti tevékenysége egyaránt jelentős. Egyesületünknek 1982 óta tagja, lapunkban nem a mostani az első 'fellelése'.



“Korszerű módszerek a biomedicinális kutatásban: egy oktatási program “

TEMPUS Joint European Project (JEP) 2113

(1991-1994) *

1990-ben ezzel a címmel s nagy várakozással adtuk be pályázatunkat az Európai Közösség TEMPUS irodájához Brüsszelben. Az ELTE TTK Állatszervezettani és Szerves Kémia Tanszékei, valamint az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportja, az angliai University of Nottingham, valamint a spanyol (katalán) Universitat de Barcelona oktatóiból és kutatóiból verbuválódott csapat 1991 szeptemberétől hozzá is kezdhetett a programban ígértek megvalósításához.

Az előzmények

1988 és 90 között dr. László Lajos egyetemi adjunktus (ELTE Állatszervezettani Tanszék), valamint e sorok írója vendégkutatóként működött a Nottingham-i Egyetem két különböző tanszékén. A tanulmányutak időpontjainak véletlen egybeesése, az egyetemi évekből származó ismeretség és a mindkettőnkben felébredő vállalkozó kedv tette lehetővé, hogy a TEMPUS felhívását követően javasoljuk partnereinknek Dr J. Mayer biokémia professzornak (Department of Biochemistry) és Dr. M.R.Price laborvezető kutatónak (Cancer Research Laboratories), hogy nyújtsunk be tervet a közös oktatási programok (Joint European Project) támogatására kiírt pályázatra.

A témaválasztás a közös érdeklődésből szinte magától adódott. A fehérjék molekuláris szintű szerkezet vizsgálatában, a sejten belüli protein funkciók elemzésében szerzett itthoni és angliai tapasztalatok sokfélesége biztosította azt, hogy a legkorszerűbb technikák és megközelítések

* Szerkesztőségünk meghívót kapott a „Modern Techniques in Biomedical Sciences” TEMPUS Summer School 1994, Budapest, May 30-June 4 szervezőitől. Bár személyes részvételünkre - időont egyeztetési akadályok miatt nem kerülhetett sor, az iskola programjának áttekintése alapján időszerűnek és fontosnak tartottam, hogy beszéljünk olvasóinknak erről - az Európai Közösség által 1991 óta támogatott nemzetközi kezdeményezésről.

Az előzmények rövid ismertetése után néhány előadás közreadásával adunk ízelítőt az elhangzottakról. (bd)

átfogó bemutatására képesek lehetünk. Az angliai résztvevők listája tovább bővült, amikor kiderült, hogy a Department of Pharmaceutical Sciences néhány szervezetvizsgáló módszerekkel foglalkozó oktatója, köztük az angliai ügyek későbbi koordinátora Dr Saul J.B. Tendler, is szívesen bekapcsolódna a tervek kidolgozásába. A pályázati feltételek előírása szerint szükség volt egy másik, Közös Piachoz tartozó ország egyetemének bevonására is. Kapóra jött, hogy 1990 őszen Barcelonában, a barcelonai egyetem Szerves Kémiai tanszékének munkatársai rendezték meg a 21. Európai Peptid Szimpoziomot. E konferencián Medzihradzky Kálmán professzor közreműködésével sikerült kapcsolatba lépni az egyik főszervezővel, Dr David Andreu-val, aki szívesen vállalkozott harmadikként pályázótársnak. (Itt jegyzem meg, hogy Dr. Andreu, aki a spanyol ügyek lelkes koordinátora, a nyári iskolák elismert oktatója lett a későbbiekben, közel négy évet töltött a Nobel-díjas Merrifield professzor laboratóriumában. A projekt koordinátora, a pénzügyek felelőse, az itthoni, rákkutatással foglalkozók körében jól ismert, Dr Michael Price pedig az EACR [European Association for Cancer Research] titkáráként működik hosszabb ideje.) Hazatérve Budapestre ezután "már csak" a program véglegesítése, s a nem éppen egyszerű űrlapok kitöltése, a dokumentáció elkészítése maradt hátra. A csapat összeállt, a pályázat elkészült, s - mint a mesében - nyert. Később tudtuk meg, hogy e kategóriában 100 pályázatból 5 került elfogadásra.

A program

A 3 évre tervezett program négy részből tevődik össze: a) magyar hallgatók és doktoranduszok 3-4 hónapos tanulmányútja Barcelonába illetve Nottinghambe, b) magyar oktatók, kutatók 2-3 hetes tapasztalatcseréje a társegyetemeken, c) műszerek beszerzése a hazai résztvevő intézetek számára. d) évente egyhetes nyári iskola megrendezése Budapesten egyetemisták és frissen végzettek számára, barcelonai és nottingham-i oktatók bevonásával..

Az első évben (1991-92) valamivel több mint 100 000 dollárral (8,5 millió forinttal) gazdálkodhattunk. Az összeg felét - előzetesen gondosan megtervezett lista szerint - műszerek beszerzésére használtuk. (Igy kerültek a tanszékekre - többek között - Macintosh számítógépek, nagy teljesítményű centrifuga, HPLC és peptid szintetizátor.) Ebben az évben 3 vegyész hallgató (Bogdán Katalin, Fuxreiter Mónika és Murányi István tölthetett 3-3 hónapot a barcelonai egyetemen és 5 posztgraduális képzésben résztvevő fiatal (Ladányi Andrea, Likó Zsuzsa, Lőw Péter, Papp Edit, Uray Katalin) dolgozhatott 3 vagy 4 hónapot Nottinghamban. A tanulmányutakat mind a vendéglátók, mind pedig a kiutazók hasznosnak, több esetben publikációval is kimutathatóan eredményesnek minősítették. Az oktatók közül hárman látogattak Angliába és ketten tanulmányozták a katalán szerves kémiai képzést.

A nyári iskola 1991 júniusában sikerrel mutatkozott be. Az angol és magyar nyelvű előadások követését - a hallgatók által is színvonalasnak mondott - jegyzet segítette. A hét egy-egy napjának programját egy-egy tanszék állította össze. A délelőtti 2-3 előadást, délután 2 és 5 között gyakorlati foglalkozás egészítette ki. Itt kerültek bemutatásra a frissen beszerzett

műszerek is. A hosszú, sok esetben bizony fárasztó napot "Reserach seminar" zárta, ahol a kutatómunka egy-egy érdekesebb fejezetébe nyerhettek bepillantást a hallgatók. A résztvevők létszámát 30 főben maximáltuk, mert így biztosítható volt a gyakorlatok hatékony lebonyolítása. Az előadások nyilvánossága sok érdeklődőt vonzott, bár a szemináriumok témája alapján nagyobb látogatottságot reméltünk. Mellékletként közlöm a három év egybeszerkesztett programját.

Az első éves beszámolót a brüsszeli TEMPUS központ elfogadta és biztosította a második évre tervezett összeg (közel 100 000 dollár) felhasználását. Műszerre ismét hozzávetőlegesen a pénz felét költöttük (képanalizátor berendezés került az ELTE Állatszervezettani Tanszékre, HPLC alkatrészek, gyors elektroforézis rendszer, valamint diakészítő egység az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportba és az ELTE Szerves Kémiai Tanszékre). Az tanulmányút-program, az első év tapasztalat alapján kissé bővült: a spanyol fél a kedvező benyomások alapján, diákjaink kiváló helytállásának köszönhetően (két angol nyelvű cikk van megjelenés alatt, két TDK dolgozat készült) 3 helyett 4 hallgatót fogadott (Kiss László, Lőrincz Zsolt, Szendeffy Szilárd és Somogyi László IV. éves vegyészhallgatókat). Angliában 1992-93-ban is 5-en tölthettek két-három hónapot (Bősze Szilvia, Farkas Ödön, Füredi Sándor, Nagy Zoltán, Telbisz Ágnes tudományos továbbképzésben résztvevők). Az oktatói kiutazások is sikeresen megvalósultak (hárman Barcelonában, négyen Nottinghamban jártak.)

Az 1993/94-es évben - mintegy 120 000 dollár felhasználásával - került sor műszerek beszerzésére (ELTE Állatszervezettani Tanszék: elektroforézis rendszer, kiegészítők; MTA Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Szerves Kémiai Tanszék: UV spektrofotométer, "Autonom" programcsomag, nyomtató). Ebben az évben - a korábbi évek gyakorlatának megfelelően pályázat alapján - 5-en utaztak Angliába (Pál Viktória V.éves biol.-kém. szakos, Holderith Noémi IV éves biológus, Soós Tibor IV.éves vegyész, Sztán Marianna és Molnár Kinga tudományos továbbképzésben résztvevők) és 4-en Barcelonába (Hudáky Péter, Tikk Ilona, Biacs Mónika IV.éves vegyész és Galántai Rita doktori iskolás). Három oktató látogatott Barcelonába és 5-en Nottinghamba.

Itt jegyzem meg, hogy a Program bizottság előzetes elképzeléseinek megfelelően a három éves periódus alatt ismételt kiutazást nem támogattunk.

Újdonságként ebben az évben az 1993/94-es tanév második szemeszterében intenzív, egyhetes kurzusokat is beindítottunk. Így került sor Dr S.J.B Tendler (Biological application of NMR spectroscopy), Dr D. Andreu (Selected Topics in Peptide Chemistry) és Dr M.R. Price (Chemical Causes and Cures for Cancer) és Dr.F.Doherty (Multiple roles of ubiquitin) előadássorozataira. E tárgyak speciális kollégiumként - akárcsak a nyári iskolá - az indexbe is felvehetők voltak.

A szervezés

A program végrehajtását (tanulmányutak, nyári iskola, beszerzés) a Program bizottság szervezi. Tagjai: Dr. M.R.Price, kontraktor (Cancer Research Laboratories, Nottingham), Dr. S.J.B. Tandler, a brit ügyek felelőse (Dept. Pharmaceutical Sciences, Nottingham), Dr J. Mayer (Dept. Biochemistry, Nottingham), Dr. D. Andreu, a spanyol ügyek felelőse (Dept. Organic Chemistry, Barcelona), Dr. Réz Gábor (Állatszervezettani Tanszék) és Dr Hudecz Ferenc (MTA Peptidkémiai Kutatócsoport/ Szerves Kémiai Tanszék). A pénzügyi év elején és a nyári iskolát követően a bizottság áttekinti a tapasztalatokat, meghatározza a teendőket. Az angol és spanyol egyetemek képviselői felelősek a magyar vendégek szakmai programjáért, a szállás biztosításáért, a pénzügyekért. A beszerzéseket részben a számlakezelő angol fél, részben a magyar résztvevők szervezik. A nyári iskola lebonyolítása (előadások, gyakorlatok megszervezése, hallgatók kiválasztása, jegyzet elkészítése stb.) a bizottság magyar tagjainak feladata. Szerencsére munkájukat az Állatszervezettani Tanszéken Kovács János professzor, a Szerves Kémiai Tanszéken Kucsman Árpád és Hollósi Miklós professzorok, az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban Medzihradszky Kálmán professzor, valamint számos kolléga (Dibó Gábor egy. adjunktus, Majer Zsuzsanna egy. adjunktus és Orosz György tud. munkatárs, Pálfia Zsolt tanszéki mérnök) sokoldalúan segítik.

Utószó (helyett)

A program révén a három év alatt 160 000 ECU (közel 20 millió forint) került felhasználásra beruházásként, 26 magyar diák (81 hónap) és 20 oktató/kutató (43 hét) volt tanulmányúton külföldön, 32 angol (32 hét) és 8 spanyol (8 hét) oktató vendéglátására került sor.

A program 1994 augusztus 31-én befejeződik, de a három év alatt kialakult kapcsolatok tovább élnek, hogy új generációk új együttműködéseinek és új barátságoknak forrása legyen.

Dr Hudecz Ferenc
MTA Peptidkémiai Kutatócsoport
a Programbizottság elnöke

Modern Techniques in Biomedical Sciences
(Programme of Summer School 1991-94)

1st day: Research Group of Peptide Chemistry (Hungarian Acad.Sci.),
Department of Organic Chemistry (ELTE)

Lectures:

Chemical characterisation of the peptide receptors.(Professor K. Medzihradsky)

Application of circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy in the conformational analysis of peptides (Professor M. Hollósi)

Localization of functionally relevant domains in proteins (Dr F. Hudecz)

Sequencing of proteins and peptides (Dr G. Dibó)

Search for the simplest structural units that could describe the 3D structure of proteins
(Dr. A. Perczel)

Practical: Receptor oriented bioassay; Peptide synthesis (Ramps), Protein sequencing, amino acid analysis, Phast gel electrophoresis, capillary electrophoresis, UV spectroscopy, CD spectroscopy

Research Seminar:

Bioconjugate design in cancer research (Dr.F Hudecz)

Alkylating peptide derivatives as potential anticancer agents (Dr H.Süliné-Vargha)

Portioning-mixing synthesis of multicomponent peptide mixtures.(Peptide libraries and sub-libraries.) (Dr F. Sebestyén)

2nd day: Department of Organic Chemistry (University of Barcelona)

Lectures:

Introduction to solid phase peptide synthesis (Dr.D.Andreu)

Principles and applications of solid phase peptide synthesis (Dr D. Andreu)

Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides. Review of some applications.
(Dr A. Grandas)

Convergent solid phase peptide synthesis (Professor E.Giralt)

Peptide - liposome interactions (Dr F. Reig)

Practical: Solid phase peptide synthesis: automated synthesis, RAMPs method, manual synthesis, HF cleavage, gel filtration, HPLC, solid phase nucleotide synthesis*; nucleic acid sequencing*;

* A második évben a nukleotidokkal kapcsolatos gyakorlatok lebonyolításában igen sikeresen közreműködött a gödöllői MBK Biokémiai Osztálya.

Research Seminar: Synthetic approaches to anti-bacterial peptides (Dr. D.Andreu)
 New methods for the chemical synthesis of oligonucleotides and analogues.(Professor E. Pedroso)
 Peptides in molecular recognition : synthetic and conformational aspects (Professor E.Giralt)

3rd day: Department of Pharmaceutical Sciences (University of Nottingham)

Lectures:

NMR spectroscopy (Dr S. Tendler)
 Biological application of NMR spectroscopy (Dr S. Tendler)
 Molecular modelling and computational chemistry (Dr D. Jackson)
 Scanning probe microscopy of biological systems (Dr C.Roberts)
 Molecular modelling and computational graphics (Dr C. De Matteis)

Practical: 2-D NMR techniques and their interpretation; Imaging surfaces with atomic force microscope; Computational modelling in practice.

Research Seminar:

Scanning tunnelling microscopy (Dr S. Tendler)
 New insight into the modelling of bio-active molecules (Dr D. Jackson)
 X-ray photoelectron spectroscopy: a probe for nitrogen geometry (Dr C. De Matteis)

4th day: Cancer Research Laboratories (University of Nottingham)

Lectures:

Monoclonal antibodies as tools in diagnosis and therapy (Dr M.V.Pimm)
 Immune recognition of B and T cell epitopes (Mr G.Denton)
 Immunological measurement of protein antigens and peptide epitopes (Dr.M.R.Price)
 Monoclonal antibodies as tools in diagnostic and therapy of malignant diseases (Dr L. Durrant)
 Preparative immunoaffinity purification (Mr M.Sekowski)
 Structural analysis of monoclonal antibodies (Mr G. Denton)
 Biochemical analysis of tumour associated antigens (Dr M.R. Price)
 Production of recombinant antibody fragments (Mr M. Davies)
 Biochemical analysis of tumour associated antigens (Dr M. R. Price)
 Development of diagnostic assays for breast cancer (Ms A Murray)

Practical: Solid phase immunoassays

Research Seminar:

Polymorphic epithelial mucins (Dr M.R.Price)

Mucins in malignant disease (Dr M.R. Price)

5th day: Department of Biochemistry (University of Nottingham)

Lectures:

Energy dependent ubiquitin-mediated proteolytic pathway. (Dr F.J.Doherty)

Heat-shock proteins in health and disease (Professor R.J.Mayer)

Cell stress genes and their protein products.(Professor R.J. Mayer)

State of the art stereology for quantifying biological structure on slice images. (Professor T.M. Mayhew)

Prions and the transmissible spongiform encephalopathies (Dr J. Arnold)

Practical: Immunolabelling for light and electron microscopy; Immunbiochemical methods; Immuno- and Lectin Cytochemical Methods

Research Seminar:

Neurodegenerative diseases (Professor R.J.Mayer)

Recent developments on the function of ubiquitin in health and diseases (Professor R.J. Mayer)

Ubiquitin, Programmed Cell Death and Neurodegeneration (Professor R. J. Mayer)

104

6th day: Department of General Zoology (ELTE)

Lectures:

Mechanism and regulation of lysosomal protein degradation. (Dr G.Réz)

Disorders of lysosomal functions and proteolysis. (Dr. G. Réz)

The use of isolated cell system in biomedical sciences. (Dr. A.L. Kovács)

Intracellular degradation processes in health and disease (Dr A. L.Kovács)

Biochemistry of molecular chaperons (Dr P. Csermely)

Research Seminar:

Polarized Sorting of Secretory Proteins in Epithelia (Dr. M. Sass)

Practical:

Morphometry and image analysis of electromicroscopic samples; Isolation of subfractions of organellar membranes; Electron microscopic morphometry and image analysis; Methods for isolation and applications of isolated liver cells.

Peptides in molecular recognition: Synthetic and conformational aspects

Prof. Ernest Giralt

*Department of Organic Chemistry
University of Barcelona, Spain*

Introduction

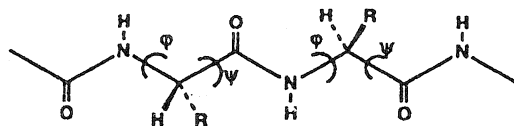
Proteins, play a crucial role in many molecular recognition processes. Over the last few years, thanks to the effort of several research laboratories we have learned something of the mechanisms that regulate these interactions [1]. Peptide molecules have served, and are serving, as model compounds in these kinds of studies. Nevertheless, slowly, as we learn more about the basis of molecular recognition, we are starting to have a certain predictive ability. A reliable predictive capability would open the door to the design and synthesis of peptide molecules which have as an inherent characteristic a certain molecular recognition feature.

As summarized in Scheme I, from a purely "host-guest chemistry" point of view, peptide molecules provide a series of advantageous features that can be exploited for the design of new compounds. Hydrogen bonding has been recognized as one of the most efficient non-covalent interactions and we can use the tendency of the peptide backbone to form intra- and inter-chain hydrogen bonds to mold the global shape of the molecule. Chirality at the α -carbon provides the opportunity of exploring several "configurational versions" of the molecule; because we are using chemical synthesis we are not constrained to use only the homochiral L-amino acid series. We can exploit the wealth of functional groups available at the amino acid side chains to improve, or modulate, the recognition properties of our compounds. We can use our present knowledge of peptide and protein conformational analysis to control, to some extent, the three dimensional structure of our compounds. Finally, but also very importantly, we have at our disposal efficient synthetic methods for the preparation of peptides.

In addition to the already-enumerated possible control elements, we have another possibility for the design of new peptides for molecular recognition studies: disulfide bridge formation between cysteine residues. In this contribution we will focus on this aspect.

Antamanide mimics

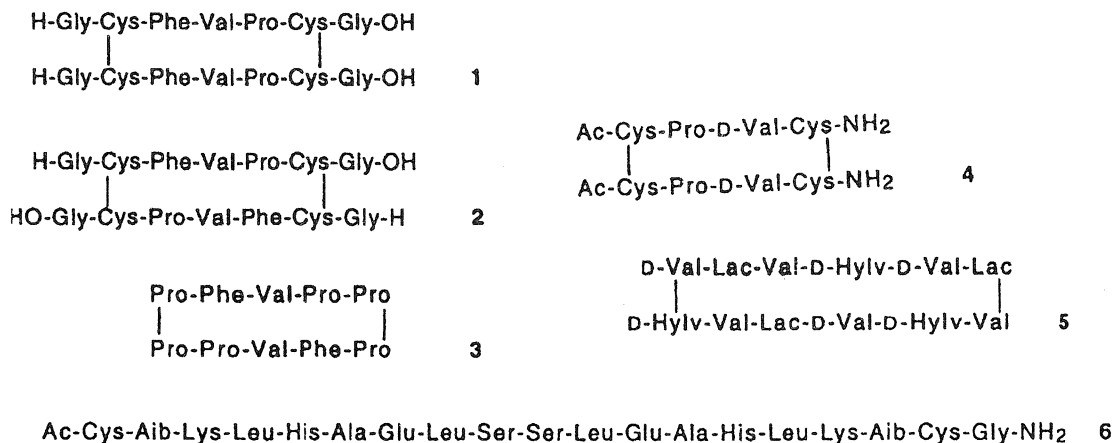
The peptides I am going to discuss in this lecture are not found in Nature. They have been designed, synthesized and studied either in the search of a given molecular recognition ability or, simply, to try to understand some aspects of molecular interactions. First I will cover the synthesis of a new family of peptide molecules with ion-binding properties and then, an explanation of how the synthesis and oxidation studies on peptides with a high tendency to adopt he-



- | |
|---|
| i) Possibility of hydrogen bond formation |
| ii) Stereogenic centers |
| iii) Variety of functional groups (R) |
| iv) Conformational control (φ,ψ) |
| v) Well developed synthetic methods |

Scheme 1.

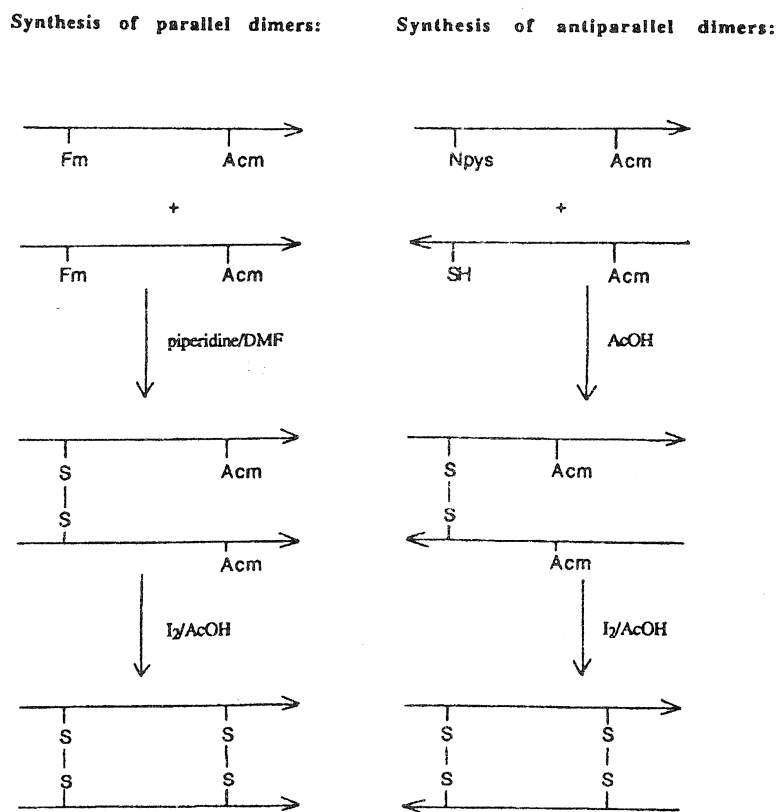
lical structures can help to give some insight into the importance of the helix-macro-dipole in "protein-folding" processes will be given. The common theme running between the two different topics or, to put it in another way, our source of inspiration, is the uteroglobin molecule. Uteroglobin is a protein of 140 amino acids which is able to bind progesterone selectively.[2]. Each uteroglobin molecule is formed by two identical peptide chains, each of 70 amino acids, linked together in an antiparallel way by two disulfide bridges. We have been exploring the possibilities that this type of topology offers for the design of a new family of compounds: uteroglobin-like peptides. Compounds **1** and **2** are the first examples of this family that we have prepared. They have two identical peptide chains linked in a parallel (**1**) or antiparallel (**2**) manner *via* two disulfide bridges. Design of compounds **1** and **2** was guided by the structure of the powerful ion-binding molecule antamanide or, more precisely, by its [Phe⁴-Val⁶] analogue (**3**) [3] a C₂ symmetric compound that retains the ion-binding properties of antamanide. The sequence of the cyclic part of **2** is the same present in **3** with the exception of the four prolines that have been replaced by two cystine residues.



Scheme 2.

The unequivocal synthesis of these type of compounds represent a true challenge in the sense that regioselective procedures for the formation of disulfide bridges are required. Our lab-

oratory has been active in this field [4-8] and our general approach is based on the use of two cysteine protected groups for the synthesis of parallel dimers and three cysteine protecting groups for the synthesis of antiparallel dimers (Scheme 3). In fact, in this last case one of the protecting groups (Npys) is really an activating group, *i.e.* an excellent leaving group that directs the formation of the desired S-S bond if a free thiol is present in the other peptide chain. The free thiol group shown in Scheme 3 comes from a *p*-methylbenzyl protected cysteine after HF cleavage of the peptide-resin bond.



Scheme 3.

In spite of the similarity in sequence between compound **2** and [Phe⁴-Val⁶]-antamanide (**3**), ion-binding studies, carried out using mainly circular dichroism, showed that neither **1** nor **2** exhibited significant ion-binding abilities [9,10]. This prompted us to change our initial approach and to try to exploit in a more precise way the structural changes caused in our dimeric compounds by the introduction of the two disulfide bridges. The result of this approach was compound **4** a molecule inspired by the potent ionophoric depsipeptide valinomycin (**5**) [11].

Mimicking valinomycin

Valinomycin is known to adopt a bracelet-like conformation when complexed with potassium-ion. In this conformation the six carbonyl oxygen atoms from the depsipeptide bonds adopt an octahedral arrangement around the metal ion. In compound **4** we have tried to mimic this bracelet-like conformation by combining two β -turns and two disulfide bridges. Proline is prob-

ably the preferred amino acid at position $i+1$ in β -turns of type II [12] and D-amino acids at position $i+2$ are also known to have a stabilizing effect [13]. Molecular modelling studies on compound **4** showed that the combination of two β -turns centered around the Pro-D-Val sequences plus two disulfide bridges with dihedral χ_{SS} angles of around 190° gives rise to stable conformations with carbonyl groups pointing to the interior of a cavity similar to the one found in valinomycin [14].

Peptide **4** was synthesized following the general approach described above. In this case the protected linear precursor Ac-Cys(Fm)-Pro-D-Val-Cys(Acm)-NH₂ was synthesized on a *p*-methylbenzhydrylamine resin; treatment with 50% piperidine-DMF allowed the formation of the first disulfide bond and subsequent reaction with iodine in 80% acetic-acid-water afforded the target cyclic peptide. Both circular dichroism (CD) and, in some cases, high-field ¹H-NMR showed unequivocally that peptide **4** dissolved in acetonitrile has a strong tendency to complex a variety of metal ions (Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺). A careful analysis of the CD spectra of **4** obtained during titration with barium perchlorate suggests that the binding constant for 4-barium is larger than that reported for K⁺-valinomycin (logK=5.47) [15] or Ca²⁺-antamanide (logK=5.0) [16] in acetonitrile. We believe that compound **4** represents the first example of a promising new family of ion-binding peptides.

Self-assembly of palindromic peptides

The last 'de novo' designed molecule I will discuss in my lecture is compound **6**. Again this molecule contains two cysteine residues that provide the opportunity to assemble two different dimeric versions of compound **6** with parallel or antiparallel topologies. Compound **6** has been designed to study the spontaneous tendency of helical peptides to orient each other in solution in a parallel vs. antiparallel way [17]. Peptide **6** combines several structural features that are known to promote helix formation [18], and we have selected the sequence of **6** to be palindromic in an effort to minimize the differences in side chain packing between the antiparallel and the parallel dimers.

Compound **6**, the disulfide-bridged cyclic monomer and both disulfide-bridged parallel and antiparallel dimers have been synthesized following slight variations of the methodology described in the first parts of this communication. With all the standards at hand, we have studied the spontaneous air-oxidation of **6** in a variety of experimental conditions ranging from 0% to 50% trifluoroethanol and from 20 μ M to 300 μ M peptide concentrations. The observed results can be summarized as follows: i) In all cases the formation of a maximum of three different molecular species is observed. ii) Increasing either trifluoroethanol- or peptide-concentration favours the formation of higher order compounds at the expense of the cyclic monomer. iii) In all the cases the spontaneously formed dimeric species has an antiparallel arrangement of the peptide chains; formation of the parallel dimer has not been detected in any of the experiments performed so far.

Our work with compound **6** illustrates how 'de novo' designed peptides can be used as models for deepening our insight into molecular recognition processes. Although with the sequence used data presented above indicate that the antiparallel orientation of helical peptides is favoured energetically compared to a parallel arrangement, in our opinion much additional work must be performed before trying to establish general principles. A careful study (CD, NMR and molecular dynamics) of both **6**-dimers is now in progress in our laboratory and we believe that the results of this conformational analysis will be of great help in providing an unequivocal interpretation of our spontaneous oxidation experimental data.

CONCLUSION

The results reported herein show how disulfide bridges can be very useful as structural motifs in the design of peptides with molecular recognition capabilities. The geometry around the S-S bond ($\chi_{SS} = 190^\circ$) provides an appropriate balance between preorganization and flexibility. From a synthetic point of view we have at our disposal a variety of procedures for regioespecific disulfide bond formation. Finally, the spontaneous air-oxidation of cysteine-containing peptides combined with unequivocal synthesis of each of the possible reaction products constitutes a very powerful approach towards obtaining a better understanding of the forces that control peptide-peptide recognition processes.

REFERENCES

1. Williams, D.H., Cox, J.P.L., Doig, A.J., Gardner, M., Gerhard, U., Kaye, P.T., Lal, R., Nicholls, I.A., Salter, C.J. and Mitchell, R.C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7020-7030.
2. Morize, I., Surcouf, E., Vaney, M.C., Epelboin, Y., Buehrer, M., Fridlansky, F., Milgrom, E. and Mornon, J.P. (1987) *J. Mol. Biol.* **194**, 725-739.
3. Wieland, T., Dungen, A.V. and Birr, C. (1971) *FEBS Lett.* **14**, 299-300.
4. Ruiz-Gayo, M., Albericio, F., Pedrosa, E. and Giralt, E. (1986) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1501-1502.
5. Ruiz-Gayo, M., Albericio, F., Pons, M., Royo, M., Pedrosa, E., and Giralt, E. (1988) *Tetrahedron Lett.* **31**, 3845-3848.
6. Ruiz-Gayo, M., Albericio, F., Pons, M., Royo, M., Pedrosa, E., and Giralt, E. (1990) *Synthesis* 119-122.
7. Ponsati, B., Ruiz-Gayo, M., Giralt, E., Albericio, F. and Andreu, D. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5345-5347.
8. Ponsati, B., Andreu, D. and Giralt, E. (1990) *Tetrahedron* **24**, 8255-8266.
9. Ruiz-Gayo, M., Royo, M., Fernández, I., Albericio, F., Giralt, E. and Pons, M. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 6319-6328.
10. Pons, M. and Giralt, E. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5049-5050.
11. Ovchinnikov, Yu. A. and Ivanov, V. (1974) *Tetrahedron* **30**, 1871-1890.
12. Zimmerman, S.S., and Scheraga, H.A. (1977) *Biopolymers* **16**, 811-843 (1977).
13. Venkatachalam, C.M. (1968) *Biopolymers* 1425-1436.
14. García-Echeverría, C., Albericio, F., Giralt, E. and Pons, M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11663-11670.
15. Rose, M.C. and Henkens, R.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **372**, 426.
16. Wieland, Th., Faulstich, H., Burgermeister, W., Otting, W., Mohle, W., Shemyakin, M.M., Ovchinnikov, Yu. A., Ivanov, V.T. and Malenkov, G.G. (1970) *FEBS Lett.* **9**, 89
17. Harbury, T., Zhang, T., Kim, P. S. and Alber, T. (1993) *Science* **262**, 1401-1407.
18. Marqusee, R.L. and Baldwin, L.R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7944-7947.

Biological Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Applications to the study of peptides and proteins

Dr. Saul J. B. Tendler

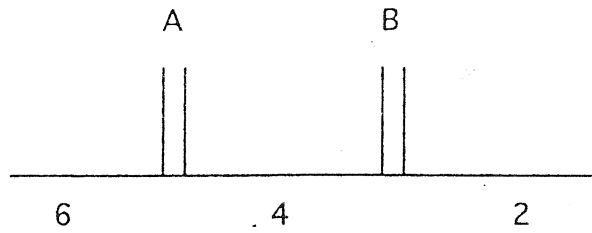
*Department of Pharmaceutical Sciences
The University of Nottingham*

The technique of nuclear magnetic resonance (nmr) spectroscopy can be applied to provide structural and dynamic information on a range of biomolecular systems. This information may include such details as the sequence and folding of a protein as well as any structural interconversions that are occurring on the nmr timescale.

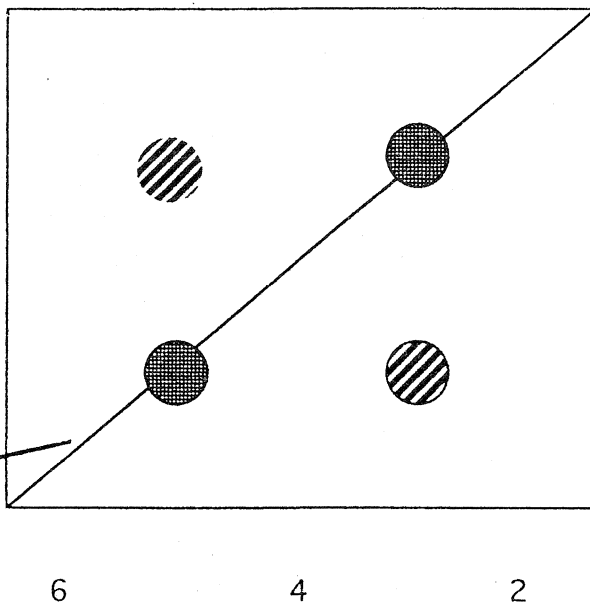
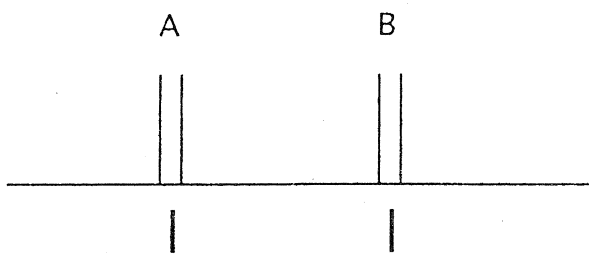
The technique is based upon the fact that nuclei have a property of spin. In the case of hydrogen atoms (as with ^{13}C , ^{31}P and ^{19}F) the nuclear spin quantum number provides two different spin states. When the protons are placed in a magnetic field the fact that they are charged and spinning causes them to generate a magnetic field of their own. Because the proton can spin in two different directions this magnetic field can be directed towards or against the static magnetic field, with the induced field that is aligned with the static field being at a lower energy level. The protons absorb energy at a set frequency, normally in the radio frequency band of the electromagnetic spectrum, causing them to flip from the low energy state to a high energy state. This absorption of energy can be monitored to produce a spectrum. Each signal on a nmr spectrum is due to a proton absorbing radiation. The frequency of the signal, normally called a resonance, is characteristic of the type of proton that it is associated with - aromatic protons resonate at a very different frequency to aliphatic protons. While small molecule spectra are relatively easily interpreted, such data sets become more problematic when a large number of protons are present such as in proteins and peptides.

In order to overcome the large number of overlapping resonances present in proteins two dimensional nmr techniques may be utilized. These experiments are reliant on the fact that a correlation exists between certain protons. These correlations may be due to the protons being within three bonds of one another, as in the COSY (correlation spectroscopy) experiment, or the two protons being closer than 0.5nm in space, as in the NOESY (nuclear Overhauser spectroscopy experiment). The normal appearance of a two dimensional nmr spectrum is a square box with two frequency domains. Along the centre of the box is the so called diagonal, along this line the normal one dimensional nmr spectrum can be found. Off diagonal cross peaks indicate that there is a correlation between the on diagonal sites. In a COSY experiment this correlation indicates that the

two protons are coupled to one another.



One dimensional nmr spectrum



Two dimensional nm spectrum

Frequency 1 (p.p.m.)

6

4

2

Diagonal

Frequency 2 (p.p.m.)

6

4

2



Diagonal Cross Peak



Off Diagonal Peak

These techniques offer a way of assigning the resonances of the individual amino acid residues even where there is considerable degeneracy (*i.e.* overlap of signal) present, this is primarily because each amino acid provides a very characteristic pattern in the COSY experiment.

Once the individual amino acid residues have been assigned the sequence of the residues can be found by looking at the NOESY experiment. Connections are normally found along the backbone of the protein chains alpha and amide protons' providing the sequence of the protein.

The secondary and tertiary structure of macromolecules are found by looking at long range connections that may be present in the NOESY nmr experiment. These patterns of connections show whether such elements of structure as α -helices, β -sheets and β -turns are present.

Using nmr techniques the three dimensional solution structure of proteins up to the size of approximately 15kDa may be obtained.

Further reading

K Wüthrich, NMR of proteins and nucleic acids, Wiley, 1986.

FEBS

First Announcement

**23rd Meeting of the Federation
of European Biochemical Societies
Basel, August 13-18, 1995**

Meeting Secretariat

FEBS'95
Convention Center Basel
Messeplatz 21
CH-4021 Basel
Phone + 41-61-686 28 28
Fax + 41-61-686 21 85

Key Dates

October 1994
Preliminary programme and call for papers.
April 30, 1995
Deadline for the submission of abstracts.

Mechanism and regulation of lysosomal protein degradation

Dr. Gábor Réz

*Department of General Zoology
Eötvös Loránd University*

The lecture is focused on lysosomal degradation of endogenous cellular macromolecules and structures i.e. cellular autophagy, a membrane-governed process in which different quanta of cytoplasmic material are taken up and digested by the lysosomal compartment of the cell. There are at least three different, morphologically defined mechanisms of cellular autophagy.

Microautophagy is thought to be responsible for uptake and degradation of small quanta of the cytosol by invagination of the lysosomal membrane into the interior of lysosomes called multivesicular bodies. Lysosomes are known to be capable of flattening and encapsulating certain portions of the cytoplasm. This mechanism of autophagy is called **lysosomal wrapping**.

Another major mechanism of the process is **macroautophagy** or **autophagocytosis** in which a pair of specific, so called pre-lysosomal membranes (segregating cistern) **segregates** large portions (organelles or organelle fragments) into a pre-lysosome: the autophagosome. The origin of the segregating membrane is disputed. The autophagosome gains lysosomal hydrolases in the second step of the process via **fusion** with enzyme-carrying lysosomes. Once enzymes and their substrates has come together the third step: autolysosomal **degradation** starts.

Inhibitors and enhancers of the different steps of macroautophagy have been successfully used to disclose the regulation of the process. Integrated quantitative morphological and biochemical studies showed that some inhibitors of lysosomal protein degradation cause accumulation of autophagic vacuoles (common term for auto-phagosomes and autolysosomes) in the cells. For instance, inhibitors lysosomal prote-ases such as **leupeptin** will slow down **degradation**. If the rate of **segregation** and **fusi-on** is unchanged, the autolysosomal subcompartment of the autophagic compartment will be expanded. Inhibitors of **fusion** will cause an accumulation of autophagosomes and a regression of autolysosomes provided **segregation** and **degradation** go on.

Microtubule depolymerizing agents (**vinblastine**, colchicine) are widely regarded as fusion-inhibitors. Since their action can be counteracted by taxol, a microtubule-stabilizing agent, the involvement of microtubules in macroautophagy seems obvious.

Finally, **segregation** inhibitors stopping the formation of autophagosomes will cause a regression of the total autophagic compartment, i.e. autophagic vacuoles will disappear from the cells with ongoing **fusion** and **degradation**. Translational inhibitors cycloheximide, emetine and puromycin, amino acid overload, and methylated amino-purines were shown to inhibit segregation.

The so called "**lysosomotropic**" basic molecules (chloroquine, neutral red, methylamine, ammonia) inhibit degradation through lowering intralysosomal pH thereby causing accumulation of undigested material.

It is of interest, that most inhibitors of degradation and microtubular poisons proved to be enhancers of segregation. This observation points to a possible feed-back regulation between the two steps of autophagocytosis.

Some detergents, such as Triton-X 100 were found to stimulate macroautophagy *in vivo*.

The hormonal control of the process seems to be dependent on cell type. In rat liver *in vivo*, glucagon and cAMP proved to be enhancers, whereas insulin was found to inhibit autophagy. In freshly isolated liver cells that have no β -adrenergic receptors, this type of regulation was not present, however. In developing systems, autophagocytosis is a regular step of the **programmed cell death** required for many morphometric events. For instance autophagocytosis during "histolysis" of larval organs in the pupae of holometabolous insects is under the control of 20-OH-ecdysterone as stimulating and juvenile hormone as growth promoting and hence inhibiting regulator. In mammalian and human prostate estrogens are known to be stimulatory to autophagy. Generally, the lack of trophic hormones are stimulatory to autophagy in different cell types. For instance mammary gland cells start autophagic involution in response to post partum lack of lactotropic hormone. According to Pfeifer the work-load is inhibitory, whereas unload is stimulatory to autophagy.

Some lysosomal diseases are characterised by a large amount of stored material in membrane-bound abnormally sized and structured lysosomes. Such **storage diseases** are caused by genetic aberration (deletion or other mutation) in the gene(s) of one or two lysosomal hydrolases. Accordingly, the undigestible substrate will accumulate in the autolysosomes and consequently this sub-compartment will expand.

In most of the storage diseases materials containing glycosidic bonds i.e. glycoproteins, glycolipids and polysaccharides accumulate. This phenomenon can be explained by the fact, that all lysosomal glycosidases are exoglycosidases. Therefore, if, for example, acid- β -galactosidase is missing, sequential cleavages of terminal sugars will be stopped when the process reaches the first galactose in β -glycosidic bond in any poly- or oligosaccharide chains.

Another type of lysosomal defects is **cystinosis** in which cystine crystals accumulate in lysosomes due to impaired membrane transport of this disulfide from lysosomes to the cytosol. Some other lysosome-related diseases are the subjects of an other lecture in this course.

Suggested reading

- [1] Glaumann,H., Ballard,F.J. editors (1987) Lysosomes: their role in protein breakdown. Academic Press,New York-Sydney. pp. 1-737.
- [2] Knecht,E., Grisolia,S. editors (1989) Current trends in the study of intracellular protein degradation. Vols. I. & II. (RBC Cell Biology Reviews Vols. 20 & 21., Springer International, Bilbao,
- [3] Neufeld,E.F. (1991) Lysosomal storage diseases. Annu. Rev. Biochem. 60, 257-
- [4] Réz,G. et al. (1991) Mechanism & dynamics of macroautophagy in murine exocrine pancreatic cells. A review of vinblastine-induced changes. Acta Biol.Hung. 42, 57-
- [5] Seglen,P.O., Bohley,P. (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia, 48, 158-172.

Biochemistry of Molecular Chaperones

Csermely Péter, Gergely Péter, Nardai Gábor, Schnaider Tamás, Söti Csaba, Szántó Ildikó és Somogyi János

SOTE, 1.sz. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest

Egy nemréggi definíció szerint a molekuláris chaperonok olyan fehérjék, amelyek más fehérjék instabil konformerjeihez kötve, azt stabilizálva, megszabják az adott fehérje sorsát a sejten belül. Chaperonok segítenek a fehérjék helyes konformációjának kialakításában, oligomerjeik kialakulásában, a sejten belüli membránokon keresztül megvalósuló fehérjetranszportban, illetve bizonyos fehérjék (pl. fehérje kinázok) inaktív/aktív formájának egymásba való átalakításában [1]. E molekuláris "gardedámok", chaperonok a klasszikus felfogás szerint tehát fehérjékre hatnak. A legutóbbi időkben azonban a chaperonok egy újabb osztálya, az RNS- és DNS-re ható chaperonok fogalma is egyre inkább elfogadást nyer [2]. Ezen utóbbi fehérjékhez sorolható a nukleoplazmin, amely a nukleoszóma összeszerelésében játszik szerepet, a HMG1/2 fehérjék, de a riboszómális RNS kialakításában és transzportjában szerepet játszó nukleolin és numatrin is.

A molekuláris chaperonok közül számos fehérje szintézise változatos környezeti stresszek (pl. hő-sokk, glükóz megvonás) hatására számottevően megemelkedik [1,3-5]. Ezek a hő-sokk fehérjék (hsp-k) és glükóz-regulált fehérjék (grp-k) a károsodott fehérjék "helyreterekerésében" közreműködve egy ősi védekezési mechanizmus, egy "sejten belüli immunrendszer" elemeit alkotják. A hő-sokk fehérjék szelektív indukciójával különböző, betegségek által megtámadott szövetek, szervek gyorsabb regenerációja érhető el [5].

A molekuláris chaperonok mindezen funkcióikat számos enzimaktivitás segítségével tudják betölteni. Ezen összefoglalónkban ezekről a chaperon-asszociált enzimaktivitásokról szeretnénk egy rövid áttekintést adni. A chaperon funkcióról és annak fiziológiai és orvostudományi jelentőségéről számos összefoglalás jelent meg az elmúlt időszakban [1-5]. Az prokarióta és az eukarióta molekuláris chaperonok nagyfokú homológiája és funkcionális azonossága miatt az összefoglalóban jobbra csak az eukarióta fehérjékre térünk ki.

ATP-áz aktivitás

A legtöbb molekuláris chaperon (hsp60 [6], hsp70, grp78 [7], hsp90 [8], stb.) magas affinitású ATP-kötőhellyel rendelkezik. Ezen ATP kötőhelyek más nukleotidok befogadására is képesek. ATP kötés hatására ezen fehérjék számottevő konformációváltozáson mennek át [9,10]. Kötődése után az ATP egy része elhasad, és

1. táblázat
Molekuláris chaperonok mint ATP-ázok

Tulajdonság	hsp60	hsp70 (dnaK)	grp78 (BiP)	hsp90	grp94
k_{cat} (min ⁻¹)	150 [6] ^a	1 [15]	0.03 [37]	0.6-150 [38]	0.08 [39]
k_M ATP-re (mM)	?	0.2 [15]	0.0001 [37]	0.07-0.5 [38]	0.008 [39]
ionfüggés -- Ca	mM [6]	mM [40]	inhib. [37]	mM ^c	mM ^c
-- Mg	mM [6]	mM [40]	0.1 mM [37]	mM [38]	mM [39]
pH optimum	7-9 [6]	8-9 [14]	5-6 [37]	?	4-7 [39]
hőstabilitás	?	95°C [14]	?	60°C ^c	60°C [39]
inhibitor	hsp10 [12]	?	?	?	?
aktivátor	?	DnaJ [1]	?	+ ^c	+ ^c
ADP/ATP exchanger	?	GrpE [1]	?	?	?

^aA zárójelben lévő számok a megfelelő irodalmi hivatkozásokra utalnak.

^b? = nem meghatározott adatok

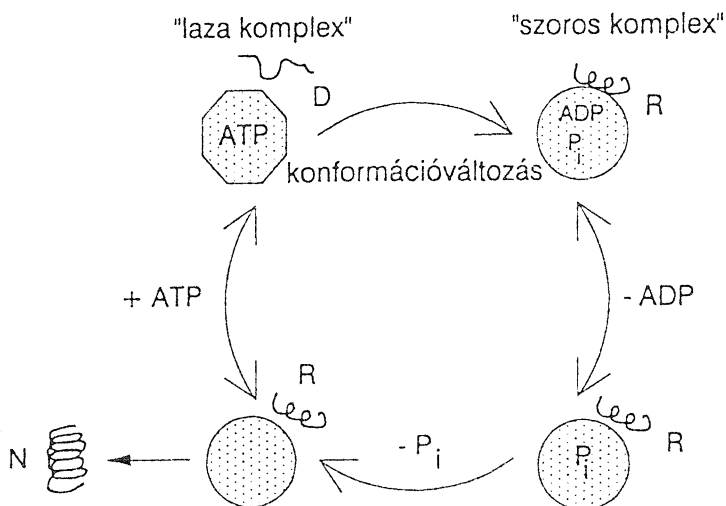
^cNardai G. és Csermely P.; nem közölt megfigyelések

gamma helyzetű foszfátcsoportja vagy vízre (ATP-áz aktivitás), vagy Ser, illetve Thr aminosav oldalláncre (autofoszforiláció) helyeződik át. A molekuláris chaperonok ATP mellett más nukleotidokat, pl. GTP-t is kötnek, illetve hasítanak [8,11].

A különböző molekuláris chaperonok ATP-áz aktivitásával kapcsolatos biokémiai adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. A k_{cat} érték a "klasszikus" ATP-ázokénál jóval kisebb, az enzimreakció extrém hőstabilitást mutat és Ca-ATP jelenlétében is végbemegy. Az ATP hidrolízise számos más fehérjével aktiválható, illetve gátolható. Ezek a fehérjék a GTP-kötő fehérjék aktivátoraihoz hasonlóan vagy az ATP-áz aktivitást, vagy az ADP/ATP kicserélődést befolyásolják. Ezek az analógiák elképzelhetővé teszik, hogy a molekuláris chaperonok is részesei lehetnek bizonyos bonyolultabb, szabályozási-jelátviteli folyamatoknak [11].

Az ATP-áz aktivitást ezen specifikus moderátor-fehérjéken kívül peptidek és nem natív konformációjú, "kitekeredett" fehérjék is aktiválni képesek [1,3-5]. Az ATP hidrolízise és a reakció eredményeként a chaperonhoz kötődő ADP ATP-re cserélődése a chaperon konformációjában ciklikus váltakozásokat indukál. A chaperon ATP-kötő formája a "szubsztrát"-fehérjét (peptidet) alacsony, az ADP-kötő forma magas affinitással köti (1. ábra; [12]).

A chaperonok a szabad hidrofób felszínekkel rendelkező, kitekeredett fehérjéket védik a nem kívánatos aggregációtól. Jelenleg nem teljesen tisztázott, hogy a molekuláris chaperonok a kitekeredett fehérjék natív konformációjukba való "visszatekerését" a térszomszédokhoz hasonló folyamatban aktívan, a natív konformáció felé történő fokozatos eltolással, vagy pedig a háttarráshoz hasonlóan passzívan, a rosszul tekeredett fehérjék kitekerésével és így számukra egy újabb spontán "betekeredési esély" biztosításával segítik [3,12]. Igen valószínű, hogy a fenti két mechanizmus egyaránt előfordul, bizonyos chaperon-fehérje párok esetén az egyik, másoknál a másik domináns. E mechanizmusok pontos felderítése, a bennük szerepet játszó molekuláris történések megismerése a területen dolgozó kutatók izgalmas feladata.



1. ábra: A chaperonok ATP ciklusa. D, denaturált, nem natív konformációjú fehérje; R, részlegesen natív konformációjú fehérje; N, natív fehérje

Fehérje-kináz aktivitás

A chaperonhoz kötődő ATP (GTP, illetve más nukleotid) terminális foszfátja a chaperon szerin, vagy threonin OH csoportjaira is átkerülhet [8, 13-15]. A molekuláris chaperonok más fehérjék foszforilációjában is részt vehetnek. Ezen utóbbi reakció lehetséges mechanizmusaként az autofoszforilált Ser/Thr magas energiájú foszfátja kerül át a szubsztrátfehérjére. E mechanizmust az az újkeletű megfigyelés is valószínűsíti, amely az autofoszforilált hsp60 által feles ADP jelenlétében katalizált ATP szintézist írta le [16].

Különböző molekuláris chaperonok autofoszforilációjának biokémiai jellemzőit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A reakció extrém hőstabilitást mutat, Ca-ATP jelenlétében is végbemegy és az ATP-re mutatott k_M értéke sokkal magasabb, mint a "klasszikus" fehérje kinázoké.

A molekuláris chaperonok (auto)foszforilációja a hőmérséklet emelésével indukálható, és számos chaperon esetén szerepet játszik a chaperonnak a szubsztrátfehérjéről való disszociációjában (hsp60 [17], grp78 [18,19], hsp90 [20], Csermely P., Y. Miyata és I. Yahara, nem közölt adatok). Másfelől viszont a hsp70 homológ dnaK esetén a chaperon autofoszforilációja a szubsztrátfehérjék asszociációját segíti elő [21]. Az autofoszforiláció során keletkező magasenergiájú foszfátcsoport instabilitása meglehetősen nehézé teszi a folyamat *in vivo* előfordulásának és jelentőségének vizsgálatát.

2. táblázat
Molekuláris chaperonok autofoszforylációja

Tulajdonság	hsp70	grp78 (DnaK)	hsp90 (BiP)	grp94
foszforilált aminosav	Thr [15] ^a	Thr [14]	Ser [8]	Ser,Thr [13]
hőstabilitás	100°C [40]	? ^b	75°C [8]	95°C [13]
Ca-függés	mM [40]	uM [14]	mM [8]	uM [13]
k_M ATP-re (mM)	? ^b	0.001 [14]	0.16 [8]	0.24 [13]
pH optimum	6.0 [15]	5.5 [41]	6.5 [13]	7.5 [13]

^aA zárójelben lévő számok a megfelelő irodalmi hivatkozásokra utalnak.
^b? = nem meghatározott adatok

Redox szabályozás

Diszulfidhidak keletkezése részt vesz a legtöbb fehérje natív konformációjának kialakításában, illetve stabilizálásában. Az SH csoportok helyes párosodását a Venetianer és Straub által az elsők között leírt diszulfid izomeráz ("tekeráz") enzim segíti elő [22,23]. Ez az enzim redox chaperon tulajdonsága mellett a fehérjék másod- és harmadlagos szerkezetének kialakulását segítő "valódi" chaperonként is működhet [24]. E feltételezést támasztja alá az is, hogy a diszulfid izomeráz is képes az ATP kötésére és a Ca-ATP jelenlétében végbemenő autofoszforylációra ([25], Schnaider T. és Csermely P., nem közölt adatok).

A mikrokörnyezet redox állapota nagy szerepet játszhat a különböző molekuláris chaperonok aktivitásának szabályozásában. E szabályozási mechanizmus különösen jelentős lehet az endoplazmatikus retikulum, illetve a Golgi apparátus lumenében, ahol a redukált és oxidált glutation arányának változása végigkísérheti a szekretált fehérjék érését [26]. A fentiek mellett a citokróm c is redox chaperon tulajdonságokkal rendelkezik [27] és redukcióját mind a hsp70 fragmentumai, mind pedig a hsp90 elősegíti ([28], Oke, M.S. és Csermely P., nem közölt adatok).

Proteáz aktivitás

A molekuláris chaperonok a fehérjeszerkezet kialakításában, helyrehozásában és a különböző fehérjék sejten belüli elrendezésében játszott szerepük mellett részt vesznek az elaggott, sérült fehérjék eliminációjában is [29]. E folyamat során vagy a károsodott fehérjék proteolízise zajlik le, vagy --abban az esetben ha a lebontandó fehérjék mennyisége meghaladja a sejten belüli fehérjelebontó rendszerek kapacitását-- a molekuláris chaperonok a sérült fehérjékkel zárványokat képeznek [30].

3. táblázat
Molekuláris chaperonok és proteolízis

Molekuláris chaperon	proteáz aktivitás	a chaperon aktivitás részt vesz a sejten belüli fehérjelebontásban
<i>E.Coli</i> La	+ ^a [42] ^b	- ^c
az <i>E.Coli</i> ClpP komplex tagjai	+ [43]	-
dnaK, dnaJ, grpE, groEL		+ [31]
ubiquitin, ubiquitin konjugáló enzimek		+ [29]
hsp27	szekvencia homológia [44]	
hsp47	szekvencia homológia	
	proteáz inhibitorokkal [45]	
hsp70	+ [33]	+ [32]
hsp90	+ [34]	
hsp110	szekvencia homológia [43]	

^a+ = fehérje a megfelelő aktivitással

^bA zárójelben lévő számok a megfelelő irodalmi hivatkozásokra utalnak.

^c- = a chaperon aktivitást még nem mutatták ki

A dnaK/dnaJ/grpE chaperon komplex részt vehet a lebontandó fehérjéknek a prokarióta fehérjelebontó rendszerekhez való eljuttatásában ([31], 3. táblázat). Hasonlóképpen az eukarióta dnaK homológ hsp70 részt vesz a károsodott fehérjék lizozómába történő transzportjában [32]. Egy korábbi megfigyelés szerint a hsp70 autoproteolízisre képes [33], saját adataink pedig a hsp90 Ca-függő proteáz aktivitását támasztják alá [34]. Számos más hő-sokk fehérjét ismerünk, amelyek proteázok, proteáz-komplexek részei, illetve homológ szekvenciát tartalmaznak proteázokkal, vagy proteáz inhibitorokkal (3. táblázat). Mindazonáltal e fehérjék esetén vagy a chaperon funkció, vagy a proteáz aktivitás kísérletes bizonyítékokkal való alátámasztása egyelőre várat magára.

A fentiek alapján eddig a hsp90 az egyetlen olyan fehérje, amelynek a molekuláris chaperon funkciója és a proteolitikus aktivitása egyszerre nyert bizonyítást [34]. A "Janus-arcú" hsp90 e kettős funkciója felveti azt a kérdést, hogy mi alapján különbözteti meg a chaperon a segítő és a lebontandó szubsztrátokat, mi alapján "ítél elevenek és holtak fölött"? A válasz egy része minden bizonnyal a szubsztrát fehérje kitekeredtségének mértékében rejlik. Ha a fehérje csak részben denaturált, csak a harmadlagos szerkezete hiányzik, vagy töredékes (pl. a fehérje az ún. "olvadt gombóc" állapotban van), a hsp90 tényleges chaperonként működhet, megpróbálva a fehérje helyreterelését. Ha a hsp90-nel asszociáló szubsztrát fehérje másodlagos szerkezete is sérül, peptidkötések jelennek meg a fehérje felszínén, ezáltal a peptidkötések a hsp90 proteolitikus aktív helye számára is elérhetővé válnak, a hsp90 proteáz aktivitása kerülhet előtérbe és a súlyosabban sérült fehérje eliminációja valósulhat meg ([34], Schnaider T., Söti Cs. és Csermely P., nem közölt adatok). Másrészt a hsp90-ben a bakteriális *La* proteázhoz való immunológiai hasonlóság mellett [35], proteáz inhibitor szekvenciák is fellelhetőek ([36], Schnaider T., Söti Cs. és Csermely P., nem közölt adatok), amelyek valószínűvé teszik, hogy a hsp90 konformációváltozásai saját proteolitikus aktivitását is szabályozzák.

Chaperonok mint topoizomerázok

A fehérjék natív konformációjának kialakítása, illetve helyreállítása tulajdonképpen a peptidlánc kovalens kötéseinek csavargatásával valósul meg. Az egyes kovalens kötés körüli elemi tekerés jónéhány esetben önmagában nem igényel különlegesebb segítséget, máskor azonban, mint pl. a peptidil-prolil izomerázok esetén, a térgátlás által megnövelt aktivációs energiáját leküzdésére külön chaperonok szolgálnak [4]. A fehérjék tekergetése mellett a chaperonok DNS-t és RNS-t is tekerhetnek: a bevezetőben említett RNS/DNS chaperonokhoz hasonlóan [2] bizonyos klasszikus molekuláris chaperonok is DNS/RNS helikáz aktivitással bírhatnak (Szántó I. és Csermely P., nem közölt adatok).

A "fehérje-chaperonok"-nak az RNS/DNS chaperonok egyik alcsoportjával, a topoizomerázokkal való analógiája lehet, hogy széles specificitású proteáz aktivitásukkal is összefüggésbe hozható. Elképzelhető ugyanis, hogy a molekuláris chaperonok a polipeptidlánc helyretekerését a topoizomerázokhoz hasonlóan a peptidkötések *tranzien*s elhasításával és ezáltal a tekerés közben fellépő torziós feszültség mérséklésével is elősegítik.

Összefoglalás és következtetések

A fehérjék natív konformációjának kialakításához, illetve helyreállításához a molekuláris chaperonok számos különböző enzimaktivitást igényelnek. Chaperonok működhetnek ATP-ázként, fehérje kinázként, redox enzimekként, proteázként és a lista még minden bizonnyal tovább is folytatható lenne. Mindazonáltal a chaperonok igen rossz ATP-ázok, fehérje kinázok, redox enzimek és proteázok. Ezen, igen kis határfokkal megvalósuló enzimreakciók legtöbbszörében a chaperonok szubsztrátspecificitása igen csekély, minden bizonnyal a legtöbb esetben az elsőként felfedezett vegyületcsoporton kívül másfajta molekulákra is kiterjed. (A chaperonok ATP mellett GTP-t is hasítanak, nukleotid kötő helyükre minden bizonnyal más foszforilált molekulák, így pl. az alarmonok, az inozitol-foszfátok és a glikogén anyagcsere intermedierjei is bekötődnek; fehérjék mellett a legtöbb chaperon funkció RNS-en és DNS-en is megvalósulhat, stb.)

A molekuláris chaperonok, ezek az ősi, igen konzervatív molekulák úgy viselkednek, mintha a sejt enzimmészlete jelentős részének archetípusai lennének, multipotens, de tulajdonképpen multi-impotens előképét, illetve tartalékát képezve bizonyos fontos enzimfunkcióknak. Számos enzimaktivitásuk a chaperon funkcióhoz nélkülözhetetlen lehet, mások esetleg mellékesen, "véletlenszerűen" alakulhattak ki. A chaperonok által katalizált biokémiai reakciók zavarbaejtő sokaságában való jobb eligazodás a területen dolgozók egyik igen időszerű és roppantul izgalmas feladata.

Irodalmi hivatkozások:

- [1] Hendrick J.P. és Hartl, F-U. (1993) Annu. Rev. Biochem. 62, 349-384.
- [2] Travers, A.A., Ner, S.S. és Churchill, M.E.A. (1994) Cell 77, 167-169.
- [3] Hubbard, T.J.P. és Sander, C. (1991) Protein Eng. 4, 711-717.

- [4] Gething, M.J. és Shambrook, J. (1992) *Nature* 355, 33-45.
- [5] Welch, W.J. (1992) *Physiological Reviews* 72, 1063-1081.
- [6] Ishihama, A., Ikeuchi, T., Matsumoto, A. és Yamamoto, S. (1976) *J. Biochem.* 79, 927-936.
- [7] Welch, W.J. és Feramisco, J.R. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 1229-1237.
- [8] Csermely, P., és Kahn, C.R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4943-4950.
- [9] Palleros, D.R., Welch, W.J. és Fink, A.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5719-5723.
- [10] Csermely, P., Kajtár, J., Hollósi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C.R., Gergely, P. Jr., Sötl, Cs., Mihály, K. és Somogyi, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1901-1907.
- [11] Palleros, D.R., Reid, K.L., Shi, L., Welch, W.J. és Fink, A.L. (1993) *Nature* 365, 664-666.
- [12] Jackson, G.S., Staniforth, R.A., Halsall, D.J., Atkinson, T., Holbrook, J.J., Clarke, A.R. és Burston, S.G. (1993) *Biochemistry* 32, 2554-2563.
- [13] Csermely, P. (1994) *Cell Biology Internat.* 18, 566
- [14] Leustek, T., Toledo, H., Brot, N. és Weissbach, H. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 256-261.
- [15] Zylicz, M., LeBowitz, J.H., McMacken, R. és Georgopoulos, C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6431-6435.
- [16] Morioka, M., Muraoka, H. és Ishikawa, H. (1993) *J. Biochem.* 114, 246-250.
- [17] Sherman, M.Y. és Goldberg, A.L. (1992) *Nature* 357, 167-169.
- [18] Dorner, A.J., Wasley, L.C. és Kaufman, R.J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7429-7432.
- [19] Toledo, H., Carlino, A., Vidal, V., Redfield, B., Nettleton, M.Y., Kochan, J.P., Brot, N. és Weissbach, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2505-2508.
- [20] Legagneux, V., Morange, M. és Bensaude, O. (1991) *FEBS Letters* 291, 359-362.
- [21] Sherman, M.Y. és Goldberg, A.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8648-8652.
- [22] Venetianer, P. és Straub, F.B. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 166-168
- [23] Goldberger, R.F., Epstein, C.J. és Anfinsen, C.B. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 628-635
- [24] Wang, C.C. és Tsou, C.L. (1993) *FASEB J.* 7, 1515-1517.
- [25] Quemeneur, E., Guthapfel, R. és Gueguen, P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 5485-5488
- [26] Hwang, C., Sinskey, A.J. és Lodish, H.F. (1992) *Science* 257, 1496-1502
- [27] Ramasarma, T., Rasheed, B.K., Vijaya, S., Puranam, R.S., Shivaswamy, V., Gaikwad, A.S. és Kurup, C.K. (1992) *Indian J. Biochem. Biophys.* 29, 173-178.
- [28] Simpkins, C.O., Fogarty, K.W. II és Nhamburo, P. (1993) *Life Sci.* 52, 1487-1492
- [29] Hershko, A. és Ciechanover, A. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- [30] Mayer, R.J., Arnold, J., Laszlo, L., Landon, M. és Lowe, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 141-157.
- [31] Straus, D., Walter, W. és Gross, C.A. (1988) *Genes és Dev.* 2, 1851-1858.
- [32] Chiang, H.-L., Terlecky, S.R., Plant, C.P. és Dice, J.F. (1989) *Science* 246, 382-385.
- [33] Mitchell, H.K., Petersen, N.S. és Buzin, C.H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4969-4973.
- [34] Schnaider, T., Oke, M.S., Somogyi, J. és Csermely, P. (1993) 22nd FEBS Meeting, Stockholm, Abstr. No. B.148.
- [35] Latchman, D.S., Chan, W.L., Leaver, C.E.L., Patel, R., Oliver, P. és La Thangue, N.B. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 961-967
- [36] Tsubuki, S., Saito, Y. és Kawashima, S. (1994) *FEBS Lett.* 344, 229-233
- [37] Kassenbrock, C.K. és Kelly, R.B. (1989) *EMBO J.* 8, 1461-1467.
- [38] Nadeau, K., Das, A. és Walsh, C.T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1479-1487.
- [39] Li, Z. és Srivastava, P.K. (1993) *EMBO J.* 12, 3143-3151.
- [40] Dalie, B.L., Skaleris, D.A., Köhle, K., Weissbach, H. és Brot, N. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 1284-1292.
- [41] Gaut, J.R. és Hendershot, L.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12691-12698.
- [42] Goff, S.A., Casson, L.P. és Goldberg, A.L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6647-6651.
- [43] Squires, C. és Squires, C.L. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 1081-1085.
- [44] Southgate, R., Ayme, A. és Voellmy, R. (1983) *J. Mol. Biol.* 165, 35-57.
- [45] Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K.M. és Nagata, K. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 4036-4044.

INTRAMEMBRÁN SÓKÖTÉSEK SZEREPE A TRANSPORTFEHÉRJÉK MŰKÖDÉSÉBEN

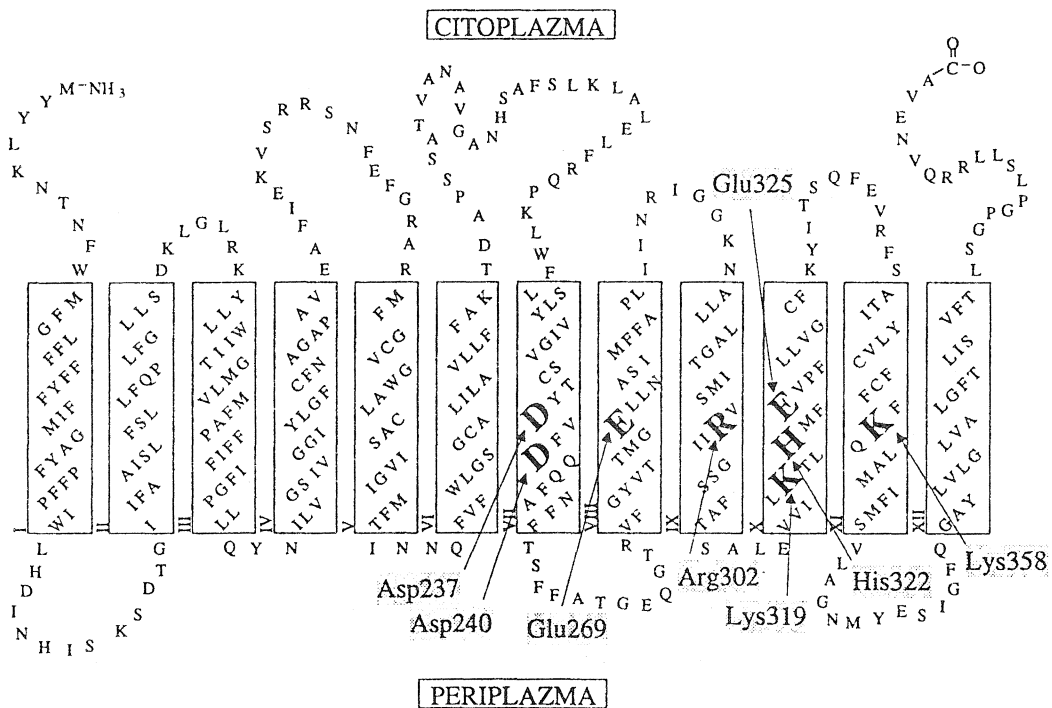
Az elmúlt évtized elsősorban irányított mutagenézisen alapuló vizsgálatai során egyértelművé vált, hogy a transzportfehérjék működési mechanizmusában a membránban elhelyezkedő, elektromos töltéssel rendelkező aminosavak alapvető szerepet játszanak. Érdekes módon azonban mind a mai napig vitatott, hogy valóban ionizált állapotban található-e az intramembrán arginin, lizin, hisztidin, aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncok. Az elektromosan töltött aminosavak jelenléte a hidrofób membránkörnyezetben termodinamikailag igen kedvezőtlen, a fehérje-lipid kölcsönhatás stabilitása megkívánja a töltés valamilyen formában történő semlegesítését. Az alábbiakban a transzportfehérjék egyik klaszikus modelljén, az *Escherichia coli* laktóz permeázán nyert megfigyeléseket ismertetem, amelyek valószínűsítik, hogy ez a molekula sókötések segítségével oldja meg a fenti problémát.

A laktóz permeáz másodlagos szerkezeti modelljét az 1. ábra demonstrálja. A fehérje 12 hidrofób transzmembrán α -hélixet tartalmaz, melyeket hidrofil hurkok kötnek össze a membrán két oldalán. A rövid hidrofil N és C terminusok a citoplazmatikus oldalon találhatóak. A primér aminosavszekvencia hidropátia analízise alapján szerkesztett modell érvényességét cirkuláris dikroizmus, lézer Ramanspektroszkópia, immunológiai vizsgálatok, limitált proteolízis, kémiai modifikáció valamint egy sor alkalikus-foszfátáz - laktóz permeáz (*lacY-PhoA*) fúziós fehérje analízise útján nyert kísérletes eredmények erősítették meg. A transzmembrán régiókban 8 potenciálisan ionizált aminosav helyezkedik el, melyek közül négy negatív (Asp237, Asp240, Glu269, Glu325) négy pedig pozitív (Arg302, Lys319, His322, Lys358) töltésű lehet. Bármely intramembrán ionos aminosav helyettesítése egy semleges aminosavval inaktíválja a transzportert, ami arra utal, hogy ezen aminosavak fontos szerepet játszanak a transzportmechanizmusban.

Sókötést alkotó aminosavpárok azonosítása "töltéspársemlegesítés" segítségével.

Először King és mtsai (1991) javasolták, hogy az Asp237 és a Lys358 aminosavak sókötést alkotnak. A fenti szerzők az Asp237→Asn és a Lys358→Thr inaktív mutánsokat vizsgálták és olyan másodlagos szupresszormutációkat kerestek, melyek aktív fenotípust

eredményeznek. Az izolált mutációk a Thr358 esetében az Asp237-et, míg az Asn237 esetében a Lys358-at változtatták valamilyen semleges aminosavra. A megfigyelések valószínű magyarázata, hogy az Asp237 és a Lys358 kölcsönhatásban állnak és sókötésen keresztül semlegesítik egymást. Ha a kölcsönható aminosavpár egyik tagját semleges aminosavval helyettesítjük, az megbontja a membránon belüli töltésegyensúlyt és a párosítatlan ionizált csoport megjelenése inaktíválja a fehérjét. A "magányos töltés" mutáció útján történő semlegesítése helyreállítja a membránon belüli töltésegyensúlyt, a transzportaktivitás visszatér.



1. ábra. A laktóz permeáz másodlagos szerkezetének modellje. Az aminosavakat egybetűs kódjuk jelöli, a transzmembrán hélixeket téglalapok határolják. Az intramembrán ionos aminosavak - Asp237, Asp240, Glu269, Arg302, Lys319, His322, Glu325 és Lys358 - helyzetét nagyobb, kövér betűtípus emeli ki.

A fenti megfigyelések alapján felmerül a lehetősége, hogy hasonlóan az Asp237-Lys358 párhoz, a többi negatív és pozitív töltésű intramembrán aminosavak is páronként kölcsönhatásban állhatnak egymással. Ha a többi sókötést alkotó aminosavpárok is az Asp237-Lys358 párhoz hasonlóan viselkednek, várható, hogy ha bármely pár mindkét tagját egyidőben semleges aminosavra cseréljük (töltéspársemlegesítés) a transzportaktivitás megmarad. Kísérleteinkben a laktóz permeáz aktív, ciszteinmentes mutánsát felhasználva

mind a 8 intramembrán aminosavat egyenként ciszteinre cseréltük. (Bár a kezdeti kísérletekben a cisztein csak a viszonylag kicsi, hidrofób, semleges töltésű aminosav szerepét tölti be, mint később látni fogjuk, az SH-csoport egyedi reaktivitása jelentős segítséget jelentett a mutánsok további tanulmányozásában.) A nyolc ciszteinmutáns egyike sem transzportál laktózt. A ciszteinmutánsokat párokban kombináltuk és 14 duplamutánst (a lehetséges interhelikális kombinációk száma) készítettünk, melyek mindegyikében egy negatív és egy pozitívan töltött aminosavat ciszteinhelyettesítéssel semlegesítettünk. Olyan kettős ciszteinmutánsok után kutattunk, melyekben két külön-külön funkcionálisan inaktív ciszteinmutáció kombinációja transzportaktivitást eredményez. A dupla ciszteinmutációk közül csak kettő mutat jelentős laktóztanszportot: Asp237→Cys/Lys358→Cys és Asp240→Cys/Lys319→Cys, a többi kettős mutáns inaktív. Az Asp237→Cys/Lys358→Cys mutáns viselkedése megerősíti King és mtsai megfigyelését, miszerint az Asp237 és a Lys358 kölcsönhatásban állnak egymással, míg az Asp240→Cys/Lys319→Cys mutáns aktivitása az Asp240 és a Lys319 aminosavpár kölcsönhatását valószínűsíti. Az a tény, hogy ezen sókötést alkotó aminosavpárok dupla ciszteinmutációja aktív fehérjét eredményez, arra utal, hogy sem a fenti négy aminosav, sem az általuk alkotott sókötések a transzportaktivitáshoz *nem alapvető fontosságúak*. Ugyanennek a megállapításnak a másik oldala, hogy a töltéspársemlegesítés módszere csak olyan esetben azonosíthatja a sókötést alkotó aminosavpárokat ha azok nem játszanak döntő szerepet a transzportmechanizmusában.

További vizsgálataink alapvető különbségeket tártak fel a fenti két aminosavpár tulajdonságaiban. (i) Míg az Asp237-Lys358 pár dupla ciszteinmutációja majdnem teljesen megtartott (70-90%) transzportaktivitással jár, az Asp240→Cys/Lys319→Cys mutáns csak 25-30%-os aktivitást mutat. (ii) Az Asp237-Lys358 pár polaritása megcserélhető, vagyis az Asp237→Lys/Lys358→Asp duplamutáns aktív. Ezzel szemben, az Asp240-Lys319 töltéspár polaritásának megfordítása teljes aktivitásvesztést okoz. (iii) Az Asp237-Lys358 pár dupla ciszteinmutációja jelentősen csökkenti a membránon belüli transzporter mennyiségét. Mivel a fehérje stabilitása vagy degradációja nem változik lényegesen, valószínű, hogy a membránbaépülés hatékonysága csökken. Ezzel szemben az Asp240-Lys319 pár mutációi nem befolyásolják a permeáz membránszintjét.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy az Asp237-Lys358 sókötés a fehérje membránbaépülése és helyes feltekeredése szempontjából fontos, viszont nem játszik

semmilyen szerepet a transzportmechanizmusban. Az Asp240-Lys319 sókötés, bár a transzportaktivitáshoz *per se* nem szükséges, fontos a teljes aktivitás kifejtéséhez.

Sókötést alkotó aminosavpárok azonosítása excimer fluoreszcencia segítségével.

A töltéspársemlegesítés során készített dupla ciszteinmutánsok lehetőséget nyújtanak az ionos aminosavakat helyettesítő ciszteinek jelölésére fluoreszcens szulfhidril-reagensekkel. Jung és mtsai (1993) pirénszármazékokkal jelölték a tisztított és liposzómákba rekonstituált dupla ciszteinmutánsokat. A pirénvegyületek alkalmasak ciszteinek térbeli viszonyának tanulmányozására, mivel ha két pirényűrű egymáshoz kb. 3.5Å közelségbe kerül, ún. excitált-dimer (excimer) stádiumba jut, amely hosszabb hullámhosszon emittál mint a monomer pirén. A szerzők kísérleteiben a Glu269→Cys/His322→Cys és az Arg302→Cys/Glu325→Cys pirén-maleimiddel jelölt dupla ciszteinmutánsok jelentős excimer fluoreszcenciát mutattak, bizonyítva, hogy a Glu269 és a His322 valamint az Arg302 és a Glu325 szorosan egymás közelében találhatók.

A két aminosavpár tagjait részletesen vizsgálták irányított mutagenézis segítségével is. A megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy az Arg302, His322 és Glu325 aminosavak alapvető komponensei a fehérjén keresztüli proton-transzlokációs mechanizmusnak, míg a Glu269 a szubsztrátkötésben és felismerésben játszik elsődlegesen szerepet. Mivel ezek az aminosavpárok - szemben az Asp237-Lys358 párral - közvetlenül részt vesznek a transzportfolyamatban, funkcionális kölcsönhatásuk azonosítása a töltéspársemlegesítés módszer révén nem volt lehetséges, a sókötés meglétére a térbeli közelség direkt kimutatása szolgált bizonyítékot. Különös, de a funkcionális kölcsönhatásaik alapján azonosított sókötések (Asp237-Lys358 és Asp240-Lys319) esetében a kísérleti erőfeszítések ellenére még nem áll rendelkezésünkre az aminosavak térbeli közelségét alátámasztó hasonló bizonyíték.

Sókötések más membrántranszport fehérjékben.

Bármennyire is tetszetős a mechanizmus, ahogy a laktóz permeázon belül az intramembrán ionos aminosavak töltéskompensációja történik, biztos, hogy nem általános. A legtöbb transzportfehérjében a membránon belüli pozitív és negatív töltött aminosavak aránya nincs egyensúlyban, ami eleve kizárja, hogy mindegyikük sókötést alkosson. Nagyon valószínű, hogy a bakteriorodopszin egy vagy több intramembrán sókötést tartalmaz és az

F_1-F_0 -ATPáz α -alegysége, a mitokondriális szétkapcsoló fehérje, a vörösvértetek klorid/bikarbonát karrierje, a Na^+/K^+ -ATPáz, a feszültségfüggő Na^+ -csatorna és az epitelsejtek apikális Na^+ -csatornája esetében is felvetették sókötések jelenlétét illetve szerepét a transzportmechanizmusban.

Sahin-Tóth Miklós

The Scripps Research Institute,
IMM-11; 10666 N. Torrey Pines Road,
La Jolla, CA 92037, USA.

Az ismertetett kísérletes munka H. Ronald Kaback, M.D. laboratóriumában - Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, Los Angeles, California, USA - készült.

Irodalmi hivatkozások:

1. Kaback, H. R. (1992) In and out and up and down with lac permease. In *International Review of Cytology* 137A (J. W. Jeon & M. Friedlander Eds.) pp. 97-125. Academic Press, Inc.
2. Kaback, H. R. , Jung, K., Jung, H., Wu, J., Privé, G. G., Zen, K. (1993) What's new with lactose permease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 627-636.
3. King, S. C., Hansen, L. C. & Wilson T. H. (1991) The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 177-186.
4. Sahin-Tóth, M., Dunten, R. L., Gonzalez, A. & Kaback, H. R (1992) Functional interactions between putative intramembrane charged residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10547-10551.
5. Lee, J.-I., Hwang, P. P., Hansen, C. & Wilson, T. H. (1992) Possible salt bridges between transmembrane α -helices of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 20758-29764.
6. Dunten, R. L., Sahin-Tóth, M. & Kaback, H. R. (1993) Role of the charge pair aspartic acid 237 - lysine 358 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32, 3139-3145.
7. Sahin-Tóth, M. & Kaback, H. R. (1993) Properties of interacting aspartic acid and lysine residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32, 10027-10035.
8. Jung, K., Jung, H., Wu, J., Privé, G. G. & Kaback, H. R. (1993) Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32, 12273-12278.

NEUROPROTEKCIÓ - Nemzetközi Szimpózium

(A Gyógyszerbiokémiai Szakosztály X. munkaértekezlete, Balatonöszöd, 1994 május 16-18.)

A Szakosztály szokásos évi összejövetelére a kormány üdülőjében került sor. Kellemes környezetben és időben, jól előkészített, baráti hangulatú találkozó részesei lehettünk, színvonalas tudományos programmal, melynek során három napon keresztül 19 előadást hallhattunk a neuroprotekciónak különböző területeiről. A nívót hat neves külföldi szakértő közreműködése emelte. A kitűnő szervezésért mindenekelőtt Nemes Józsefnét, Arányi Pétert, Gaál Józsefet és Kovács Gábort illeti köszönet.

Az idei konferencia divatos téma megvitatását tűzte ki célul. A központi idegrendszer sérülésének, átmeneti hipoxiájának, vagy krónikus megbetegedésének eredményeképpen részleges, vagy teljes szellemi leépülés, a mozgásképesség elvesztése alakulhat ki. Az akut és krónikus neurodegeneratív betegségek a népesség jelentős hányadát veszélyeztetik. Az utóbbi években csaknem minden jelentősebb gyógyszergyár megcélozta neuroprotektív hatású gyógyszerek kifejlesztését. Az alapvető neurokémiai és patológiai folyamatokról összegyűlő hatalmas ismeretanyag, s néhány új gyógyszerrel kapott kedvező klinikai tapasztalat eredményeképpen már a közeli jövőben reális lehetőségnek tűnik, hogy számos korábban irreverzibilisnek gondolt neurodegeneratív kórfolyamat kialakulását eredményesen befolyásoljunk gyógyszerekkel. A konferencián elhangzott előadásokból is kitűnik, hogy az idegsejtkárosodás háttérben álló folyamatok rendkívül komplexek, heterogének. Számos pont akad azonban, ami pl. az akut fejsérülést és a Parkinson betegséget a különböző etiológia ellenére hasonlatossá teszi. Ilyen közös pontok az idegszövet lokális energiaellátásának hiányossága, a glutamát és a kalcium jel szerepe, az "oxidatív stressz". Mindezek az idegsejtek végső pusztulásának mechanizmusában játszanak szerepet.

A tudományos ülés első napján Arányi Péter elnök megnyitója után elsősorban a glutaminsav szerepével foglalkozó előadások hangzottak el. Köztudott, hogy a glutaminsav az emlős központi idegrendszer legfontosabb serkentő transzmittere, a hatvanas évektől ismeretes azonban, az is, hogy a serkentő aminosav receptorok túlzott mértékű aktiválása az idegsejtek abnormális működéséhez, végső soron pusztulásához vezethet. Csaknem minden akut és krónikus neurodegeneratív kórfolyamatban kimutatták, vagy feltételezik, hogy a sejtpusztulást az extracelluláris glutaminsav koncentráció tartós, abnormális megnövekedése, az idegsejtek sokszor napokig tartó depolarizált állapota előzi meg. Ez direkt kapcsolatban áll az intracelluláris kalcium koncentráció tartós megnövekedésével, s a kalcium azután másodlagos hírvivőként önpusztító folyamatokat indíthat be. Ennek az excitotoxikus folyamatnak a blokkolására ma már számos, különféle típusú glutamát

antagonista áll rendelkezésünkre. Akalmazásuk azért is tűnik rendkívül perspektivikusnak, mivel a folyamatot korai szakaszába képesek beavatkozni. Hátrányuk viszont, hogy hatásukat olyan koncentrációkban fejtik ki, melyek a normális, fiziológias folyamatokat is megzavarják. Erdő S. (Chinoin) előadásában olyan, az NMDA receptor glicin helyén ható antagonistákkal foglalkozott, melyek a többi NMDA antagonistánál kevesebb mellékhatással rendelkeznek. Úgy tűnik, a nem-NMDA típusú glutamát antagonisták is használhatók lesznek mint neuroprotektív szerek. A Gyógyszerkutató Intézetben kifejlesztett 2,3-benzodiazepin szerkezetű nem-kompetitív blokkolók egyikét az Eli Lilly cég gyógyszerre kívánja fejleszteni. További előadások (Madarász E., ELTE; Szabó G., EGIS) a glutamát receptorok kérdéskörével kapcsolatos alapkutatási eredményeket tárgyaltak. Paróczai M. (Richter) az akut fejsérülések kezelésének lehetőségéről tartott összefoglalót.

A második nap délelőttjén elsősorban egy magyar sikergyógyszer, a deprenyl hatása volt a téma. Az előadók egyetértettek, hogy a deprenyl neuroprotektív hatásának közvetítésében metabolitjainak dopamin és noradrenalin felvétel gátló hatása játszik részleges, egyes esetekben talán kizárólagos szerepet (Sziráki I., GYKI; E. Heinonen, Orion-Farmos, Finnország; és Magyar K., SOTE; előadásai), utóbbi előadó a megfelelően időzített vérszintet biztosító készítmények jelentőségére is felhívta a figyelmet. P. Yu (Univ. Saskatchewan, Kanada) viszont olyan MAO-B gátló propargylamin származékok neuroprotektív hatásáról számolt be, melyek nem befolyásolják az uptake folyamatokat. Szelényi I. professzor (Asta, Németország) rövid beszámolója megerősítette azokat az adatokat, miszerint a deprenyellel történő tartós kezelés jelentősen megnyújtja a kísérleti állatok várható élettartamát.

A következő blokkban Gaál L. (EGIS) az elektrofiziológiai módszerek használatának szükségességét hangsúlyozta a tárgyalt gyógyszercepcsoportok kutatása során, míg három külföldi előadó a krónikus neurodegeneratív betegségek kórfolyamatával foglalkozott: W. Lange (Univ. Würzburg, Németország) az oxidatív stressz kivédésének terápiás megközelését tárgyalta a Parkinson betegséggel kapcsolatban, míg M. Youdim (Univ. Haifa, Izrael) kitűnő előadásában ugyanezen folyamatokat diszkutálta, s a Fe^{2+} ionok központi szerepét hangsúlyozta a betegség kialakulásában. J. Prince (Univ. Uppsala, Svédország) különböző neurodegeneratív folyamatok genetikai alapjairól, egyes mitokondriális enzimek szerepéről beszélt.

Az utolsó nap a fokális ischemia következtében kialakuló lokális metabolikus elváltozásokat elemezte Csiba L. (DOTE), majd az aluminium Alzheimer kórban játszott szerepe került megvitatásra (Bilkei-Gorzó A., EGIS). Egyesek elfogadják, mások elvetik az aluminium központi szerepét a betegség etiológiájában. Utóbbi véleményt erősítette hozzászólásában a kérdés ismert szakértője, Kása P. (SZOTE) is. Kiss B. (Richter) a vinpocetinnel kapott

kísérleti eredményeket és klinikai tapasztalatokat foglalta össze. Nagy tetszést aratott Zubovics Z. (GYKI) előadása, aki a gyógyszervegyész szemszögéből adott igen alapos áttekintést a neuroprotektív célzattal szintetizált illetve fejlesztés alatt álló vegyületekről, különös tekintettel a lipid peroxidáció gátlóira. A záró előadásban Tretter L. (SOTE) a hidroperoxidok szinaptoszómális hatásairól beszélt.

A szimpóziumon elhangzott előadások összefoglalóit a *Neurobiology* 1994 augusztusi számában (Vol. 2/2) leközli, melyért elsősorban a főszerkesztőnek, Halász Norbertnek tartozunk köszönettel. Az alábbiakban közöljük a folyóiratban megtalálható absztraktok listáját.

Tarnawa István, Gyógyszerkutató Intézet

Arányi, P.: Introduction. (pp. 161-2.)

Bilkei-Gorzó, A.: Aluminum and Alzheimer's disease. Facts and beliefs. (pp. 165-6.)

Csiba, L., Bereczki, D.: Regional metabolic approach to study the ischemic penumbra in models of focal forebrain ischemia. (pp. 165-6.)

Erdő, S.L., Lakics, V., Molnár, P., Bence, J., Szappanos, A.: The glycine site of the NMDA receptor-complex: A promising target for neuroprotective agents. (pp. 167-8.)

Gaál, L.: Reasons and facts. The role of electrophysiology in the neuroprotective research. (p. 169.)

Heinonen, E.H., Haapalinna, A., Ahola, T., McDonald, E., Suhoen, J., Hervonen, A.: Protection against DSP-4 and 6-OHDA toxicity by selegiline and its metabolites. (pp. 170-2.)

Madarász, E., Környei, Zs., Schlett, K., Kékesi, K., Szabó G., Környei, G., Tretter, L.: Inducibility of NMDA-gated channels and alterations in glutamate concentrations of the fluid environment of cultured cells during spontaneous and induced neuronal differentiation. (pp. 172-3.)

Magyar, K., Lengyel, J., Gaál, J.: Time related neuroprotective effect of (-)-deprenyl: use of programmed release (-)-deprenyl preparations. (pp. 174-5.)

Prince, J., Oreland, L.: Mitochondrial enzyme deficiencies in neurodegenerative disorders. (pp. 176-7.)

Riederer, P., Lange, K.W.: Experimental versus clinical neuroprotection. (pp. 178-9.)

Szabó, G.: Paradoxical effects of 2-amino-4-phosphonobutanoic acid on the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel: a possible explanation. (pp. 160-1.)

Szelényi, I., Nickel, B.: Selegiline and prolongation of life span. (p. 182.)

Sziráki, I., Kardos, V., Patthy, M., Pátfalusi, M., Gaál, J., Solti, M., Arányi, P., Kollár, E., Tömösközi, Zs., Király, I.: Distinct features of action of deprenyl in protection against neurotoxicity induced by MPTP and its analogues in C57BL mice. (pp. 183-4.)

Tarnawa, I.: GYKI 52466 and its novel analogues: non-competitive AMPA antagonists with 2,3-benzodiazepine structure. (pp. 185-6.)

Youdim, M.B.H., Lavie, L., Riederer, P., Rappaport, B.: The relevance of NO, O-2 and Fe²⁺ to mechanism of nigral cell death in Parkinson's disease. (pp. 187-8.)

Yu, P.H., Davis, B.A., Fang, J., Boulton, A.A.: Neuroprotective and neurorescue effects of different N-propargylamines. (pp. 189-90.)

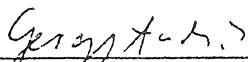
Zubovics, Z.: Neuroprotective agents with special respect to lipid peroxidation inhibitors. (p. 191.)

Paróczai, M.: Acute head and spinal cord trauma - pharmacological approach. (pp. 192-3.)

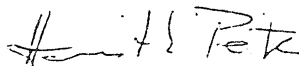
8., Elválasztástechnikai feladatok megoldása.^{2,3}

- a., Tudomásunk szerint az országban egyedülállóan van lehetőségünk arra, hogy a CD-készüléket nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában (HPLC) királ detektorként alkalmazzuk.
- b., A készülék egyidejűleg méri a királ- és abszorpciós jelet, így az enantiomer arány királis elválasztás nélkül is meghatározható. (Pl. rezolváláskor, preparatív oszlopkromatográfia alkalmazásakor az egyes frakciók enantiomer tisztasága meghatározható, még nem megfelelő elválasztás esetén is a koncentrációtól független anizotrópia faktor mérésével.)

A fenti lehetőségekről szívesen adunk bővebb információt személyesen vagy telefonon a következő telefonszámokon. (Tel:217-1222/ 30-as vagy 63-as mellék / Fax:217-0891)
 Tematikus OTKA pályázatokban résztvevő kutatócsoportok az OTKA-val kötött szerződésünk értelmében prioritást élveznek.



Dr. Gergely András
 a kémiai tudomány kandidátusa
 egyetemi docens
 CD labor vezető



Dr. Horváth Péter
 egyetemi tanársegéd
 szakmai felelős

- 1., Gergely A.: Kiroptikai módszerek alkalmazása a kvantitatív gyógyszeranalitikában
 Kandidátusi értekezés (1989)
- 2., Gergely A.: A Review of the Application of Chiroptical Methods to Analytical Chemistry
 J. Pharm.Biomed.Analysis 7 523 (1989)
- 3., Gergely A.:The Use of Circular Dichroism as a Liquid Chromatographic Detector.
 (chapt. 10, pp.:279-292)
 Application of Circular Dichroism Spectropolarimetry to the Determination of Steroids (chapt.11, pp.:293-305)
 In the Analytical Application of Circular dichroism
 ed.: N. Purdie and H.G. Brittain
 Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokio (1994)
- 4., Horváth P.: Doktori disszertáció SOTE ,(1990)



MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI EGYESÜLETEK SZÖVETSÉGI KAMARÁJA
FEDERAL CHAMBER OF TECHNICAL AND SCIENTIFIC SOCIETIES
HUNGARY

és a Magyar Innovációs Kamara (MIK) kezdeményezésére, velük egyetértésben a Mérnöki Kamara, a Magyar Mérnökakadémia, a Magyar Építészek Kamarája és Szövetsége, az Agrárkutató intézmények Országos Szövetsége

Reálértelmiség Egyeztető Tanácsa (REF)

megalakítását határozták el.

E jelentős támogatottságú országos szervezetek - melyek a magyar reálértelmiség (műszaki, agrár, természettudományi, közgazdasági) meghatározó hányadát képviselik - kinyilvánítják elhatározásukat az ország társadalmi-gazdasági felemelkedésének hatékony segítése iránt.

Ennek érdekében szakmai, szakértői tudásukat felajánlják az országgyűlés bizottságai, a kormányzati szervek, az Érdekegyeztetési Tanács részére előterjesztések, törvény- és programtervezetek véleményezésére, koncepciók kidolgozására.

Mindezt pártpolitikától függetlenül, az érdekegyeztetés munkaadói és munkavállalói oldalainhoz való csatlakozás igénye nélkül a gazdaság érdekeinek szem előtt tartásával, a tudományos-szakmai szempontok érvényesítésével kívánják gyakorolni. A Tanács partnerként részt kíván venni a társadalmi-gazdasági megállapodás létrehozásában.

A Tanács - melynek működési feltételeit az MTESZ biztosítja - nyitott a fenti célcsoport és feladatokat vállaló társadalmi szervezetek, szövetségek számára.

A Tanács készen áll az Országgyűlés, a Kormány, az Érdekegyeztetési Tanács igényeinek fogadására és az együttműködésre.

Műszaki és Természettudományi
Egyesületek Szövetségi Kamarája (MTESZ)

dr.Náray-Szabó Gábor elnök

Náray-Szabó Gábor

Magyar Innovációs Kamara (MIK)

dr.Pakucs János elnök

Pakucs János

Mérnöki Kamara

Andor Béla elnökhelyettes

Andor Béla

Magyar Mérnökakadémia

dr.Czoboly Emő elnökségi tag

Czoboly Emő

Magyar Építészek Kamarája és Szövetsége

Lázár Antal alelnök

Lázár Antal

Agrárkutató Intézmények Országos Szövetsége

dr.Biacs Péter társelnök

Biacs Péter

Budapest, 1994. július 15.

Októberig: kollektív vezetés

Kosáry Domokos az őszi akadémiai közgyűlés előkészületeiről

NÉPSZABADSÁG

1994. július 6., szerda

MAGYAR TÜKÖR

(Két részlet az interjúból)

Napjaink —
lapjainkban

– A törvény értelmében az októberi rendkívüli közgyűlésen áll fel az új Akadémia. Ennek előkészítésén június eleje óta dolgozik egy bizottság, amely fele részben akadémikusokból, fele részben más tudományos minősítéssel rendelkező kutatókból áll. Ők dolgozták ki a törvényben megszabott kétszáz nem akadémikus közgyűlési tag kiválasztásának szempontjait. A szakmai közvélemény szerint a legjobb minősítéssel rendelkező kutatók kétszáz listáját ennek alapján állították össze az egyes tudományos osztályok. A névsort az összes minősített megkapja azzal, hogy tegye meg javaslatát, s ha más jelöltje van, írja be, de akkor húzzon ki egy másik nevet a jelölőlistáról.

– Nem lenne jobb eleve több nevet tartalmazó listát szétküldeni?

– Ha így tennénk, az a veszély fenyegetne, hogy rengeteg lenne az érvénytelen szavazat. Az ilyen jellegű szavazás mindenképpen nehéz, bár ez a kétszáz listája egyébként is csak októberig van érvényben. Nekik kell ugyanis megszavazniuk az új alapszabályunkat, amelynek értelmében majd újabb kétszáz embert kell választani. Lehet, hogy az a csoport ugyanolyan, de az is lehet, hogy más összetételű lesz.

– Az új kormány megalakulása hogyan befolyásolhatja az Akadémiát? Milyen információk vannak arról, hogy mekkora súllyal kerültek szóba a kormányalakítás és a koalíciós megbeszélések során a tudomány kérdései?

– A koalíciós megállapodás szövegében egy helyen szereplünk, ami egyrészt megnyugtató, hiszen azt mondja ki, hogy az akadémiai törvény szellemében kell eljárni. A felsőoktatási és tudományos tanácsnak nagy szerepet szán a dokumentum, ami rendben is van. Annak összetételéről azonban a felsőoktatási törvény nem igazán szerencsésen intézkedik, úgyhogy ha ezt követnék, az nem lenne jó. Biztos, hogy az új kormánytakarékoskodnia kell, és ilyenkor mindig a tudományon és a kultúrán szokás spórolni. Ez azonban nem törvénytörés. Talvaly a svéd művelődési miniszter azt mondta nekem, hogy ők a tudomány támogatását éppen a recesszió miatt növelik a GDP 1,6 százalékáról 3,6 százalékra. Az Akadémia szándéka, hogy a jövő pénzügyminisztert, Békecsi Lászlót a rektori konferenciával közösen meghívja konzultációra. De nemcsak a pénzügyek miatt, hanem annak érdekében is, hogy az Akadémia a maga eszközeivel is segíthesse az országos feladatok megoldását.

Palugyai István

Uj MAGYARORSZÁG

1994. JÚLIUS 28., CSÜTÖRTÖK

Ósztálinista szavazás

Tudósgaliba az Akadémián

Ósztálinista módszernek nevezte az akadémiai közgyűlés előkészületeként megkezdődött szavazási metódust a *Tudományos Dolgozók Demokratikus Szakszervezetének* tagja, *Kardos Julianna* a tegnapi sajtótájékoztatón, amelyen két szakszervezet jelentette be tiltakozását.

Az ez évben elfogadott akadémiai törvény szerint a Magyar Tudományos Akadémia köztestület, tagjai pedig az akadémikusokon kívül mindazon tudományos fozkozattal rendelkezők, akik tudományos tevékenységet folytatnak. A mintegy tízezer nem akadémikus tag közvetlen és titkos választás során juttathatja a közgyűlésbe képviselőket.

Amikor az érintettek kézhez vették a szavazólapokat, igencsak meglepődtek, mivel azokon pontosan a megválasztható képviselők számával egyező számú jelölt nevét olvashatták. Az előkészítő bizottság kérésére az Akadémia különböző osztályai készítettek el a listákat, s bár a szavazólap lehetővé teszi nevek törlését, illetve új nevek beírását, a szakszervezetek szerint mindezt nemigen befolyásolhatná az eredményt.

A két érdekvédelmi szerv csupán a lehetséges megoldást illetően nem ért egyet: a Tudományos Dolgozók Szakszervezete úgy véli, amennyiben az előkészítő bizottság deklarálja, hogy a kiküldött szavazólapokat csu-

pán jelölőlistának tekinti, s a meghatározott számú jelölést elértek neveit felveszi az így szükségessé váló második forduló valódi szavazólapjaira, elfogadhatóvá válik az eljárás. Ezzel szemben a Tudományos Dolgozók Demokratikus Szakszervezete máris bojkottra szólít fel. Nem tudni azonban, hány szavazólap visszaküldésének megtagadásával válik érvénytelenné a választás – vagyis ismeretlen az érvényességi küszöb! –, s az sem, ebben az esetben hogyan és mikor ülhet össze végül az új közgyűlés, melynek első feladata a sokak által kifogásolt alapszabály-tervezet elfogadása lenne.

K. Cs.