

# 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 : An Amazing Distortion in DNA Induced by a  
Methyltransferase (Nobel Lecture)

Mitochondriális enzimek szerveződésének funk-  
cionális következményei

A mitokondriális DNS a humán medicinában

Eszköz a baktériumok molekuláris genetikájában :  
a Tn5 transzpozon

A citrát transzporter és citrát szintáz  
közötti interakció

A nitrogén-monoxid(NO) termelése, funkciója  
és kapcsolata az arginin-anyagcserével

Magyar Tudomány : Szakmagyar

Hírek és események - Biochemical Education

## Contents

An Amazing Distortion in DNA Induced by a  
Methyltransferase (Nobel Lecture)

Functional consequences of mitochondrial  
enzyme-enzyme interactions

Mitochondrial DNA in human medicine

A tool for bacterial molecular genetics :  
transposon Tn5

Interaction between citrate synthase and citrate  
transporter : a recently recognized precedent for  
the enzyme-transporter interaction

Production, Function and Relation to Arginine-  
Metabolism of Nitrogen-Monoxide(NO)

News and events

---

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1372 Budapest, Pf.45é

Felelős kiadó : dr.Guba Ferenc

Készült: a Semmelweiss Orvostudományi Egyetem Házinyomdájában  
1089 Budapest, Diószeghy Sámuel u.21

Az engedély száma : III/SZI/397/1977 HU ISSN 01338455

*Richard J. Roberts, born in 1943 in Derby, England, obtained his Ph.D. in organic chemistry at Sheffield University in 1968. Following a postdoctoral stay with J. L. Strominger at Harvard University, he worked at Cold Spring Harbor Laboratory from 1972 to 1992, where he advanced to be Assistant Director of Research. He is currently Director of Eukaryotic Research at New England Biolabs in Beverly, Massachusetts. In addition to intensive studies on the type-II restriction enzymes, his research has focused on Adenovirus-2. In recent years his work has centered around DNA methyltransferases. He was one of the pioneers in the development of computer-aided sequence analysis for proteins and nucleic acids.*

## An Amazing Distortion in DNA Induced by a Methyltransferase (Nobel Lecture)

Richard J. Roberts

Much of my work in biology has been driven by my early training in chemistry. In the study of a new chemical compound, the first and most important thing is to determine its detailed molecular structure. For a molecular biologist that usually means determining some DNA sequence, since an accurate knowledge of sequence will then allow the proper design of experiments to examine function. I was first exposed to the idea of macromolecular sequences while I was a postdoctoral fellow with Jack Strominger at Harvard. During that time I briefly visited Fred Sanger's laboratory in Cambridge, England, to learn the methodology of RNA fingerprinting and sequencing.

Shortly before moving to Cold Spring Harbor Laboratory, I learned of restriction enzymes from a lecture by Dan Nathans and immediately decided that here was the key to DNA sequencing. The idea was that by mapping restriction sites and sequencing small fragments, longer gene-sized sequences could be put together. My laboratory set out to isolate and characterize as many restriction enzymes as possible.<sup>[1]</sup> We began to use these enzymes to map Adenovirus-2 DNA<sup>[2]</sup> and to identify small fragments that might be worth sequencing. One such fragment would contain the 5'-end of an Adenovirus-2 mRNA and the eukaryotic promoter that controlled its expression. It was the hunt for this promoter-containing fragment that led to our discovery of split genes and RNA splicing.<sup>[3-6]</sup> By this time, Fred Sanger and Walter Gilbert had developed DNA sequencing methods, and we focused our attention on the sequence requirements for RNA splicing. Joe Sambrook, Walter Keller, and others cloned the tripartite leader that was present on Adenovirus-2 late mRNAs, and Sayeeda Zain determined its sequence.<sup>[7]</sup> Soon we undertook the complete sequencing of the Adenovirus-2 genome, which was eventually finished as a collaborative effort with Ulf Pettersson's laboratory.<sup>[8]</sup>

We realized early on that computational help would be essential for the sequencing project, and we developed many programs for assembling and analyzing DNA sequences.<sup>[9-14]</sup> During this time we and others began to clone and sequence the genes for restriction enzymes and their companion methyltransferases (MTases).<sup>[15,16]</sup> Our initial naive assumption was that in any

given restriction-modification system there would be a common region in the protein sequence of the restriction enzyme and the MTase that would pinpoint the region responsible for DNA sequence recognition. This was based on the fact that both enzymes had to recognize exactly the same DNA sequence. Once this common protein sequence had been recognized, we thought it likely that *in vitro* manipulation would allow us to change the DNA sequence recognized and so create new restriction enzymes by protein engineering. This proved hopelessly naive. Not only was there no similarity between the sequences for restriction enzyme and MTase genes, there was also no similarity between the genes for different restriction enzymes. There was, however, considerable sequence similarity among the genes for MTases, which was especially strong for the enzymes forming 5-methylcytosine. This observation has shaped the last few years of my research efforts and has led to our latest discovery, which is the topic of this lecture.

Methylation of adenine and cytosine residues is commonly found in prokaryotes, and cytosine methylation is widespread in eukaryotes. In bacteria, DNA methylation serves as a component of restriction-modification systems<sup>[17]</sup> and also as part of mismatch repair systems.<sup>[18]</sup> In higher eukaryotes, methylation of cytosine residues appears to be essential<sup>[19]</sup> and is involved in the control of gene expression, developmental regulation, genomic imprinting, and X-chromosome inactivation.<sup>[20]</sup>

There are three kinds of methylation that bacteria use to protect their DNA against the action of restriction enzymes: at the 5- (m5C) and N4-positions of cytosine (m4C), and at the N6-position of adenine (m6A). To date, 50 different m5C-MTase genes have been sequenced.<sup>[21]</sup> When we first began comparing the sequences of these genes in 1987, the available computer software was unable to provide good alignments of many of these sequences because the similarity between them was limited to short patches, which we now call motifs, that were separated by quite dissimilar regions. The similarity could be detected by eye, however. Janos Pósfai in my laboratory began developing algorithms that could find these small patches of similarity among proteins.<sup>[22]</sup> The program searched for the presence of small triplet patterns (Fig. 1) and then combined them into motifs that represented well-conserved regions within each of the set of proteins being aligned. These motifs then anchored the initial alignment. By reducing the stringency of the triplet search and limiting it to the regions between the main motifs, weaker motifs could be found, which enabled a more complete alignment.

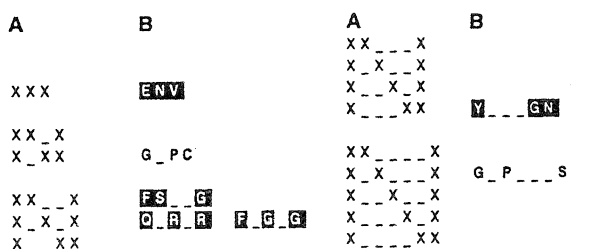


Fig. 1. A) Examples of the triplet patterns used to align multiple sequences. Each pattern contains three specific amino acids each at a set position X; any amino acid is allowed at positions . The simplest pattern (top) consists of all possible simple tripeptides ( $20 \times 20 \times 20 = 8000$  combinations). All sequences are searched for each of these patterns (224000 total for 10 amino acids) and their frequencies recorded. B) Examples of common patterns found in the m5C-MTases.

Finally gaps could be introduced to complete the alignment. We have since refined these programs and included a user interface with graphic output that enables the overall architecture of a group of proteins to be visualized. The relationships among the m5C-MTases is illustrated schematically in Figure 2. There are six regions of strong similarity and four more regions of lesser similarity that can be used to anchor the alignments between these sequences. Connecting these motifs are regions that vary in length and sequence. Similar analyses of the m5C-MTase have been reported by others.<sup>[23]</sup>

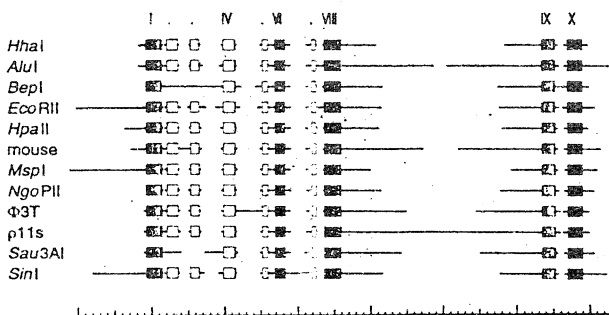


Fig. 2. Schematic representation of the alignment of twelve representative m5C-MTases. The six well-conserved motifs that anchored the original alignment are shown in color (light red: motif I, F-G-G; yellow: motif IV, PC; green: motif VI, ENV; light blue: motif VIII, Q-R-R; dark red: motif IX, RE; dark blue: motif X, GN). The open boxes represent the four weakly conserved motifs. The organisms from which these enzymes were obtained are listed on the left.

Among the six well-conserved motifs, two could be assigned functional significance. Motif IV, which is shown in block form in Figure 3a, contains a cysteine residue that was postulated by Santi and Danenberg to be a key catalytic residue.<sup>[24]</sup> They had proposed (Fig. 3b) that an initial step in the reaction involved the formation of a covalent complex between this cysteine residue in the MTase and the 6-position of cytosine in a Michael reaction. This activates the 5-position of cytosine and permits transfer of the methyl group from the cofactor S-adenosyl-methionine (AdoMet). Much biochemical evidence was available to support this mechanism, including the important observation that 5-fluorocytosine was a mechanism-based inhibitor.<sup>[25]</sup> Later work has enabled the isolation of the covalent intermediate,<sup>[26-28]</sup> and the cysteine within motif IV has been shown directly to be the site of covalent bond formation.<sup>[26]</sup> Recent experiments have shown that mutation of this cysteine residue to glycine, serine, or other amino acids blocks MTase action.<sup>[29-31]</sup>

Motif I could also be assigned a functional role. It contained three highly conserved residues FGG (Fig. 4a). Importantly, it

	68	91
<i>HhaI</i>	T I P D H D I L C A G F P C Q A F S I S G K Q K	
<i>AluI</i>	Y D G P I D V L T G G F P C Q P F S K S G A O H	
<i>BepI</i>	F P N D I D V V T G G F P C Q D F S F A G K R K	
<i>EcoRII</i>	H V P D H D V L L A G F P C Q P F S L A G V S K	
<i>HpaII</i>	I P E K F D I L C A G F P C Q A F S I A G K R G	
mouse	Q K G D V E M L C G G P P C Q G F S G M N R F N	
<i>MspI</i>	T I P Q H D I L C A G F P C Q P F S H I G K R E	
<i>NgoPII</i>	F P E E I D G I I G G P P C Q S W S E A G A L R	
Φ3T	N I P Y F D L L T S G F P C P T F S V A G G R D	
ρ11s	K L P E F D L L V G G S P C Q S F S V A G Y R K	
<i>Sau3AI</i>	A N T E A D M I V G G F P C Q D Y S V A R S L N	
<i>SmaI</i>	S G N E I D L I M G G P P C Q A F S T A G K R L	

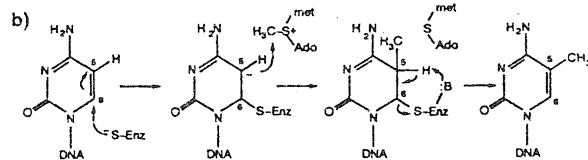


Fig. 3. a) Block diagram showing the well-conserved motif IV (PC). Residues conserved among all m5C-MTase sequences are strongly highlighted in yellow, and those that show three or fewer variants are lightly shaded. b) Schematic representation of the reaction pathway for the methylation of cytosine.

Az előadás közzelésének engedélyezését a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai központja kezdeményezésére kértük – és kaptuk meg. (bd)

We are pleased to grant you permission to publish the lecture in a Hungarian Science Magazine, the permission is free of charge but we ask you kindly to apply the following credit line: © The Nobel Foundation 1994.



NOBELSTIFTELSEN

The Nobel Foundation

Sincerely yours,

*Kristina Fallenius*  
Kristina Fallenius  
Information Department

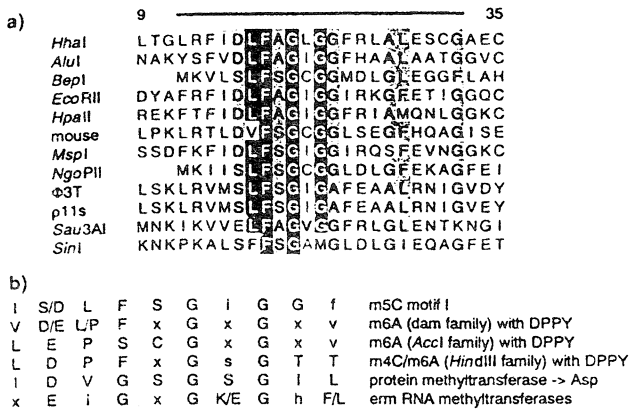


Fig. 4. a) Block diagram showing the well-conserved motif I (FGG). Residues conserved among all m5C-MTase sequences are strongly highlighted in red, and those that show three or fewer variants are lightly shaded. b) Consensus sequences for motif I and its relatives in other MTases (based on ref. [32]).

shows distinct similarities to motifs found in other MTases (Fig. 4b). It can be seen that all three classes of DNA MTases, m5C-, m4C-, and m6A-MTases as well as protein and RNA MTases contain a related motif. The common functional feature is that each MTase uses AdoMet as the methyl donor, and so motif I was suggested to be involved in binding to the cofactor. [32, 33]

We were interested in trying to define the region within the m5C-MTases that was responsible for sequence-specific recognition of the DNA substrate. Because the shared function of this group of MTases was the chemistry of the reaction, we argued that each of the common regions, exemplified by motifs I and IV, must be directly involved, either by interacting with the cofactor or providing residues important for catalysis. Since the precise DNA sequence recognized by each enzyme was different, we expected that this recognition would be mediated by a region that differed among the sequences. Only one region, the so-called variable segment located between motifs VIII and IX, appeared a reasonable candidate. Examination of these variable regions shows that not only the amino acid sequence but also the lengths of the segments vary considerably from MTase to MTase.

Although most of the known m5C-MTases are monospecific, that is, they recognize a single sequence, some MTases are known that recognize more than one specific sequence. These are the so-called "multispecific" MTases that are encoded by several *Bacillus* bacteriophages. These enzymes are single polypeptides like the monospecific enzymes, but they have the unusual property of methylating several quite different sequences. One example is M. $\Phi$ 3T1, which recognizes and methylates the sequences GGCC and GCNGC. [34] This enzyme is included in Figure 2, and there it can be seen that its variable region is extraordinarily long. A series of elegant studies carried out in Tom Trautner's laboratory has showed convincingly that single mutations within the variable regions of M. $\Phi$ 3T1 and other multispecific MTases knock out the ability of the enzyme to recognize one of the specific sequences, while still allowing the others to be recognized. [35, 36] In the case of the monospecific MTases, a comparable experiment was not possible, since muta-

tions that prevented DNA recognition would also block MTase activity. Saulius Klimasauskas and Janise Nelson in my laboratory undertook a series of experiments in which they swapped domains between two of the monospecific MTases. [37] We chose *M.HpaII* (recognition sequence: CmCGG) and *M.HhaI* (recognition sequence: GmCGC), because they both recognize tetranucleotide sequences and because the base methylated is located at an equivalent position within the recognition sequences. The variable regions, with or without flanking sequences, were swapped as illustrated in Figure 5. In several cases, active MTases resulted, and comparison of the hybrids showed clearly that sequence specificity lay entirely within the variable region. Surprisingly, hybrids in which the variable region plus its adjacent motif IX were transferred showed much higher methylation activity than hybrids in which just the variable region had been swapped.

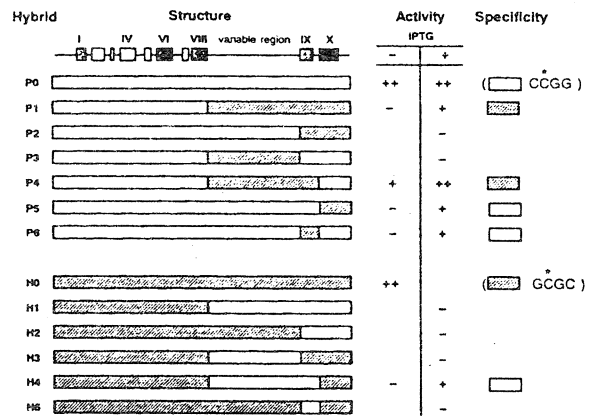


Fig. 5. Schematic representation of the hybrids P1-P6 and H1-H6 between *M.HpaII* (P0) and *M.HhaI* (H0). The MTases were under the control of an IPTG-inducible promoter on a pBR322 derivative. Sequences derived from *M.HpaII* are shown by open boxes; those from *M.HhaI* are shown by shaded boxes. The column labeled Activity shows the extent of protection of plasmid DNA in vivo, as measured by restriction enzyme cleavage in vitro, either before (-) or after IPTG induction (+) (- indicates no protection, + indicates weak protection, ++ indicates > 90% protection). The specificity of the hybrid methyl transferase is shown on the right.

In another series of experiments, Mi Sha swapped the variable regions from *M.HpaII* and *M.MspI*. These enzymes both recognize the sequence CCGG, but *M.MspI* transfers the methyl group to the first cytosine residue in the sequence, [38] whereas *M.HpaII* transfers the group to the second cytosine residue. [39] The results of these experiments showed that the choice of base to be methylated also depends upon the variable region. [40]

While we were pursuing our studies of the biochemistry and molecular biology of MTases, it became apparent that a crystal structure would be essential if we were to understand fully the reaction mechanism. Ashok Dubey in my lab began a collaboration with Xiaodong Cheng, who was working in Jim Pflugrath's laboratory at Cold Spring Harbor. They purified and attempted to crystallize *M.MspI*, which we had studied extensively. [41-43] Later they tried to crystallize *M.HpaII*, on which we had also worked. [44] In both cases, the efforts were unsuccessful. How-

ever, the third attempt with *M.HhaI* was quite successful. This enzyme forms part of the *HhaI* restriction system from *Haemophilus haemolyticus*, which had been discovered in my laboratory.<sup>[45]</sup> It is one of the smallest of the m5C-MTases, containing 327 amino acids ( $M_r \approx 37$  kDa). Its gene has been cloned and sequenced,<sup>[46]</sup> and the protein was overexpressed in *E. coli*<sup>[37, 46a]</sup> and subjected to detailed kinetic studies.<sup>[25]</sup> Sanjay Kumar purified the enzyme, and in December 1991 it crystallized readily—a wonderful Christmas present! Within eleven months Xiaodong Cheng had a structure for the binary complex between *M.HhaI* and AdoMet at 2.5 Å resolution.<sup>[48]</sup>

The structure was most revealing (Fig. 6): it was composed of a large domain and a small domain forming a cleft that appeared ideal for accomodating a DNA helix. Motif I (FGG) was con-

the ability of a heterologous motif IX to brace the structure of the small domain.

Soon after we obtained crystals of the binary complex between *M.HhaI* and AdoMet, we set about trying to obtain cocrystals that would also include DNA. Two kinds of complexes were envisioned. One would contain *M.HhaI* together with native DNA and *S*-adenosylhomocysteine (AdoHcy), while another would contain *M.HhaI* with AdoMet and a DNA duplex substituted with 5-fluorocytosine at the target. The latter would be expected to form a covalent intermediate in which the methyl group had transferred to the 5-position of cytosine, but release

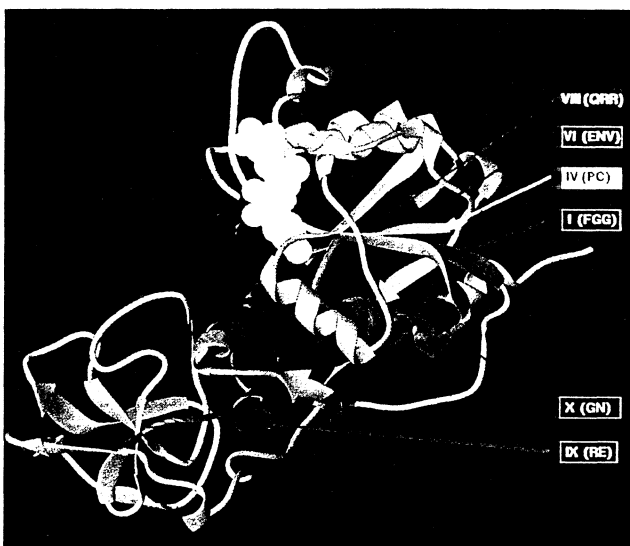


Fig. 6. The structure of *M.HhaI* in a binary complex with its cofactor AdoMet. The motifs are colored as in Figure 2. The cofactor, AdoMet, is shown in white as a space-filling model.

firmed to be involved in AdoMet binding, while another of the conserved motifs, X (GN), was also implicated in AdoMet binding. Motif IV (PC) was positioned close to the AdoMet-binding site on the same side of the cleft. Motif VIII (QRR) lay at the base of the cleft, where one could imagine that the positively charged residues of the motif could play a role in binding to the phosphodiester backbone of the DNA helix. Conserved motif IX (RE) threaded its way through the small domain, which otherwise consisted of almost the entire variable region. Motif IX appeared to form a backbone responsible for bracing the structure of the small domain. Finally, conserved motif VI (ENV) was clearly involved in correctly positioning motif IV.

The structure provided a clear explanation for our earlier observation that domain swaps that included both motif IX and the variable region gave more active MTases than those involving just the variable region.<sup>[37, 40]</sup> Although motif IX is quite highly conserved among the MTases, there are differences from one MTase to another, and these could be expected to influence

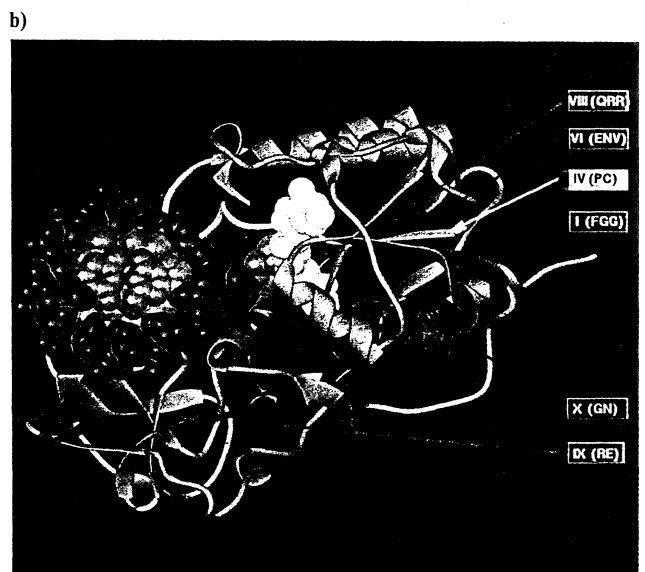
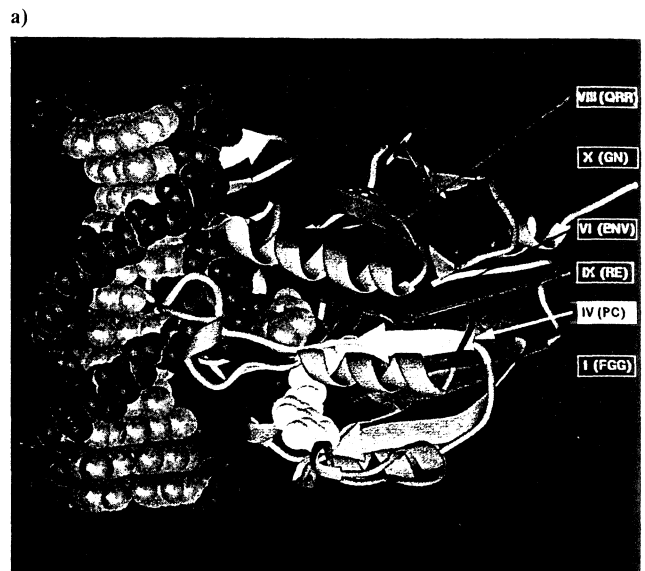


Fig. 7. The structure of *M.HhaI* in a ternary complex with a substrate duplex DNA-oligonucleotide and the end product of the reaction, AdoHcy. The motifs are colored as in Figure 2. AdoHcy is white, the DNA bases are orange, the deoxyribose is pink, and the phosphates are green. a) View from the side of the DNA axis. b) View looking down the DNA axis.

of the DNA from the covalent complex with the protein would be inhibited by the presence of the fluorine atom, which is a poor leaving group. Such a complex could almost be viewed as a model of the transition state in DNA methylation.

Saulius Klimasauskas joined the project for the cocrystallization, and we were fortunate in obtaining good crystals fairly readily with both native DNA and DNA containing 5-fluorocytosine. Xiaodong Cheng, who now has his own laboratory at Cold Spring Harbor, has solved the cocrystal structure at 2.8 Å resolution (Fig. 7).<sup>[49]</sup> We had expected to find that the DNA helix would be distorted in some way to allow the chemical reaction to take place, because the chemistry requires that the cysteine residue must approach the cytosine in a direction perpendicular to the plane of the ring. We imagined at most some extreme bending of the DNA. Unexpectedly, the distortion is much greater than a bend and much more elegant. The target cytosine flips right out of the axis of the DNA helix and into a pocket in the enzyme that contains the catalytically important cysteine residue. The rest of the helix is relatively undistorted. Another large conformational shift has taken place in the active site loop which encompasses motif IV. The entire 20-residue loop rotates through almost 180° from its original position to bring the catalytically active cysteine into contact with the target cytosine (Fig. 8).

The position in the DNA helix that was occupied by the target cytosine is now filled by two residues. One is a glutamine residue from the small domain, and the other is a serine residue from the active site loop. Surprisingly, neither of these residues is conserved among other m5C-MTases, which suggests that many residues could assist in opening a helix in this manner. As can be seen from Figure 7, the interaction between *M.HhaI* and DNA can be thought of as the enzyme embracing the DNA with two arms that penetrate the helix during the embrace and assisting in the extrusion of the target cytosine.



Fig. 8. Composite of the *M.HhaI* structures with and without DNA showing the conformational changes that take place upon binding to DNA (colors as in Fig. 7). The active site loop (yellow) is shown as a solid line to indicate its position in the ternary complex structure (with DNA) and as a triple-stranded ribbon in the binary complex structure (no DNA).

The sequence-specific interactions between *M.HhaI* and its substrate mainly involve two distinct loops (the sequence recognition loops) from the small domain. One loop is responsible for interactions with the orphan guanosine that is left after the cytosine has flipped and makes specific contacts with the adjacent bases on the same strand. It also provides the glutamine residue that fills the hole left after the target cytosine is flipped. The second recognition loop interacts predominantly with the

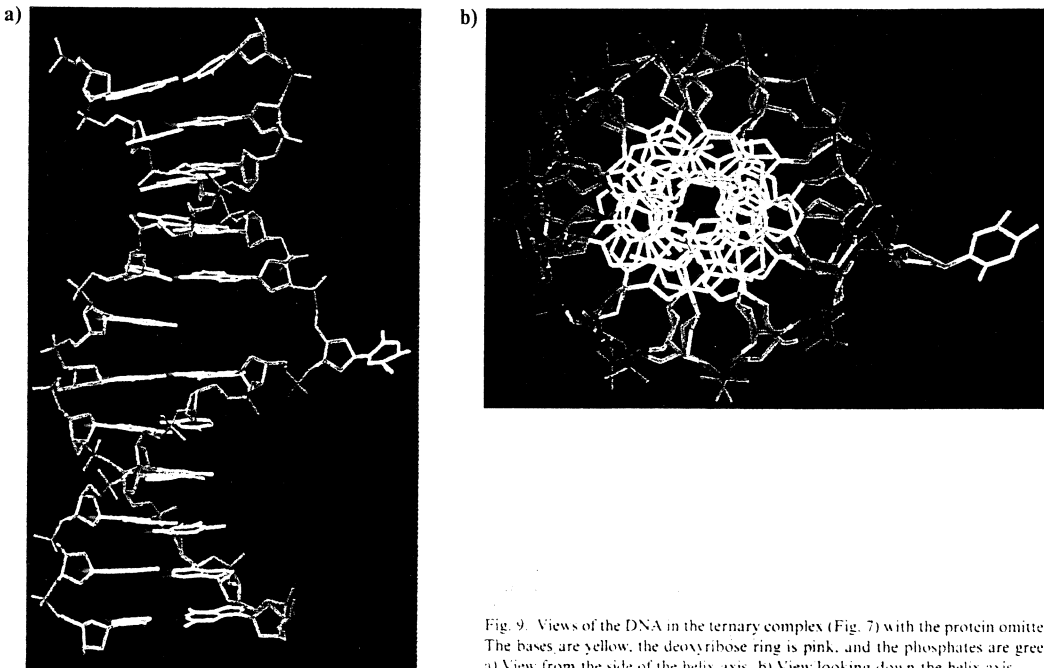


Fig. 9. Views of the DNA in the ternary complex (Fig. 7) with the protein omitted. The bases are yellow, the deoxyribose ring is pink, and the phosphates are green. a) View from the side of the helix axis. b) View looking down the helix axis.

strand containing the target cytosine. However, the interactions in the covalent complex should be viewed as an end point of a more complicated interaction. They may not be an accurate reflection of the initial events that led to recognition. More information on these initial events may be provided by studies of mutant proteins or DNA analogues that can form complexes without flipping the target cytosine. It should be noted that none of the well-characterized DNA binding motifs<sup>[50]</sup> appear to play a role in this system.

Previous studies of DNA-protein interactions have shown quite dramatic distortions induced in DNA by proteins, but usually these have involved bends or kinks: one of the most dramatic was the flattening and bending of DNA induced by the TATA-box binding protein.<sup>[51, 52]</sup> There have been no previous examples of proteins interacting with DNA and causing a base to flip out of the helix. Since the DNA bases lie buried in the inside of the helix in normal DNA, the mechanism presented here provides an elegant means by which complete access to the base becomes possible. We anticipate that other proteins performing chemistry on DNA bases also use this mechanism. Obvious candidates would be the MTases that form N<sup>6</sup>-methyladenine or N<sup>4</sup>-methylcytosine. Some of the enzymes, such as DNA glycosylases, that repair DNA damage might also flip the damaged base out of the helix prior to its excision. Many proteins that interact with DNA need to open up the helix. Some examples are topoisomerases, helicases, DNA polymerases and/or their auxiliary proteins that operate at replication origins, RNA polymerases, and recombination enzymes. In the structure shown in Figure 9 the phosphodiester bonds adjacent to the target cytosine are distorted from their positions in normal B DNA, and one might imagine that the continued unzipping of the helix would be easy.

Surprisingly, the interaction between M.HhaI and DNA requires no external energy source. Conformational rearrangements within the protein combined with specific interactions between protein and DNA likely provide the energy to open the helix. The energy is then stored for use during the return of the target cytosine. It would be surprising if this mechanism is not used elsewhere. Split genes were discovered unexpectedly but proved to be easily found once we knew they were there. This mechanism of flipping a base out of the DNA helix might also prove to be of widespread importance as a first step in opening up a DNA helix. We should lose no time in exploring the possibility.

*I am most grateful to all of my colleagues who have worked so hard in my laboratory to ensure our success. None of this would have been possible without their input. In addition to those mentioned explicitly in the text I thank Phyllis Myers, Kathy O'Neill, Margaret Wallace, Louise D'Allessandro, Jodie Freyer, Carol Marcincuk, Dana Macelis, and Ching Lin, whose dedication has been especially important in making my life easier. I thank Jim Watson for persuading me to go to Cold Spring Harbor Laboratory and for many stimulating conversations. Among many colleagues, Ashok Bhagwat, Mike Botchan, Don Comb, Greg Freyer, Rich Gelinus, Tom Gingeras, David Helfman, Winship Herr, Adrian Krainer, Stu Linn, and Ira Schildkraut have been good friends and valuable sources of criticism and advice. I thank the National Institutes of Health and the National Science Foundation for much support over the years. Finally, I am indebted to*

*my wife, Jean, and my children, Alison, Andrew, Christopher, and Amanda, who have been supportive and understanding of my addiction to science.*

Received: January 17, 1994 [A 48 IE]  
German version: *Angew. Chem.* 1994, 106, 1285

- [1] R. J. Roberts, *Crit. Rev. Biochem.* 1976, 4, 123–164.
- [2] C. Mulder, J. R. Arrand, H. Delius, W. Keller, U. Pettersson, R. J. Roberts, P. A. Sharp, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974, 39, 397–400.
- [3] R. E. Gelinus, R. J. Roberts, *Cell* 1977, 11, 533–544.
- [4] L. T. Chow, R. E. Gelinus, T. R. Broker, R. J. Roberts, *Cell* 1977, 12, 1–8.
- [5] R. E. Gelinus, L. T. Chow, R. J. Roberts, T. R. Broker, D. F. Klessig, at the *Brookhaven Symposium in Genetic Interaction and Gene Transfer (Brookhaven Symp. Biol.* 1977, 29, 345–347).
- [6] T. R. Broker, L. T. Chow, A. R. Dunn, R. E. Gelinus, J. A. Hassell, D. F. Klessig, J. B. Lewis, R. J. Roberts, B. S. Zain, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1978, 42, 531–553.
- [7] B. S. Zain, J. Sambrook, R. J. Roberts, W. Keller, M. Fried, A. R. Dunn, *Cell* 1979, 16, 851–861.
- [8] R. J. Roberts, G. Akusjarvi, P. Alestrom, R. E. Gelinus, T. R. Gingeras, D. Sciaky, U. Pettersson in *Adenovirus DNA: The Viral Genome and Its Expression* (Ed.: W. Doerfler), Martinus Nijhoff, Boston, MA, 1986, pp. 1–51.
- [9] T. R. Gingeras, J. P. Milazzo, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1978, 5, 4105–4127.
- [10] T. R. Gingeras, J. P. Milazzo, D. Sciaky, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 529–545.
- [11] T. R. Gingeras, P. I. Rice, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1982, 10, 103–114.
- [12] T. R. Gingeras, R. J. Roberts, *Science* 1980, 209, 1322–1328.
- [13] R. M. Blumenthal, P. R. Rice, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1982, 10, 91–101.
- [14] C. Keller, M. Corcoran, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 379–386.
- [15] A. Kiss, G. Pósfai, C. C. Keller, P. Venetianer, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 6403–6421.
- [16] A. S. Bhagwat, A. Sohail, R. J. Roberts, *J. Bacteriol.* 1986, 166, 751–755.
- [17] R. J. Roberts, S. S. Halford in *Nucleases* (Eds.: S. M. Linn, R. S. Lloyd, R. J. Roberts), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993.
- [18] P. Modrich, *Annu. Rev. Genet.* 1991, 25, 229–253.
- [19] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* 1992, 69, 915–926.
- [20] J. P. Jost, H. P. Salaz, *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, Birkhäuser, Basel, 1993.
- [21] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Pósfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 1–10.
- [22] J. Pósfai, A. S. Bhagwat, G. Pósfai, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 2421–2435.
- [23] R. Lauster, T. A. Trautner, M. Noyer-Weidner, *J. Mol. Biol.* 1989, 206, 305–312.
- [24] D. V. Santi, P. V. Danenberg in *Folates and Pterins, Vol. 1* (Eds.: R. L. Blakely, S. J. Benkovic), Wiley-Interscience, New York, 1978, pp. 343–396.
- [25] J. C. Wu, D. V. Santi, *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 4778–4786.
- [26] L. Chen, A. M. MacMillan, W. Chang, K. Ezaz-Nikpay, W. S. Lane, G. L. Verdine, *Biochemistry* 1991, 30, 11018–11025.
- [27] S. Friedman, N. Ansari, *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 3241–3248.
- [28] S. S. Smith, B. E. Kaplan, L. C. Sowers, E. M. Newman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 4744–4748.
- [29] M. W. Wyszynski, S. Gabbara, A. S. Bhagwat, *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 319–326.
- [30] S. Mi, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 2459–2464.
- [31] L. Chen, A. M. MacMillan, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 5318–5319.
- [32] D. Ingrassio, A. V. Fowler, J. Bleibaum, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 20130–20139.
- [33] S. Klimasauskas, A. Timin-kas, S. Menkevicius, D. Butkiene, V. Butkus, A. A. Janulaitis, *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 9823–9832.
- [34] M. Noyer-Weidner, S. Jentsch, B. Pawlek, U. Gunthert, T. A. Trautner, *J. Virol.* 1983, 46, 446–453.
- [35] T. S. Balganesch, L. Reiners, R. Lauster, M. Noyer-Weidner, K. Wilke, T. A. Trautner, *EMBO J.* 1987, 6, 3543–3549.
- [36] K. Wilke, E. Rauhut, M. Noyer-Weidner, R. Lauster, B. Pawlek, B. Behrens, T. A. Trautner, *EMBO J.* 1988, 7, 2601–2609.
- [37] S. Klimasauskas, J. E. Nelson, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 6183–6190.
- [38] R. Y. Walder, C. J. Langtimm, R. Catterjee, J. A. Walder, *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 1235–1241.
- [39] M. B. Mann, H. O. Smith, *Nucleic Acids Res.* 1977, 4, 4211–4221.

## Mitokondriális enzimek szerveződésének funkcionális következményei

Sümegei Balázs,  
Pécsi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézet

A mitokondrium belsőmembránja által körülhatárolt térben rendkívül speciális körülmények uralkodnak, a fehérjekoncentráció közel van a 0.5 gramm/ml-hez, ami a fehérje-kristályban lévő fehérje koncentrációt közelíti meg. Továbbá a membrán-sűrűség olyan nagy például a szívmitokondriumokban, hogy a lipid kettősrétegek között három átlagos méretű fehérjemolekula fér csak el [1,2]. Ilyen extrém körülmények között értehető, hogy a fehérje molekulák között meglévő híg vizes oldatban gyengének tűnő kölcsönhatások szerepe megnövekedhet, és fontos szerepet tölthetnek be a funkcionális kapcsolatban lévő mitokondriális enzimek szupramolekuláris szerveződésében.

**Enzim-enzim interakciók in vitro vizsgálata.** A nyolcvanas években egyre nagyobb számban jelentek meg adatok arra, hogy számos konszekutív reakciót katalizáló enzim között fizikailag kölcsönhatás is van [3-9]. Így bizonyítékok vannak számos citrátköri enzim kölcsönhatására, illetve a zsírsav  $\beta$ -oxidáció utolsó enzime (  $\beta$ -ketotioláz) és citrát-szintáz, valamint a glikolízist a citrátkörrel összekötő piruvát dehidrogenáz komplex és a citrát szintáz közötti interakciókra [3-13]. Számos laboratórium vizsgálta továbbá az aminosav anyagcsere enzimeit, illetve ezen enzimeknek a citrátkör egyes enzimeivel történő kölcsönhatásait [3-4].

A fenti vizsgálatok azt mutatták, hogy in vitro körülmények között specifikus interakciók mutathatók ki számos funkcionális kapcsolatban lévő enzim között, és jelezték, hogy ezeknek a kölcsönhatásoknak szerepe lehet a sejten belüli kompartmentalizációban. Azonban számos esetben a kölcsönhatások csak alacsony ionerősségnél, vagy polietilén-glikol jelenlétében voltak jól kimutathatók, ami megkérdőjelezte a vizsgált kölcsönhatások in vivo jelentőségét. Ezért igen fontos olyan vizsgálati rendszert kifejleszteni, amelyben a fiziológiai körülményekhez jobban közelítő körülmények között vizsgálhatjuk az interakciókat.

**Mátrixenzim-belsőmembrán interakciók.** Számos laboratórium vizsgálta a mitokondriális mátrix enzimek és a belsőmembrán belső fele közti kölcsönhatást. Kiderült, hogy a citrátköri enzimek egy része direkt, vagy indirekt [14-17] módon kötődik a belső membránhoz. Sikerült kimutatni, hogy az első respirációs komplex (komplex I, NADH dehidrogenáz, vagy NADH:ubikinon oxidoreduktáz) köt számos mitokondriális dehidrogenázt, melynek szerepe lehet a mitokondriális anyagcsere-folyamatokban keletkezett NADH reoxidálásában. Továbbá egy esetben sikerült homogenitásig tisztítani olyan mitokondriális membránfehérjét, amely specifikusan kötötte a 3-hidroxiacil-CoA dehidroge-



- [40] S. Mi, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4811–4816.  
 [41] P. M. Lin, C. H. Lee, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3001–3011.  
 [42] A. K. Dubey, B. Mollet, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1579–1585.  
 [43] A. K. Dubey, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3167–3173.  
 [44] C. O. Card, G. G. Wilson, K. Weule, J. Hasapes, A. Kiss, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1377–1383.  
 [45] R. J. Roberts, P. A. Myers, A. Morrison, K. Murray, *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 199–208.  
 [46] M. Caserta, W. Zacharias, D. Nwankwo, G. G. Wilson, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4770–4777.  
 [47] a) J. C. Wu, D. V. Santi, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 703–717; b) S. Kumar, X. Cheng, J. W. Pflugrath, R. J. Roberts, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8648–8653.  
 [48] X. Cheng, S. Kumar, J. Pösfai, J. W. Pflugrath, R. J. Roberts, *Cell* **1993**, *74*, 299–307.  
 [49] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell*, **1994**, *76*, 357–369.  
 [50] S. C. Harrison, *Nature* **1991**, *353*, 715–719.  
 [51] Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn, P. B. Sigler, *Nature* **1993**, *365*, 512–520.  
 [52] J. L. Kim, D. B. Nikolov, S. K. Burley, *Nature* **1993**, *365*, 520–527.

Üi. Lapunk számára színes ábrák közlése nem lehetséges. Kérjük olvasóink megértését.

## INVITATION

*The Hungarian Biochemical Society*  
announces the

**Second International Conference  
of the Hungarian Biochemical Society**

to be held in *Szeged, Hungary*  
between *August 20–23, 1995*

All colleagues who are interested  
to participate are cordially invited by

**Péter Friedrich**

*President of the Hungarian Biochemical Society*

and on behalf of the organizers by

**László Vígh**

*conference-chair,*

**Anna Borsodi, Ferenc Deák and László Dux,**

*members of the organizing committee*

Secretariat of the 2nd International Conference  
of the Hungarian Biochemical Society  
Institute of Biochemistry  
Biological Research Center

H-6701 SZEGED, P.O. BOX 521,  
HUNGARY

## PRELIMINARY SCIENTIFIC PROGRAM

The program of the Meeting will be based on half-day symposia. The talks will be held by invited speakers (30 min). A limited number of oral presentations (10 min) are also possible. Poster sessions will be organized with poster discussion.

### List of symposia

1. Environmental Biochemistry and Biotechnology  
(*János Nemcsók*)
2. Molecular Biology and Physiology  
of the Temperature Stress  
(*Ibolya Horváth and László Vígh*)
3. Stress Proteins – Molecular Chaperones  
(*Péter Csermely and László Vígh*)
4. Cell Cycle Control (*Dénes Dudits*)
5. Molecular Biology of *Drosophila* Differentiation  
(*Péter Maróty*)
6. Biochemical Adaptations in Contractile Tissues  
(*László Dux*)
7. Hormone- and Neurotransmitter Receptors  
(*Anna Borsodi*)
8. Cytokines (*Ernő Duda*)
9. Serine Proteases: Structure and Function  
(*László Gráf*)

názt [18]. A fenti vizsgálatok jelezték, hogy a mitokondriális anyagcsereutak enzimeji a mitokondrium belsőmembrán fehérje komponenseire épülve szerveződnek supramolekuláris komplexekké.

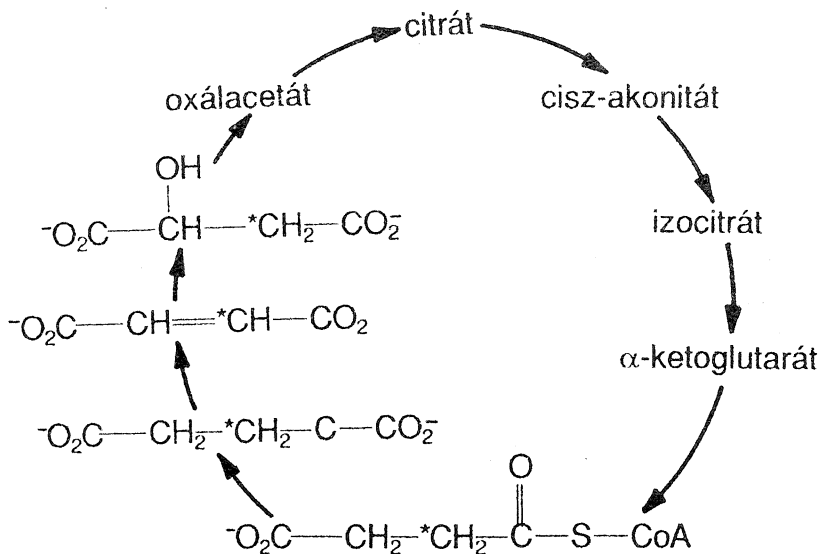
**In situ vizsgálatok.** A mitokondriális interakció vizsgálatára igen jónak bizonyult a "metabolon"-nak is nevezett speciálisan permeabilizált mitokondrium [19]. Ebben a membránjának egy részétől megfosztott mitokondriumban a citrátköri és a zsírsav  $\beta$ -oxidációs enzimek stabilan kötődtek egymáshoz, illetve a mitokondrium megmaradt membránjához annak ellenére, hogy a náluknál nagyobb fehérjék, pl. specifikus antitestek be tudtak jutni a permeabilizált mitokondrium belsejébe és gátolni tudták a fenti enzimeket. Ilyen módon kimutatható volt a fenti enzimek szupramolekuláris szerveződése a mitokondriumban, és lehetőség nyílt olyan kinetikai vizsgálatokra, melyekben egy anyagcsere-folyamat részét vagy egészét vizsgáltuk jól kontrollált körülmények között az adott enzimek fiziológiás környezetében. Ezek a vizsgálatok jelezték, hogy a citrátköri és a zsírsav  $\beta$ -oxidáció enzimeinek organizációja 500-1000% kinetikai előnyt jelent a nem organizált enzimrendszerekhez képest [10]. Hasonlóképpen a fenti tanulmányok igazolták, hogy a mitokondriális  $\text{NAD}^+$  függő dehidrogenázok (malát dehidrogenáz,  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz, izocitrát dehidrogenáz és  $\beta$ -hidroxiketoacil-CoA dehidrogenáz) egy fontos része direkt- vagy indirekt módon kapcsolódik az első respirációs komplexhez, a NADH:ubikinon oxidoreduktázhoz. Továbbá a fenti interakciók következtében szubsztrát ( $\text{NAD}^+$  - NADH) "channeling" történik a fenti enzimek és a komplex I között, amelynek a zsírsav  $\beta$ -oxidáció és a citrátkör, illetve a respirációs lánc funkcionális összekapcsolásában lehet fontos szerepe.

**Élesztő mutánsok funkcionális vizsgálata.** A citrátköri élesztő mutánsok vizsgálata - melyekben pont vagy deléciós mutáció következtében az adott enzimfehérje nem szintetizálódik, vagy rendkívül gyorsan lebomlik - értékes információkat adhat a mitokondriális enzimek szerveződésére. Amennyiben a citrátköri enzimek olyan szupramolekuláris komplexet adnak, mint amilyeneket in vitro és in situ adataink jeleznek, akkor egy citrátköri enzim fizikai hiánya megbonthatja ezt a szerveződést. A szerveződés ilyen megbomlása negatívan befolyásolhatja azokat a mitokondriális részfolyamatokat is, amelyekben az adott enzim katalitikusan nem vesz részt. Így feltételezhető, hogy az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz gén diszrupciójával keletkezett élesztő mutánsban a malátból és  $^{13}\text{C}$ -jelölt acetátból történő glutamát szintézis nem sérült, mivel az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz enzimnek nincs direkt szerepe a glutamát szintézisben. Azonban a  $^{13}\text{C}$ -NMR-es vizsgálataink azt mutatták, hogy a fenti mutáns egy nagyságrenddel lassabban volt képes szintetizálni a glutamátot, mint a szülő törzs [20]. A fenti megfigyelésre nem találtunk semmilyen metabolikus magyarázatot, ezért arra következtettünk, hogy az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz komplex hiánya a citrátköri enzimek organizációját zavarja meg, és így csökkenti a citrátkör aktivitását. Azaz in vivo körülmények között is megfigyelhető az enzimek szupramolekuláris szerveződésének katalitikus jelentősége.

Hasonló kísérleteket végeztünk más citrátköri mutáns enzimekkel is, és ezek az adatok mind a fenti konklúziót támasztották alá. Azaz a citrátköri enzim fehérje eltűnése megbontja a citrátköri enzimek szerveződését, és így befolyásol olyan folyamatokat is, melyekben önmaga az adott enzim nem vesz részt. Tehát a fenti géndiszrupcióknak van egy olyan pleiotropikus hatása, amely a gén és az általa kódolt enzim ismert tulajdonságaiból közvetlenül nem levezethető.

Mondhatnánk, ha a fenti elképzelés igaz, akkor például a citrát szintáz hiányos éslesztő mutánsban történő katalitikusan **inaktív**, de **normális** struktúrát adó mutáns gén visszahelyezése fontos funkcionális hatásai lennének. A fenti inaktív citrát szintáz adó gén visszahelyezése ugyan nem befolyásolná a citrátköri enzimek aktivitását, de a katalitikusan inaktív, ugyanakkor normál szerkezetű citrát szintáz helyreállítaná a citrátköri enzimek szupramolekuláris szerveződését, és így indirekt javítaná a mitokondrium funkciót. A fenti génmanipulációk elvégzése ténylegesen kimutatta, hogy az inaktív citrát szintáz gén visszahelyezése jelentősen javította a mitokondrium funkciót alátámasztva a fent leírt elképzeléseket [21].

**Molekuláris orientációt megőrző szubsztrát transfer *Saccharomyces cerevisiae*-ben.** A citrátkör szukcinil-CoA-tól malátig tartó részében [1. ábra] aszimmetrikus molekulából két szimmetrikus molekulán át újból egy aszimmetrikus molekula keletkezik.



1. ábra: Orientációt megőrző szubsztrát transzfer a citrátkörben.

\* a  $^{13}\text{C}$ -al jelölt atom

Ezért, ha megjelöljük a szukcinil-CoA-t a C2-s pozícióban, akkor az ebből képződő szimmetrikus intermedierek (szukcinát és fumarát) szabad rotációját feltételezve megkülönböztethetlenné válik, vajon a jelölés C3-ban, vagy C2-ben történt. Azaz a belőlük képződött malátban a C2 és a C3 atom is egyenlő mértékben jelölt lesz, továbbá minden olyan intermedierben, amely malátból képződik. Mivel a fenti kismolekulák rotációs korrelációs ideje kb. 50 pikoszekundum, míg a fenti intermedier pool-ok megújulásának fél életideje perces tartományban van, így a fenti elképzelés logikusnak tűnik. Tehát az aszimmetrikusan jelölt szukcinil-CoA-ból szimmetrikusan jelölt malát képződése várható, ha csak nincs a mitokondrium belsejében olyan mértékű szervezettség, ami a fenti szimmetrikus molekulák rotációját olyan mértékben korlátozza, hogy ezek legalább részlegesen orientációjukat megőrző módon adódnak át a konszekutív reakciókat katalizáló citrátköri enzimek között. Tehát amennyiben az orientációt megőrző szubsztrát átadást sikerülne igazolni in vivo körülmények között, ez igazolná a mitokondriális enzimek in vivo organizációját és ennek metabolikus jelentőségét.

Mint az jól ismert, [4- $^{13}\text{C}$ ]glutamátból [3- $^{13}\text{C}$ ]szukcinil-CoA képződik, illetve [3- $^{13}\text{C}$ ]propionátból [2- $^{13}\text{C}$ ]szukcinil-CoA, azaz a fenti anyagok oxidációjának vizsgálata a termékek  $^{13}\text{C}$ -NMR analízise bizonyítékokat adhat az orientációt megőrző szubsztrát transzferre. A fenti vizsgálatokat A.D.Sherry-vel (UT-Dallas) és P.A.Srere-vel (VA. Med. Center Dallas) végeztük el és egyértelmű bizonyítékokat kaptunk arra, hogy aktívan respiráló élesztőben az intermedierek jelentős része a fenti orientációt megőrző transzferrel adódik át a citrátköri enzimek között in vivo [22-23]. További szubsztrátok felhasználásával is igazoltuk a fenti megfigyelés helytálló voltát. Erre azért volt szükség, hogy kizárjuk az olyan kritikákat, hogy egy-egy szubsztrát esetében egy eddig nem ismert más anyagcsereút alakítja át így a molekulát. Mivel a fenti jelenségeket glutamát acetát és propionát oxidációja vizsgálatával is megerősítettük, így kizárható, hogy minden esetben új anyagcsere út eredményezte az aszimmetrikus jelölést malátban és a belőle származó intermedierekben.

**Molekuláris orientációt megőrző szubsztrát transfer emlősökben.** Az élesztő sejteken megfigyelt orientációt megőrző szubsztrát transzfer igen nagy mértékben hozzájárult az élő sejtekben történő szupramolekuláris szerveződések megismeréséhez. Azonban fontos lenne igazolni azt, hogy a fenti jelenség emlős sejten is létezik. Hasonló kísérleti elrendezésben vizsgáltuk [3- $^{13}\text{C}$ ]propionát oxidációját izolált hepatocitákon, mint élesztő sejteken, és hasonlóképpen aszimmetrikus jelölést találtunk a malátból képződött intermedierben (aszpartát, alanin és laktát), jelezve a két rendszer hasonlóságát. A fenti kísérletet megismételtük máj perfúziós rendszeren, ahol szintén az orientációt megőrző szubsztráttranszferre nyertünk bizonyítékokat. A fenti vizsgálatokat elvégeztük [1,2,3- $^{13}\text{C}$ ]propionáttal is, amelyben a  $^{13}\text{C}$  szén atomok egymás mellett vannak, és így szén-szén csatolás lép fel, ami igen érdekes isotopomer analízist tesz lehetővé  $^{13}\text{C}$ -NMR-rel. Jelentős mennyiségű  $^{13}\text{C}$  atom kerül citrátba, laktátba és glükózba, amely anyagok  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumának analíziséből egyértelműen igazolható az orientációt megőrző szubsztrát átadás, mind hepatocitákon, mind

intakt májszövetben a perfúzió körülményei között [24]. Továbbá kizárható volt a propionát direkt laktáttá történő átalakulása, amely zavarhatta volna az egy atomon megjelölt propionát oxidációs adatok értelmezését.

Mivel jelentős  $^{13}\text{C}$  jelölést találtunk glükózban, ami kizárólag májban képződik és kikerül a keringésbe, ezért a fenti analízis elvégezhető élő állatokon. Így lehetőség lenne a májanyagcsere pontos analizisére vérből származó mintákon abban az esetben, ha az állatoknak  $[1,2,3-^{13}\text{C}]$ propionát infúziót adunk. A glükóz  $^{13}\text{C}$  izotopomerjeinek analizise természetesen felvilágosítást adna mitokondriális anyagcsere és a glükoneogenezis rendellenességeire is. Hasonló analízist végeztünk patkány szív perfúziójával is, amikor a fentiekhez hasonlóan tudtuk igazolni a szívszövetben meglévő orientációt megőrző szubsztrát transzfer[24].

**Mitokondriális mutációk pleiotropikus következmények.** A mitokondriális élesztő mutánsok vizsgálata jelezte, hogy egy adott gén diszruptiója lényegesen komplexebb problémát okoz, mint az várható lenne egy adott enzimaktivitás kieséséből [21,25]. Ez a probléma nem csak akkor jelenik meg, ha egy mátrix enzim génjét szakítjuk meg, de akkor is ha a mitokondriális DNS (mtDNS) által kódolt gének sérülnek - a mtDNS 13 polipeptid láncot kódol, amelyek mindegyike valamelyik respirációs komplex komponense. A respirációs komplexek sérülése destabilizálhat fontos anyagcsereutakban szerepet játszó enzimet, illetve abnormalis strukturális változásokat okozhat a mitokondrium belsőmembránnal határolt kompartmentjében [26], így az adott sejt működését nem csak a csökkent oxidatív kapacitás, de ezt egyéb anyagcsereutak abnormalitása is nehezítheti. A fenti jelenség megfigyelhető nem csak élesztő mutánsokon [21-25], de genetikusan myopathiássá és cardiomyopathiássá tett patkányokon is [27], így a fenti kölcsönhatások szerepet játszhatnak a myopathiák és cardiomyopathiák patogenezisében.

A mtDNS igen sérülékeny, mivel a mitokondrium nem rendelkezik DNS "repair" rendszerrel. Így egyre nagyobb számban ismertek olyan körülmények, amelyek a mitokondriális genom sérülését eredményezik: számos antivirális gyógyszer, magas életkor, ischemia, diabétesz és számos egyéb betegség (Lásd. alább Melegh B.). Ezért a mitokondrium anyagcsere-útjainak szerveződése, és ezek kapcsolata a respirációs komplexekkel nem csak az alap kutatás szempontjából érdekes terület, de mitokondriális betegségek egyre növekvő köre a fenti területnek klinikai jelentőséget is ad.

### **Irodalmi hivatkozások**

1. Srere, P.A. (1987) *Annu.Rev.Biochem.* 56, 89-124.
2. Srere, P.A. & Sumegi, B. (1986) in *Myocardial And Skeletal Muscle Bioenergetics* (Brautbar, N., Ed.) pp.13-25, Plenum Press, New York.
3. Beeckmans, S., & Kanarek, L. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 427-435.
4. Fahien, L.A., & Smith, S.E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2696-2703.

5. Porpaczy, Z., Sumegi, B., & Alkonyi, I. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 749, 172-179.
6. Sumegi, B., & Alkonyi, I. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 749, 163-171.
7. Sumegi, B., & Srere, P. A. (1984a) *J. Biol. Chem.* 259, 15040-15045.
8. Sumegi, B., Gyocsi, L., & Alkonyi, I. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 616, 158-168.
9. Tompa, P., Batke, J., Ovadi, J., Welch, G.R., & Srere, P.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6089-.
10. Sumegi, B., Porpaczy, Z., & Alkonyi, I. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1080, 121-128.
11. Kerner, J., & Bieber, L. (1990) *Biochemistry* 29, 4326-4334.
12. Sumegi, B., Gilber, H.F., & Srere, P.A. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 188-190.
13. Porpaczy, Z., Sumegi, B., & Alkonyi, I. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9509-9514.
14. Wit-Peeters, E.M., Scholte, H.R., Van Den Akker, F., & DeNie, I. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 231, 23-31.
15. Kispal, G., Sumegi, B., & Alkonyi, I. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14209-14213.
16. Sumegi, B., & Srere, P.A. (1984b) *J. Biol. Chem.* 259, 8748-8752.
17. D'Souza, S.F., & Srere, P.A. (1983b) *J. Biol. Chem.* 258, 4706-4709.
18. Kispal, G., Sumegi, B., & Alkonyi, I. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14209-14213.
19. Robinson, J.B., Jr., Inman, L., Sumegi, B., & Srere, P.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1786-1790.
20. Sumegi, B., McCammon, M.T., Sherry, A.D., Keys, D.A., McAlister-Henn, L., & Srere, P.A. (1992) *Biochemistry*. 31, 8720-8725.
21. Kispal, G., Evans, C.T., Malloy, C., & Srere, P.A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11204-11210.
22. Sumegi, B., Sherry, A.D., & Malloy, C.R. (1990) *Biochemistry*. 29, 9106-9110.
23. Sumegi, B., Sherry, A.D., Malloy, C.R. & Srere, P.A. (1993) *Biochemistry*, 32, 12725-12729.
24. Sherry, A.D., Sumegi, B., Miller, B., Cottam, G.L., Gavva, S., Jones, J.G., & Malloy C.R., (1994) *Biochemistry*, 33, 6268-6275.
25. Kispal, G., Sumegi, B., Dietmayer, K., Bock, I., Gajdos, G., Tomcsanyi, T., & Sandor, A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1824-1829.
26. Sumegi, B., Freeman, D.A., Inman, L., & Srere, P.A. (1988) *J. Molec. Recog.* 1, 19-24.
27. Sumegi, B., Toth, K., Nemeti, B., Trombitas, K., Habon, T., & Endrei, D. (1995) *Circulation Reserach (közlésre beterjesztve)*.

## A mitokondriális DNS a humán medicinában

Melegh Béla

*Pécsi Orvostudományi Egyetem, Gyermekgyógyászati Klinika*

A mitokondriumokat, mint önálló sejtorganellumokat 1890-ben írta le Altmann, Benda 1898-ban nevezte el az Altmann által leírt képleteket mitokondriumoknak. 1925-ben Wartburg és Negelen identifikálta az "Atmungsferment"-et, a légzőenzimet, 1937-ben Krebs a citrát kör valamennyi enzimátikus lépését leírta. 1950-ben Lehninger a citrát kört és a zsírsavak  $\beta$ -oxidációját a mitokondriumokba lokalizálta. 1958-ban McLean felfedezte, hogy a mitokondriumok önálló fehérje szintézisre képesek. 1961-ben megszületett Mitchell kemiozmotikus teóriája, 1963-ban Schatz felfedezte a mitokondriális DNS-t (mtDNS). 1981-ben Anderson Sangerrel szekvenálta a mtDNS-t (1). 1987-ben Wilson a mtDNS polimorfizmusát felhasználva megalkotta az ős Éva fogalmát (2). Ahogyan az látható, 90 év telt el a mitokondriumok kutatásának két mérföldköve, az organellum felfedezése és a mtDNS biológiai értelmezése között.

Miként a medicina számos egyéb területén is megfigyelhetjük, a molekuláris biológia módszereinek elterjedése hatalmas lökést és egyben új irányvonalat is adott a mitokondriumok pathogenezisben betöltött szerepének megismerésében. Mindezt érzékeltetendő - bár 1962-ben írta le Luft az első humán megbetegedést (3), ami mitokondriális eredetű volt - érthető, hogy az ezt követő években a klinikai mitokondrium kutatás is a klasszikus biokémia módszereinek felhasználására szorítkozott, miután ebben az időben még nem állt rendelkezésre a DNS analízisének lehetősége. Sorban kerültek leírásra azon folyamatok defektusai, melyek a mitokondriumokba lokalizálódnak. Miután ebben az időben csupán a klasszikus biokémiai módszerek álltak rendelkezésre, a kórismézés is ezekkel történt, mint pl. aktivitás mérés.

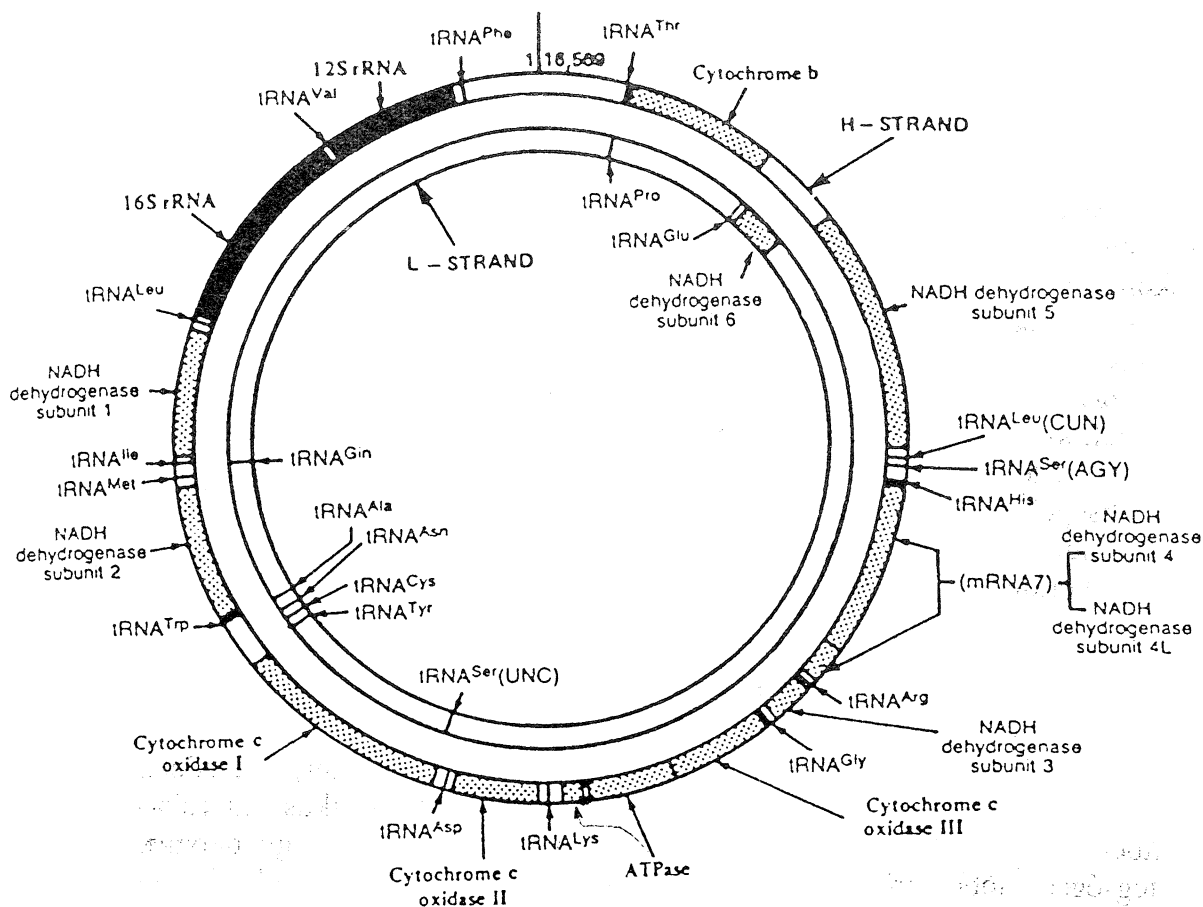
Valójában, a mitokondriumok szerepének kutatása a humán pathogenezisben a 80-as évek után vett hatalmas lendületet, amikor is a mtDNS szekvenciája ismert lett, és a molekuláris biológiai módszerek is szélesebb körben terjedve valamint technikailag folyamatosan finomodva alapot teremtettek a molekuláris biológiai analízisre. Értelemszerűen egyben irányvonal- és szemléletváltás is bekövetkezett a klinikai mitokondrium kutatásban. Számszerű adattal érzékeltetve a mtDNS éves citációja (ISI) az elmúlt pár évben ezres nagyságrendbe került.

### A mitokondriális genom szerkezete

A mitokondriumok intaktsága, a sokrétű metabolikus funkcióból eredően, elengedhetetlen a sejtek egészséges működéséhez. Ez a metabolikus sokrétűség nem olcsó a sejteknek. Hozzávetőlegesen egy sejt  $10^4$  különböző típusú fehérjét tartalmaz, ebből  $10^3$  típus a mitokondriumokra lokalizálódik. Más szavakkal: a sejt fehérjefajtáinak 10 %-a a mitokondriumokban van. E fehérjék nagyobbik hányada nukleáris kódoltságú, kisebbik mitokondriális DNS eredetű.

A mitokondriumok valóban egyedülállóak az emlős sejt-organellumok között, mivel önálló genetikai információt tartalmaznak, saját DNS-sel rendelkeznek. A nukleáris genom  $3 \times 10^9$  bázispár nagyságú információkészletével szemben az egyetlen cirkuláris mitokondriális DNS 16 595 bázispár nagyságú (1).

1. sz. ábra. A mitokondriális DNS sematikus szerkezete. A sematikus ábra az Anderson (1) által elsőként közölt szekvenciára épül, amit gyakran neveznek a leírás helye alapján "Cambridge sequence"-nek.





### *A mitokondriális DNS szerkezete, kódolása*

A mtDNS szemben a nukleáris genommal, rendkívül ekonomikus, alig tartalmaz át nem íródó intronszekvenciákat (1. sz. ábra). A cirkuláris mtDNS láncait szokás molekulasúlyuk alapján nehéz (H-chain) és könnyű (L-chain) láncokra osztani, megegyezés szerint az ábrázolások során utóbbi kerül belülre. A kódoló szekvenciák döntő többsége a nehéz láncon helyezkedik el.

A mDNS kódolja a kicsi (12S) és a nagy (16S) riboszómális RNS-t, valamint 22 transzfer RNS-t, melyek az intramitokondriális fehérjeszintézishez szükségesek. Kódolja a légzési lánc, ill. az oxidatív foszforiláció 13 fehérjéjét.

A komplex I több, mint negyven peptidből épül fel, ebből hét a mtDNS-ben kódolt (a 2, 3, 4, 4L, 5, és 6-os alegység, NADH dehidrogenázok). A komplex II négy nukleáris kódolású fehérjéből, a komplex III 11 polipeptidből áll, ebből egy, a mitokondriális citokróm b redukáz mtDNS kódolású. A komplex IV 13 fehérjeláncból épül fel, három, a citokróm c oxidáz I, II és III mtDNS kódolású. A komplex V legalább 13 proteínláncból áll, kettő, a mitokondriális ATP-áz 6-os és 8-as alegységét, az mtDNS kódolja, a kettő között a génen rövid intron helyezkedik el.

### *A mitokondriális DNS sajátosságai*

Míg a szomatikus sejtekben a nukleáris genom standard számú kromoszómába tömörülve található meg, a mtDNS száma sejtenként változékony. Egy mitokondrium 5-20 cirkuláris DNS-t tartalmaz, és egy sejt százas nagyságrendben tartalmaz mitokondriumot, így a mtDNS sejtenkénti kópiaszáma ezres nagyságrendben mozog. Míg a nukleáris genom mindkét szülőegyedtől kvázi egyenlő arányban öröklődik és öröklése követi a Mendeli szabályokat, addig a mtDNS kizárólag maternális eredetű, a megtermékenyítéskor a spermatoцитák nem tartalmaznak mtDNS-t. Bizonyos különbségek léteznek a genetikai szótár értelmezésében is (pl. a mitokondriális kromoszómán az UAG=triptofán, AGA és AGG stop kódon, AUA=metionin).

### *A mitokondriális DNS mutációi*

Ahogy már említettük, a mtDNS örökléstanilag anyai eredetű. Összességében, a mtDNS mutációja bekövetkezhet szomatikus- és csírasejtben (oocytákban). Előbbi az adott egyedre nézve okoz vagy okozhat betegséget, utóbbi öröklődik a következő generáció(k)ra és meghatározza egyben a fenotípust ill. a polimorfizmust avagy a betegség tüneteket is (4).

Általánosságban, a mtDNS mutációgyakorisága nagyságrenddel (legkevesebb 10x) nagyobb, mint a nukleáris genomé (4,5,6). Ezt magyarázza a hisztonok védőburkának a hiánya, az oxidatív foszforiláció során képződő szabad oxigén gyökök nagyobb arányú jelenléte, és a "repair" mechanizmusok hiánya (5). A mutációk a mtDNS bármely szakaszán előfordulhatnak, pontmutációra nézve nincs predisponált vagy fokozottan érintett génszakasz.

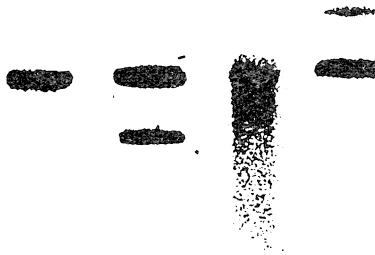
A mutációk a mtDNS-ben a normális élet során is akumulálódnak látszanak, az öregedés során az agyban, elsősorban a bazális ganglionokban és a corticalis régiókban halmozódnak (7,8).

A szövetek vulnerabilitása különbözik egymástól mtDNS mutációelőfordulás tekintetében. Leggyakrabban érintett - csökkenő gyakoriságsorrendben - a központi idegrendszer (ezen belül is a nagyagy), a harántcsíkt izomzat, a szívizom, a vérképző szervek, a vese és ritkán a máj (5).

Amikor a mtDNS mutációja megtörténik, az egészséges és a mutáns alakok egy sajátos polimorf keveréke jön létre a sejteken belül, amit *heteroplasmianak* vagy szinonimaként *pleioplasmianak* nevez az irodalom. Szomatikus sejtosztódás után a leánysejtekben érdekes módon a mutáns és az egészséges alakok nem egészen random módon oszlanak meg, az egymást követő generációkban egyre inkább elkülönülnek azok a sejtek, melyekben csak, vagy döntő többségben mutáns, és más sejtek, melyekben főleg egészséges alakok dominálnak. Utóbbit *homoplasmia* néven jelölik. El lehet képzelni, amit egyébként a gyakorlati élet is bizonyít, hogy milyen tárka képet képez sejtről-sejtre a fennálló heteroplasmia és a vele együtt létező és folyamatosan alakuló homoplasmia. Az egyes sejtek egyedi sajátosságainak eredője együttesen határozza meg az adott szövettípus biokémiai arculatát (a szintetizált fehérjék aktivitását) és a következményes funkcióbeli sajátosságait. Továbbmelve, miután a heteroplasmia folyamatosan változik a sejtélet során, egy konkrét egyedre vonatkozólag változik betegség esetén a klinikai kép, ill. a manifesztációs tünetegyüttes.

A mtDNS mutációi a következők lehetnek: 1., pontmutáció, 2., deléció, 3., duplikáció. A gyakorlatban az első biztosan csak szekvenálással igazolható (szerencsés esetben restriktációs hely kiesés esetén Southern blotolással is). Utóbbiak megléte Southern blotolással igazolható, pontos lokalizációra a szekvenálás ad lehetőséget. Deléciót és duplicatiót szemléltet a 2. sz. ábra. A gyakorlatban az össz szöveti DNS-t olyan enzimmel célszerű emészteni, amelyiknek egy felismerési és hasítási helye van a mtDNS-en (mint *Pvu II* vagy *BamH I*). A próba (laboratóriumunkban humán placentából izolált mtDNS-t használunk) hibridizálása során normális esetben egy 16 Kb nagyságú bandet kapunk. Deléció esetén a normális mellett egy (single deléción) vagy több (multiple delécións) további band is megjelenik. Lehetséges a kettő kombinációja is, az egyik szervben lehet egyszeri, a másikban összetett mutáció ugyanabban az egyedben is (9). Duplicatio esetében, ami a gyakorlatban csak egy további mutáns DNS lánc megjelenésével jár, tehát "single", azaz egyszeri, egy további, 16 Kb-nál nagyobb fragment jelenik meg (2. sz. ábra).

2. sz ábra. *Pvu II* emésztett mtDNS Southern blotja. Próbaként szintén *Pvu II* emésztett, humán placentából izolált mtDNS-t használtunk. Balról az 1. sávban: normális mtDNS; 2. sáv: "single deléció", a normális mellett egy további band jelenik meg; 3. sáv: "multiple deléció", a normális 16 Kb nagyságú mtDNS mellett további, a megszámlálhatatlanságig egybemosódott deletált alakok jelentek meg; 4. sáv: mtDNS duplicatio. Valamennyi minta myopathiában ill. cardio-myopathiában szenvedő gyermekek izmából származik.



Sejtszinten nehéz megmondani azt, hogy a mutáns alakoknak mennyire kell felszaporodniuk ahhoz, hogy az betegségi tünetben manifesztálódjanak. Ez az arány feltételezhetően változik annak függvényében is, hogy az érintett génszakasz minek a kódolásáért felelős. Feltételezhető, hogy minden fehérjére létezik egy küszöb, aminek elvesztése még jól tolerálható. Talán meglepő, hogy ez bizonyos esetekben milyen magas szám. Így, *MTTK-MERRF8344A* és *MTTLMELAS3243C* (a rövidítés értelmezése a következő: dőlt betűvel az érintett gén, az első esetben az alanin mitokondriális tRNS-e egy betűs kóddal, mellette az okozott betegség, mint MERRF= myoclonusos epilepszia, ragged red fibers, a mutáció pozíciója a mtDNS-en, végül a mutáns bázis) bizonyos eseteiben a sejtek légzési kapacitása normális marad, míg a mutáns mtDNS-ek számára 90%. Ezt követően gyors csökkenés következik be, és a sejtlégzés nullára esik, amint a mutáns alakok száma eléri a 95%-ot (10,11).

### *A mitokondriális betegségek összetett arculata*

Ahogy az a fentiekben már említésre került, egyfajta szerv-vulnerabilitás létezik a mitokondriális betegségek terén akár a mtDNS mutációja, akár a nukleáris kódolású mitokondriális fehérje érintett, ami gyakorlati tapasztalatok alapján valóban létezik. Ugyanakkor az is nyilvánvaló a korábbiak alapján, hogy mtDNS érintettség esetén bármelyik szerv érintett lehet, és függően az adott szervben meglévő homoplazmiától vagy heteroplazmiától más és más lehet az adott szerv aktuális metabolikus állapota ill. funkciója. Ennek megfelelően a mtDNS betegségeiben ill. a mitokondrium nukleáris eredetű bántalma során is meglehetősen széles spektrumú klinikai megjelenés fordulhat elő (lásd táblázat) ami változhat, általában rosszabbodhat az egyed élete során.

Sok esetben nehéz, vagy ma akár még lehetetlen egy betegség vagy tünetegyüttes esetén az elkülönítés genuin nukleáris vagy mtDNS okozta formákra. Többen leírtak olyan mtDNS delécióval járó betegséget, amelyik a Mendeli szabályokat követve öröklődött (12). Ezekben az esetekben a maternálisan örökölt mtDNS átörökítése során normális lehetett, a mtDNS replikációját szabályozó nukleáris gének azonban betegek lehettek, és következményesen a hibásan vezérelt replikáció során jöttek létre a hibás információtartalmú mutáns alakok.

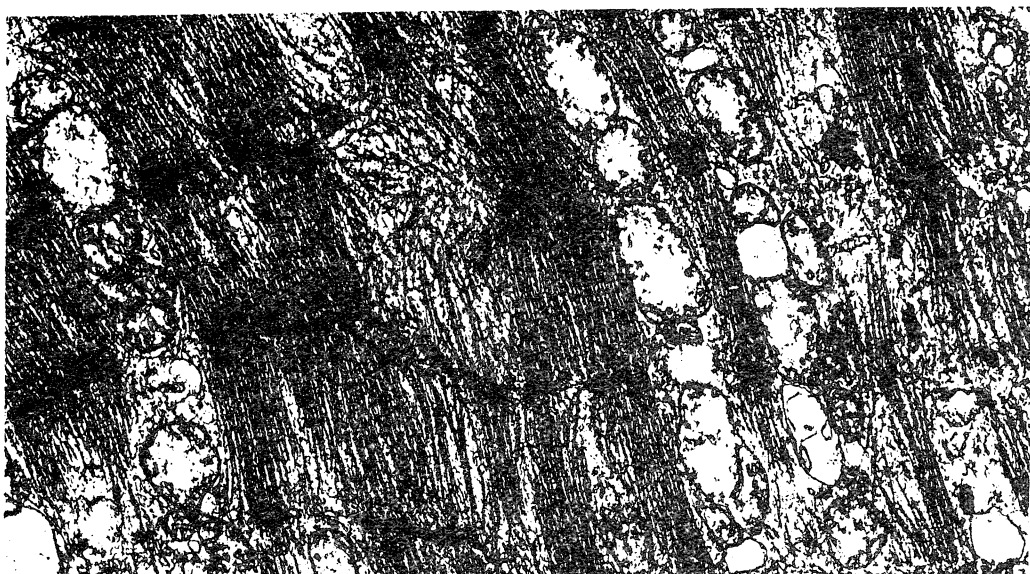
#### A klinikai prezentációs tünetek spektruma mitokondriális betegségekből (Munnich után módosítva, ref. 13)

- metabolikus: acidózis, ketoacidotikus kóma
- májkáma
- csontvelő: pancytopenia, makrocytás anaemia
- szív: cardiomyopathia
- izom: izomgyengeség, myopathia
- központi idegrendszer változó érintettsége
- pankreas dysfunctio
- béltraktus: felszívódási zavarok
- vese: tubulopathia
- szem: Leber betegség
- endokrin rendszer: diabetes, törpenövés, hypoparathyreoidizmus
- malformációk

Számos esetben a mitokondriumokat érintő genetikai bántalom olyan súlyos lehet, legyen az nukleáris vagy mtDNS laesio, hogy a mitokondriumok súlyosan destruálódnak. Erre példaként szolgálhat a 3. sz.

ábra, ahol egy mtDNS deléció állt a betegség hátterében. Láthatóan a mitokondriumok súlyosan károsodtak, a krisztastruktúra helyenként eltűnt. Vannak esetek, ahol a mitokondriumok károsodása az izomszerkezet súlyos destruálódásával is társul (14).

3. sz. ábra. mtDNS delécióban szenvedő gyermek harántcsíkolt izmának elektronmikroszkópos képe.



Vannak betegségek, melyekben egyértelmű, hogy a mtDNS károsodása a primer. Ilyen a Leber féle ophtalmoneuroplegia, elfogadott rövidítése LHON, a korábbi nomenklaturát használva ez a mtDNS-t több ponton érintheti, mint 15257A, 13708A, 11778A, 3394C, 7444C és a 4160C pozíciókban. A MELAS (mitokondriális encephalopathia, laktát acidózis szindróma) lehet deléció és pontmutáció (3243C) következménye. A MERRF (myoclonusos epilepszia, ragged red fibers) szintén lehet mtDNS deléció, de lehet pontmutáció is (8344A). Több betegségnek nincs hasonlóképpen elfogadott neve, gyakorlatilag számos myopathia ill. encephalomyopathia vagy cardiomyopathia lehet a klinikai manifesztáció. Az utóbbi időkben vált világossá, hogy Alzheimer betegségben vagy Parkinson kór bizonyos eseteiben is involvált lehet a mtDNS.

Végezetül, nyilván az olvasóban felmerül a kérdés az esetleges terápiás lehetőségekkel kapcsolatban. Sajnos, napjainkban erre még nincs mód, ha belegondolunk, számos mtDNS betegséggel kapcsolatban csak próbálkozások vannak, és sajnos az esetek nagy hányadában a kimenetel fatális. Számos szerző menadiontól látott kedvező hatást, mások karnitin szupplementációt javasolnak. Utóbbi szintézise emberben normálisan is limitált lehet (15-20), hiányakor gátolt a zsírsavak oxidációja.

**Irodalmi hivatkozások**

- 1., Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. Nature 1981;290:457-465.
- 2., Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Nature 1987;325:31-36.
- 3., Luft R, Ikkos D, Palmieri G et al. J Clin Invest 1962;41:1776-1784.
- 4., Wallace DC. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:8739-8746.
- 5., Wallace DC. Annu Rev Biochem 1992;61:1175-1212.
- 6., Wallace DC. Science 1992;61:1175-1212.
- 7., Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT et al. Nat Genet 1992;2:324-329.
- 8., Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. Nat Genet 1992;2:318-323.
- 9., Melegh B, Seress L, Sümegi B. et al. Pediatr Res (submitted).
- 10., Chomyn A, Meola G, Bresolin N et al. Mol Cell Biol 1991;11:2236-2244.
- 11., Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4221-4225.
- 12., Zeviani M. J Inher Metab Dis 1992;15:456-471.
- 13., Munnich A, Rustin P, Rötig A. et al. J Inher Metab Dis 1992;15:448-455.
- 14., Sümegi B, Melegh B, Adamovich K, Trombitás K. Clin Chim Acta 1990;192:9-18.
- 15., Melegh B, Sümegi B, Sherry AD. Xenobiotica 1993;23:1255-1261.
- 16., Melegh B, Pap M, Bock I, Rebouche CJ Pediatr Res 1993;34:460-464.
- 17., Melegh B, Pap M, Morava E. et al. J Pediatr 1994;125:317-321.

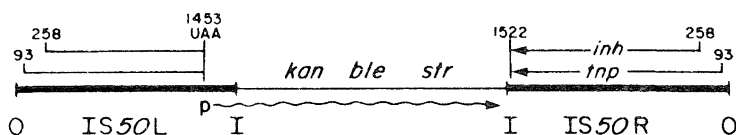
## Egy eszköz a baktériumok molekuláris genetikájában: a Tn5 transzpozon

Tomcsányi Tihamér

JPTE Állattani Tanszék Genetikai Csoport, Pécs

### A Tn5 szerkezete

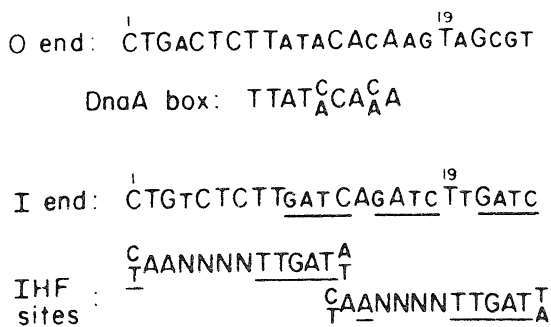
A transzpozonok vagy transzpozábilis elemek specializált DNS szegmentumok, amelyek képesek elmozdulni a genomban kiterjedt szekvencia homológia nélkül. Megtalálhatók mind prokariótákban, mind eukariótákban és transzpozíciójuk inszerciós mutációt valamint génátrendeződést okozhat, ezenkívül megváltoztathatják a transzpozíciós hely közelében lévő gének expresszióját is (1). A Tn5 az egyike a legintenzívebben vizsgált és a molekuláris genetikai vizsgálatokban gyakran használt bakteriális transzpozonoknak. Felfedezése az 1970-es évek közepén, hasonlóan más rezisztencia géneket hordozó transzpozonokéhoz, egy kissé véletlenszerű volt. Berg és munkatársai (2) specializált kanamicin rezisztens ( $Kan^r$ )  $\lambda$  fágot akartak izolálni *Klebsiella pneumoniae*-ből származó R-faktort tartalmazó *Escherichia coli* fertőzésével. A nyert  $Kan^r$   $\lambda$  fág DNS-e azonban a restriktions térkép alapján a várttól eltérő volt. Az elektronmikroszkópos analízis azt mutatta, hogy a  $\lambda/\lambda$   $Kan^r$  heteroduplexek egy 1,5 kilobázis (kb) nyél és egy 2,8 kb hurok struktúrát tartalmaznak, jelezvén azt, hogy a  $Kan^r$  inzert két 1,5 kb fordított ismétlődéssel közrefogott 2,8 kb egyedi szekvenciából épül fel.



1. ábra. A Tn5 bakteriális transzpozon szerkezete. Vastag vonal: az 1533 bp IS50 inszerciós szekvenciák, amelyek fordított ismétlődésként vannak jelen a transzpozonban. O (outside), I (inside) vége az IS50 inszerciós szekvenciáknak. p: a központi rezisztencia gének promótere. kan: kanamicin rezisztencia, ble: bleomicin rezisztencia, str: sztreptomycin rezisztencia. 93 és 259: a transzpozáz és az inhibitor translációjának kezdete az O végtől számítva, 1453: stop kódon az IS50L-ben, 1522: a transzpozáz és az inhibitor translációjának vége.

A Tn5 egy 5,8 kb hosszú összetett transzpozon, amelynek fordított ismétlődései az 1533 bázispárból álló IS50 inszerciós szekvenciák (1. ábra). Mind a Tn5, mind az IS50 elemek konzervatív mechanizmussal transzponálódnak, azaz egyszerű inszercióval a cél (target) DNS szekvenciába. A transzpozíció a legtöbb esetben a transzpozont hordozó

DNS molekulából a cél DNS molekulába történik meg (intermolekuláris transzpozíció), bár kisebb frekvenciával egy DNS molekulán belül is végbemehet (intramolekuláris transzpozíció). Ez úgy jön létre, hogy a target DNS-ben egy lépcsős hasítás történik, majd a transzpozon bekapcsolódása után az egyes szálakon keletkezett rés kipótlódik. Az IS50R kódolja a cisz helyzetben ható transzpozáz, amely szükséges mind a Tn5, mind az IS50 transzpozíciójához és a transz helyzetben ható inhibitort, amely a transzpozíció regulációjában játszik szerepet. A transzpozáz gazda faktorokkal együtt, amelyek pontos száma és funkciója jelenleg még nem ismert, az IS50 mindkét végén található 19 bázispárból (bp) álló szekvenciákra hat, amelyeket O (outside) és I (inside) szekvenciának vagy végnek neveznek (2.ábra).



2. ábra. Az IS50 O és I végének, valamint a DnaA és az IHF (integration host factor) fehérjék konszenzus kötési szekvenciái. Deléciós vizsgálatok igazolták, hogy mindkét végnek csak az első 19 nukleotidja szükséges a transzpozícióhoz. Aláhúzással jelöltük a Dam metilációs helyeket (GATC) és az IHF konszenzus szekvenciában az I véggel megegyező helyeket.

Az IS50L-ben közel az I véghez egy ochre mutáció van, így csak ochre szupresszálo baktérium törzsekben képződnek róla funkcióképes fehérjék. Transzpozáz jelenlétében egy pár vég bármely variációban (O-O, O-I, I-I), ha azok korrekt orientációban vannak, képes véghezvinni bármilyen közéjük helyezett DNS darab transzpozícióját. A két vég szekvenciája eltérő, az első 9 bp-ból 8 megegyezik, a második 10 között azonban csak 4 egyezés található. Az O végben egy DnaA fehérje kötő konszenzus szekvencia, míg az I végben két adenin (Dam) metilációs hely (GATC) van. A transzpozon központi része három együttesen átírózó rezisztencia gént (kanamicin, bleomicin, sztreptomycin) tartalmaz. Az utóbbi *E. coliban* nem fejeződik ki. A központi rész nem játszik szerepet a transzpozícióban (3).

## A transzpozíció szabályozása

A prokarióta transzpozázibilis elemek egyik alapvető tulajdonsága, hogy kis frekvenciával transzponálódnak. Ez a kis transzpozíciós gyakoriság egyensúlyként alakult ki a transzpozon átvitele és a gazdaszervezet túlélése között. A transzpozonok elegáns mechanizmust "fejlesztettek" ki, hogy limitálják saját transzpozíciós frekvenciájukat és ezek a

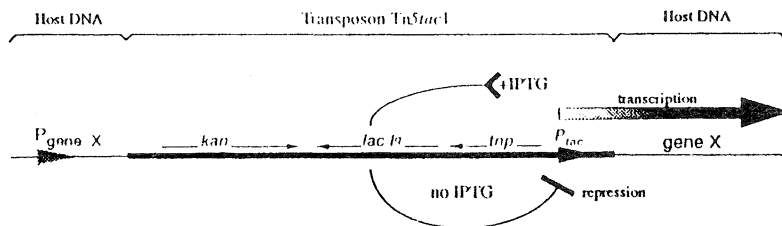


mechanizmusok képesek voltak integrálódni a gazdaszervezet szabályozó rendszereibe. A transzpozíció gyakoriságát szabályozó mechanizmusok két csoportba sorolhatók: a.) az elem által kódolt transzpozáz szintézisének limitálása, b.) magának a transzpozíciós folyamatnak a gátlása.

A Tn5 transzpozíciójának szabályozásában mindkét típus szerepet játszik. A transzpozáz promótere gyenge és dam metilációs kontrol alatt áll. A transzpozontól kívül eső promoterről induló transzkriptum nem transzlálódik, valószínűleg egy kialakuló másodlagos szerkezet miatt, amely megakadályozza a transzpozáz transzlációjának iniciációját. Az IS50 I vége a két metilációs hely következtében szintén metiláció-függő gátlás alatt van (4).

### A Tn5, mint eszköz a molekuláris genetikában

A vad típusú transzpozonnal és számos, a rekombináns DNS technológiával készített variánsával inszerciós mutációt lehetett előidézni Gram-negatív baktériumokban az *Acinetobacter calcoaceticus*tól a *Xantomonas campestris*ig, amelyeknek genetikája sokkal kevésbé ismert, mint az *E. coli*é vagy a *Salmonella typhimurium*é (5). Douglas Berg laboratóriumában az 1980-as évek végén kifejlesztettek egy Tn5 variánst, a Tn5*tac1*-et (6), amely különösen alkalmas genetikailag alig ismert baktériumok vizsgálatára, sőt az *E. coli*éra is, hiszen annak genetikai térképén még számos "fehér folt" található. A Tn5*tac1* tartalmazza az IS50 O és I végét, a transzpozícióhoz szükséges transzpozáz gént, a kanamicin antibiotikum rezisztencia gént, a lac represszor gént és egy kifelé irányuló erős promotert ( $P_{lac}$ ), amely a lac represszor szabályozása alatt áll. Ha az inszerció egy gén promotér régiójába történik, a transzpozon megszakítja a gént, megakadályozza annak normális transzkripcióját. Induktor jelenléte nélkül a lac promotér gátolt állapotban van. Induktor, izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktózid (IPTG) jelenlétében a lac promotér felszabadul a gátlás alól és a transzpozon megfelelő orientációja esetén a lac promoterről megindulhat a gén átírása (3. ábra).

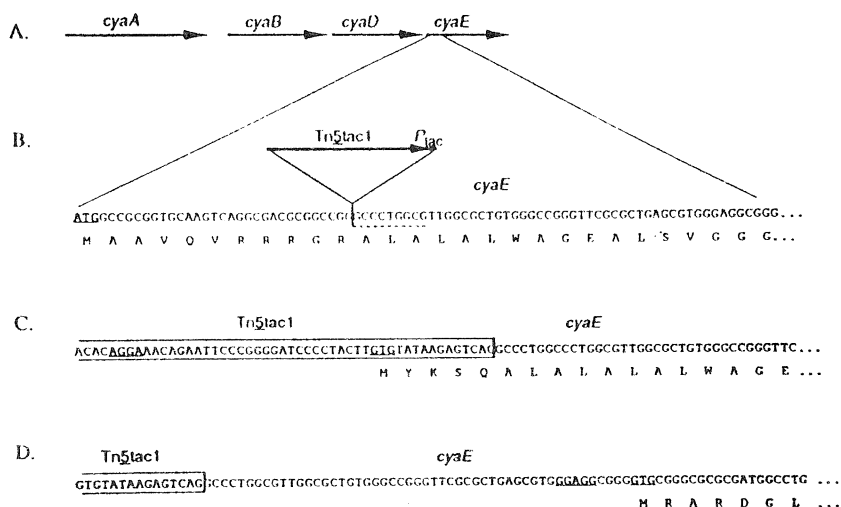


3. ábra. A Tn5*tac1* által okozott kondicionális fenotípus.

A transzpozon mindkét végéhez oligonukleotid primert lehet szintetizálni, így didezoxi módszerrel megszekvenálható az a DNS szakasz, ahová a transzpozon beépült. A Tn5*tac1* felhasználhatóságát a baktériumok genetikai kutatásában két példával szeretném röviden bemutatni.

A *Bordetella pertussis*nak, a szármárványos kórokozójának egyik fehérjeje a CyaA, egy bifunkcionális fehérje, amely mind hemolitikus, mind adenil-cikláz aktivitással rendelkezik (ciklolizin), jelentős szerepet játszik a baktérium patogenitásban. A *cyaA* egy

operon egyik génje, amelynek aktivitásához és termékének szekréciójához három másik struktúrgén a *cyaBD* és *E* működése szükséges (7). Konjugációs "suicide" vektor alkalmazásával olyan *Tn5tac1* inszerciós mutánst izoláltunk, amelynek sem hemolitikus, sem adenil-cikláz aktivitása nem volt, de IPTG indukcióval mindkét aktivitást vissza lehetett állítani a vad típus szintjére. Egy kromozómális DNS szegmentumot, amely a teljes transzpozont és hozzá kapcsolódó *B. pertussis* DNS szakaszokat tartalmazott a kanamicin rezisztencia alapján klónoztunk és meghatároztuk ezen szakaszok szekvenciáját (8). A szekvencia analízise azt mutatta, hogy az inszerció a *cyaE* gén 5' végébe történt és a transzpozon orientációja olyan volt, hogy IPTG jelenlétében irányította a gén átírását (4. ábra).



4. ábra. A *Tn5tac1* inszerció helye a *B. pertussis* BC63 törzs ciklolizin operonjában. A: a *cya* operon szerkezete; B: a *Tn5tac1* inszerció; C és D: a transláció valószínű kezdőpontjai.

A kísérlettel bizonyítottuk, hogy a CyaE fehérje fontos szerepet játszik a ciklolizin aktiválásában, hiszen az operon első három génje zavartalanul átíródhat és transzlálódhat is, mégis a mutáns sejtek IPTG jelenléte nélkül csak minimális adenil-cikláz aktivitást mutattak. Mivel a *Tn5tac1* a *cyaE* gén 11. és 12. kódonja közé épült be, az indukált fehérje szintézise magáról a transzpozonról, pontosabban az mRNS transzpozon szekvenciát hordozó részéről, vagy a *cyaE* gén 29. kódonjától indulhat el. Bármelyik eset valósul is meg, biztos, hogy az első 11 aminosav nem szükséges a CyaE fehérje funkciójához.

*E. coli*ban *Tn5tac1* inszerciós mutagenézissel azonosítottunk egy, a cisztein bioszintézisben szerepet játszó eddig ismeretlen gént, a *cysQ*-t (9). Egy olyan mutánst izoláltunk, amely csak IPTG jelenlétében volt auxotróf, növekedéséhez minimál táptalajon ciszteint igényelt, de csak aerob feltételek mellett. Genetikai módszerekkel (Hfr konjugáció, P1 fág általános transzdukción,  $\lambda$  fág specializált transzdukción, komplementáció) meghatároztuk, hogy ez a cisztein bioszintézisben résztvevő gén az *E. coli* kromozóma térképén a 95,7 percnél található, távol minden eddig ismert cisztein bioszintetikus géntől.

Mind a *Tn5tacI* inszerció, mind az intakt gént klónoztuk és szekvenáltuk. Megállapítottuk, hogy a *cysQ* gén egy 246 aminosavból álló fehérjét kódol, a transzkripció iránya elmentés egy 3'-nukleotidáz aktivitású periplazmatikus enzimet kódoló géntől, a *cpdB*-től, és a két gén promóterének -35 régióját csak 17 bp választja el egymástól. A *Tn5tacI* inszerció, amely az IPTG indukálható *cys*<sup>-</sup> fenotípust előidézte a leolvasási kereten belül volt, csak két kódonra a gén 3' végétől. Mivel a *tac* promóter és a *cysQ* promótere egymással szemben helyezkedik el a gén működésének gátlása vagy az RNS polimerázok ütközésének vagy a *cysQ* mRNS és az antisense RNS kölcsönhatásának következménye lehet.

*E. coli*-ban a cisztein bioszintézis egyik intermedierje a 3'-foszfoadenozin 5'-foszfoszulfát (PAPS). Adataink alapján a CysQ fehérje a PAPS szintjének szabályozásában vehet részt, mert ennek magas szintje toxikus a sejt számára. A cisztein azért szükséges a *cysQ* mutáns számára, mert represszálja a cisztein bioszintézist, így a PAPS szintézisét is, és nem egy hiányzó cisztein bioszintetikus enzim hiányát pótolja.

A *Tn5* jelenlegi (5, 10) és a jövőben kifejleszthető variánsai várhatóan további szerepet fognak játszani a baktériumok molekuláris genetikai vizsgálatában.

#### Irodalmi hivatkozások

1. Berg, D.E. and M.M. Howe (ed.) 1989. Mobil DNA. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Berg, D.E., J. Davies, B. Allat, and J.-D. Rochaix 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3628-3632.
3. Berg, D.E. 1989. p. 185-210. In D.E. Berg and M.M. Howe (ed.) Mobil DNA. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Yin, J.C.P. and W.S. Reznikoff 1998. J. Bacteriol. 170, 3008-3015.
5. Berg, C.M., D.E. Berg and E. Groisman 1989. p. 879-925. In D.E. Berg and M.M. Howe (ed.) Mobil DNA. American Society for Microbiology, Washington D.C.
6. Chow, W.-Y. and D.E. Berg 1988. Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 6468-6472.
7. Glaser, P., H. Sakamoto, J. Bellalou, A. Ullmann and A. Danchin 1988. EMBO J. 7, 3997-4004
8. Cookson, B.T., T. Tomcsanyi, D.E. Berg and W.E. Goldman 1990. p. 243-250. In C.R. Manclark (ed.) Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis. Department of Health and Human Services, U.S Public Health Service, Bethesda, MD.
9. Neuwald, A.F., B.R. Krishnan, I. Brikun, S. Kulakauskas, K. Suziedelis, T. Tomcsanyi, T.S. Leyh and D.E. Berg 1992. J. Bacteriol. 174, 415- 425.
10. De Lorenzo, V., H. Haezzer, U. Jakubzik and K.M. Timmis 1990. J. Bacteriol. 172, 6568-6572.

## A citrát szintáz és citrát transzporter kooperációja: egy újabb példa az enzim-transzporter interakcióra

Sándor Attila,  
POTE, Biokémia Intézet  
Pécs

A fehérjék közötti interakcióra irányuló vizsgálatok szinte az összes anyagcsere út enzimeire kiterjednek. Ezen kutatások története és az eredmények alapos összefoglalása iránt érdeklődő olvasónak az 1. szám alatti Referenciát ajánljuk. Az interakcióban résztvevő fehérjék specifikusnak tekintett fizikai-kémiai erők révén egymáshoz kapcsolódva szorosabb-lazább komplexeket képeznek. E vonatkozásban különbséget kell tennünk a több rész-lépésből álló enzimreakciót katalizáló enzimek alegységei és az individuális enzimek által képzett komplexek között. Előbbi esetben (pl. piruvát dehidrogenáz enzim komplex) az alegységek közötti kapcsolat sokkal szorosabb ( $K_d 10^{-9}$  vagy nagyobb) mint az utóbbi esetben ( $K_d 10^{-6}$  vagy nagyobb). Jelen eszmefuttatás az utóbbi esettel, azaz önálló funkcióval felruházott önálló fehérjék közötti interakcióval foglalkozik.

**Az interakció értelme: interakció a funkcionális kapcsolatban lévő enzimek között.**

Az individuális enzimek közötti kapcsolat értelmét, célszerűségi megfontolásból, az adja meg, ha funkcionális kapcsolatban lévő enzimek, pl. a metabolizmusban egymást követő reakciókat katalizáló enzimek képeznek komplexet. Ilyen enzim-enzim interakciót mutattak ki az aminosav-anyagcserében (2, 3, 4), a glikolízisben (5, 6, 7) és citrátköri enzimek között (8, 9, 10). Az interakciók kimutatására szolgáló egyik fő módszer volt az együttes precipitáció poliethylenglicolt tartalmazó oldatból. A poliethylenglicol hozzáadásával annak vízelvonó képessége és innertem volt miatt a sejtenbelüli viszonyokat kívánták utánozni. Fiziológias körülmények között az enzim-enzim interakciókhoz legkedvezőbb hely a mitokondrium mátrixa, ahol a fehérjekoncentráció eléri az 50 %-ot és a szabad víz mennyisége a legalacsonyabb a sejt többi részéhez képest. A környező víznek pedig fontos szerep jut, hogy az enzim-enzim interakció a katalízis szempontjából előnyös lehessen a résztvevő enzimek számára. Ezt a kinetikai előnyt nevezzük nemzetközileg elfogadott angol szóval "channeling"-nek. Ez egy mondaton kifejezve azt jelenti, hogy az egyik enzim produktuma, mely a másik enzimnek szubsztrátja közvetlenül jut el a második enzimhez anélkül, hogy koncentrációja a környező vízben lévő koncentrációval kiegyenlítődne. Ehhez

szükséges a két fehérje közelsége az enzim-enzim interakció (valamint könnyen belátható módon a "kevés víz").

A mitokondriumban természetesen a membránban lévő integráns enzimek sem maradhatnak ki az enzim-enzim interakciókból. Kimutatták a matrix dehidrogenáz enzimek kötődését a belső membránhoz élesztőben (11) valamint a Complex I-hez (NADH-ubiquinon oxidoreduktáz) disznószívben. (12).

### **Transzporter és enzim közötti interakció.**

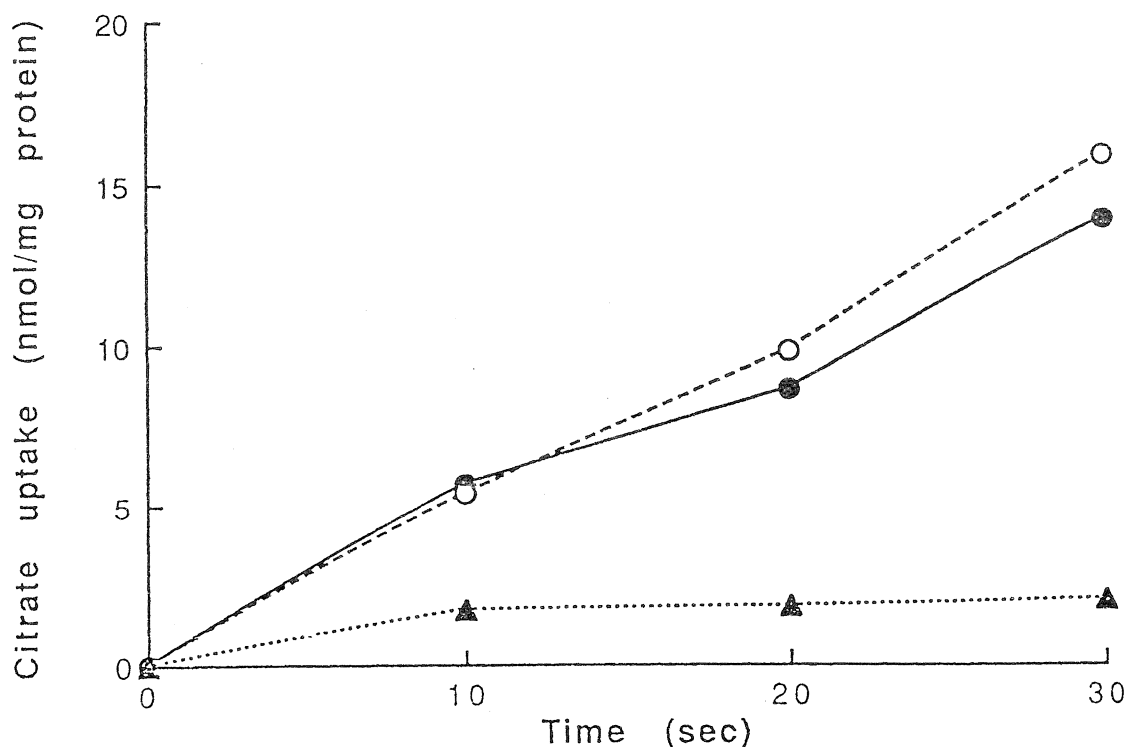
Mint az imént idézett példák mutatják a mitokondriális belső membrán is résztvesz az interakciókban. Gondolkodásunkban csupán egy kis ugrást igényel feltételezni, hogy a transzporter protein is interakcióba lép azzal az enzimmal mely az általa transzportált molekulát szubsztrátként használja. *A transzporter-enzim interakció egy viszonylag új területe a fehérje-fehérje asszociációra irányuló vizsgálatoknak.*

Bisson és Fraenkel a glukóz és fruktóz felvétel valamint a hexokináz és glukokináz közötti funkcionális kapcsolatot vizsgálták mutáns élesztőkön (13). A szülő élesztő törzsben (mutáció nélküli kontrol) mind a glukóz mind a fruktóz felvétele egy *nagy affinitásu* (alacsony  $K_m$ ) és egy *alacsony affinitásu* (magas  $K_m$ ) transzporter segítségével történik. A mutáns törzsben, melyben mind a kétfajta hexokináz hiányzik a fruktóz számára szűnik meg a nagy affinitásu felvétel, míg a glukóz felvétel változatlan. A tripla mutáns törzsben, ahol a két hexokinázon kívül a glukokináz is hiányzik, a glukóz felvétele is csak a kis affinitásu transzporterrel keresztül történik. Ugyanakkor egy olyan mutánsban, ahol a glukóz-6-P-ra ható, sorban következő enzim a foszfogluokoizomeráz hiányzik, a glukóz és fruktóz felvétele változatlan. Tehát a glukóz transzporter hiánytalan működéséhez szükséges, hogy a sejtben glukózt aktiváló kinázok is jelen legyenek. Ezen kinázok hiányában ugyanis a glukóz nem hasznosítható a sejtben, tehát transzportjának sincs értelme.

Raiman és munkatársai a citrullin szintézisét vizsgálták patkánymáj mitokondriumban (14). Tudvalevő, hogy a mitokondrium az *ornitin transzporter* segítségével veszi fel az ornitint; majd a matrixban azt az *ornitin transzkarbamiláz* enzim segítségével karbamilfoszfáttal kondenzálva citrullinná alakítja. A szerzők az ornitin direkt "*channeling*"-jét állapították meg a transzporter fehérje és a transzkarbamiláz enzim között. Jelölt ornitint használva azt találták, hogy a keletkezett citrullin specifikus aktivitása nem változott, ha a mitokondriumot előzőleg jelöletlen ornitinnal feltöltötték vagy nem töltötték fel. Tehát a transzporter által felvett radioaktív ornitin nem keveredett a matrixban lévő teljes ornitin "pool"-lal hanem direkt az ornitin transzkarbamiláz enzimhez kötődött.

## A citrát transzporter és citrát szintáz közötti interakció

Saját megállapításaink az élesztő mitokondrium membránjában lévő citrát és részben malát transzporterre vonatkoznak (15). A trikarboxilát transzporter a citrát egy-egy arányú cseréjét végzi citráttal vagy maláttal szemben. Ezen kívül megkülönböztetünk egy dikarboxilát transzportert is, mely malát-malát cseretranszportot végez. A vizsgálatok fő célja volt megállapítani, hogy a citrát transzporter működése függ-e a mitokondriális citrát szintáz (CS1) enzim jelenlététől. A kérdés eldöntésére a szülő törzs mellett mitokondriális citrát szintáz mutáns (CS1<sup>-</sup>) valamint kontrollként citoplazmatikus citrát szintáz mutáns (CS2<sup>-</sup>) és egyéb citrátköri enzimekre nézve, köztük a malát dehidrogenázra nézve mutáns (MDH1<sup>-</sup>) élesztőket használtunk. A mellékelt ábra (1. Ábra) mutatja, hogy a CS1<sup>-</sup> törzsben a citrát felvétel csaknem megszűnt, míg a CS2<sup>-</sup>-ben a felvétel azonos volt a szülő törzsével.



1. Ábra. Az [1,5-<sup>14</sup>C]citrát *benzoil-trikarboxilsav* (BTC) érzékeny felvétele élesztő mitokondriumokba. A mitokondriumok a PSY 142 szülő törzsből vagy annak CS1<sup>-</sup> vagy CS2<sup>-</sup> mutánsaiból származtak. A reakciót mitokondriumok hozzáadásával indítottuk és az adott időben 40 mM BTC-vel állítottuk le. A 0 percben a BTC-t a mitokondriumok előtt adtuk. Csak a BTC függő transzportot vettük figyelembe.  
 ● PSY 142 szülő      ▲ CS1<sup>-</sup>      ○ CS2<sup>-</sup>

A fenti megfigyelést a kifelé irányuló transzportra nézve is igazoltuk, amikor a mitokondriumokat előzőleg  $+5^{\circ}\text{C}$ -on  $[1,5-^{14}\text{C}]$  citráttal feltöltöttük és jelöletlen citrátot adtunk hozzá kívülről, mint cserepartnert. Hasonló összefüggést találtunk az MDH1 enzim és a malát transzport között. Érdekes módon a malát transzport a CS1<sup>-</sup> törzsben is teljesen megszűnt ami érthető, hisz a CS1 hiányában a malát mitokondriumba jutásának értelme is nagyon csekély. Egyéb citrátköri mutáns élesztő mitokondriumokban, köztük az MDH1<sup>-</sup>-ban a citrát transzport nem, vagy csak marginálisan változott.

Ezen kísérletek, valamint a Bisson-Fraenkel féle mutáns élesztőkön végzett kísérletek is (lásd feljebb), melyekben egy transzport megszűnik, felvetik a kérdést: vajon a transzporter fehérje jelen van és nem tud működni, vagy pedig egy retrográd kommunikációnak köszönhetően expressziója szűnt meg. A kérdés eldöntésére mitokondriumok extraktumát mesterséges membránba, liposzómákba építettük és hasonlítottuk össze a különféle extraktumot tartalmazó proteoliposzómák citrát transzportját (Táblázat).

*[1,5-<sup>14</sup>C]citrát és [U-<sup>14</sup>C]malát transzportja PSY 142 szülő élesztő törzs és ennek CS mutánsaiból származó mitokondriumok és a belőlük készült proteoliposzómák által.*

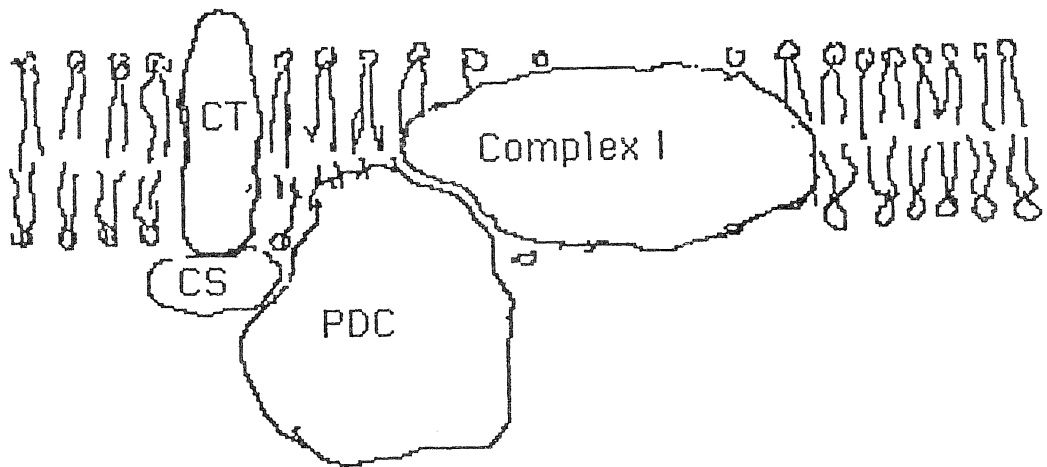
Élesztő	Mitokondrium		Liposzóma	
	nmol/mg. protein per perc		nmol/mg. protein per 5 perc	
	Citrate	Malate	Citrate	Malate
Szülő törzs	27.9	10.70	10.5	4.2
CS1 <sup>-</sup>	4.0	ND	12.5	3.9
CS2 <sup>-</sup>	31.8	9.1	9.4	5.2

A citrát transzport esetén BTC, a malát transzport esetén n-butylmalonát volt a stop inhibitor.

Mint a Táblázatból látjuk, a CS1<sup>-</sup> mitokondriumok ugyanolyan mennyiségben tartalmazzák a transzportert mint a szülő törzs mitokondriumai. Tehát a citrát (és malát) transzporter fehérje kifejeződik, jelen van a mitokondriumban csak a CS1 enzim hiányában nem tud megfelelően működni.

A citrát transzport érzékenysége a CS1<sup>-</sup> mutációra specifikusnak bizonyult, mivel a citrát transzportot más citrátköri mutációk, mint pl. a MDH1<sup>-</sup> nem érintették szignifikánsan. Miért van szüksége a citrát transzporternek a CS1-re? Mechanizmusként proponáljuk, hogy a CS1 megköti a

citrátot majd fizikai közelsége, interakciója, révén direkt a citrát transzporterhez továbbítja. Ez direkt magyarázza, hogyan segíti a CS1 a citrát leadását, de ugyanígy segíti felvételét is, mert belülről cserepartnert szolgáltat belépéséhez. A mesterséges foszfolipid membránban (liposzóma) azonban a citrát (és minden kismolekula) könnyen hozzáfér a transzporterhez és az nem igényli a CS1 segítségét. A mitokondrium belső membránjában a fehérjék szervezett módon ágyazódnak be, a funkcionális kapcsolatban lévők közel kerülnek egymáshoz és aktivitásuk egymástól függ. Ezen kapcsolatoknak azon részét, melyre intézetünkben végzett, fentebb idézett vizsgálatok kiterjedtek érzékelteti sematikusán a 2. Ábra.



2. Ábra. A citrát szintáz (CS) és citrát transzporter (CT) feltételezett elhelyezkedése a mitokondrium belső membránjában. PDC: piruvát dehidrogenáz komplex.

### Perspektívák.

A karnitin anyagcserével kapcsolatos munkáink során az élesztő PSY 142 törzsből izoláltuk a karnitin aciltranszferáz (CAT) enzimet megállapítva, hogy az enzim 80 %-a mitokondriális (16). A továbbiakban a CAT génjét klónoztuk, szekvenáltuk és gén-diszrupcióval CAT mutáns (CAT<sup>-</sup>) élesztőtörzset hoztunk létre (17). Más kutatók egy ethanol indukálható karnitin aciltranszferáz enzimet fedeztek fel az élesztőben, mely feltételezésük szerint a mitokondrium külső membránján lokalizált és az új enzimnek a YAT1 nevet adták (18). Tudvalevő, hogy a karnitin-acilkarnitin cserét a mitokondrium belső membránjában lokalizált karnitin-transzlokáz végzi. A karnitin transzlokáz és a karnitin kapcsolatában már megfigyeltek "channeling"-et, amit a szerzők (Pande és Murty) mikrokompartmentáció-ként éltek át (19). Nagyon alapos feltételezni, hogy jelen munka tárgyát képező transzporter-enzim kooperativitás a CAT és a karnitin transzlokáz kapcsolatában is létezik (a YAT1 vonatkozásában pedig nem).



## Irodalmi hivatkozások

1. Srere, P.A. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 89-124
2. Backman, L. and Johansson, G. (1976) *FEBS Lett.* **65**, 39-42
3. Fahien, L.A., Kmiotek, E.H., Woldegiorgis, G., Evenson, M., Shrago, E. and Marshall, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6069-6079
4. Fahien, L.A., Kmiotek, E.H. and Smith, L. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 33-46
5. Ovadi, J., Salermo, C., Kleti, T. and Fasella, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* **90**, 499-503
6. Patthy, L. and Vas, M. (1978) *Nature*, **276**, 94-95
7. Salermo, C. and Ovadi, J. (1982) *FEBS Lett.* **138**, 270-272
8. Halper, L.A. and Srere, P.A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 529-534
9. Beeckmans, S. and Kanarek, L. (1981) *Eur. J. Biochem.* **117**, 527-535
10. Sumegi, B., Gyocsi, L. and Alkonyi, I. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* **616**, 158-166
11. D'Souza, S.F. and Srere, P.A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 4706-4709
12. Sumegi, B. and Srere, P.A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15040-15045
13. Bisson, L.F. and Fraenkel, D.G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 1730-1734
14. Cohen, N.S., Cheung, C.-W. and Raijman, L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 203-208.
15. Sandor, A., Johnson, J.H. and Srere, P.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29609-29612
16. Kispal, Gy., Cseko, J., Alkonyi, I. and Sandor, A. (1991) *Biochem. Biophys. Acta.* **1085**, 217-222
17. Kispal, Gy., Sumegi, B., Dietmayer, K., Bock, I., Gajdos, G., Tomcsanyi, T. and Sandor, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1824-1829
18. Schmalix, W. and Bandlow, W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27428-27439
19. Pande, S.V. and Murthy, M.S.R. (1988) in *Microcompartmentation*, (D.P. Jones, ed.) pp. 93-114. CCR Press, Boca Raton, Florida

## A NITROGÉN-MONOXID(NO) TERMELÉSE, FUNKCIÓJA ÉS KAPCSOLATA AZ ARGININ-ANYAGCSERÉVEL.

Hrabák András, Bajor Tamás, Temesi Ágnes  
SOTE I. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest, 1444 Pf. 260

Az NO termelődésének, hatásainak vizsgálata az utóbbi évek sztár-témái közé tartozik, amit igazol az a számadat, hogy a MEDLINE az adott címszó alatt 1985-ben még csupán 25, 1990-ben 292, 1993-ban pedig már 1421 cikk összefoglalóját tartalmazta és az idei első negyedévben is 400 közelében van. A nitrogén-monoxidot joggal nevezték a Science 1992 decemberi számának szerkesztőségi cikkében az "év molekulájá"-nak[1]. A nitrogén-monoxidot valószínűleg a legtöbb emlős sejt képes termelni L-argininből, de nagyobb mennyiségben és többé-kevésbé bizonyítottan hozzárendelhető biológiai hatással eddig három sejttypusban mutatták ki: az endotel sejtek által termelt NO értágító hatása, az idegsejtek által termelt NO-nak neurotransmitter hatása van, míg a makrofágok citotoxikus hatású NO-t termelnek. Hogyan lehetséges az, hogy egy ilyen kis molekula egymástól ennyire eltérő szerepköröket tölt be, miért nem keverednek a három sejttypus által termelt NO funkciói és mi magyarázza, hogy csak a makromolekulák korszakában vált ismertté az eddigi legkisebb méretű, specifikus biológiai hatásokat mutató molekula, amely addig mint környezetszennyező, feltételezetten karcinogén, ózont inaktíváló, savas esőket okozó gáz meglehetősen rossz hírnévvel rendelkezett?

A fenti kérdésekre a válasz aránylag könnyen megadható: a NO hatásait ugyanis igen kis mérete, lipofil karaktere, valamint szabad gyök jellegéből adódó nagy reakcióképessége és rövid élettartama alapján magyarázhatjuk meg. Szabad gyök karaktere révén egymástól eltérő szerkezetű proszretikus csoportokban levő koordinatíván kötött Fe-atomokkal reagál, ami okozhat aktiválást(olddható guanilát-cikláz) vagy gátlást(a légzési lánc egyes komponenseinek Fe-S-proteinjei). A szabad gyök rövid élettartama magyarázza a lokális hatást, kis mérete, lipofil karaktere pedig lehetővé teszi a membránokon keresztül történő diffúziót, ezért nincs szükség külön intracelluláris mediátorra. Az eltérő célsejtek és a kis hatótávolság együttesen magyarázza, hogy a funkciók nem keverednek. Végül, az NO molekula említett sajátosságai okozhatták azt is, hogy csak az utóbbi években ismerték fel a szerepét: rövid szabad-gyök "életét" követően - valószínűleg szuperoxid anionnal reagálva, peroxinitriten keresztül - spontán nitritté, majd nitráttá oxidálódik, a szervezetben képződött  $\text{NO}_2^-$  és  $\text{NO}_3^-$  pedig hosszú időig nem keltette fel a kutatók érdeklődését, bár tudták azt, hogy ennek egy része nem a táplálékkal került a szervezetbe[2]. A NO szerepét éveken át hitetlenkedve fogadták a kutatók, ma is folynak kísérletek annak tisztázására, hogy esetleg más N-tartalmú vegyületekbe épülne be(pl. S-nitrozotiolok) és így tárolódna[3], mégis, ma már a többség elfogadja azt a tényt, hogy ez a nagy mennyiségben súlyosan toxikus, környezetszennyezőként ismert vegyület kis koncentrációban számos fiziológiai folyamatban tölt be nélkülözhetetlen szerepet. Ugyanekkor számos olyan vegyület ismert, pl. a régóta értágítóként alkalmazott nitroglicerint, a nitroprusszid-nátrium, vagy a 3-morfolino-syndonimin(SIN-1), amelyekből a szervezetben enzimatis úton vagy spontán kémiai reakció révén NO képződik, ezek az orvosi terápiában NO-generáló vegyületekként értágításra használhatók. Bár az alábbiakban csak a három legfontosabb NO-termelő sejttről lesz szó, megemlítjük, hogy számos más sejtben is leírták az NO szintézist, de a kísérleti eredmények száma még nem mindenütt elégséges ahhoz, hogy megfelelő következtetéseket lehessen levonni. Úgy gondoljuk, hogy potenciálisan minden emlős sejt képes NO-t szintetizálni, csupán a megfelelő gének be- vagy kikapcsolt állapotán, illetve adott esetben a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -szintjén múlik, hogy ez megtörténik-e, illetve a szintetizált enzim aktív-e. Először röviden áttekintjük az NO termelődésének, hatásainak élettani aspektusait, majd áttérünk a biokémikus számára érdekesebb enzimológiai, molekuláris biológiai sajátosságokra.

A NO ma legismertebb szerepe az endotel sejtekben termelődő NO értágító hatása[4-6]. Az endotel sejtekben található NO-szintáz(NOS) enzim mikroszómákhoz kötött, konstitutívan termelődik,  $\text{Ca}^{2+}$ -függő[7] és a keletkező NO a sejttről kijutva az érfal simaizom-sejtjeire hat. Támadáspontja az olddható guanilát-cikláz, melynek hem kapcsolódik és a NO a hem Fe-atomjához kötődve azt kihúzza a

gyűrű síkjából, a guanilcikláz ezáltal aktiválódik (a jelenség más szabad gyökökkel is elérhető). A termelődő cGMP a simaizom-sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmát eddig nem ismert hatásmechanizmussal csökkenti, s ennek következménye a vazodilatáció [8].

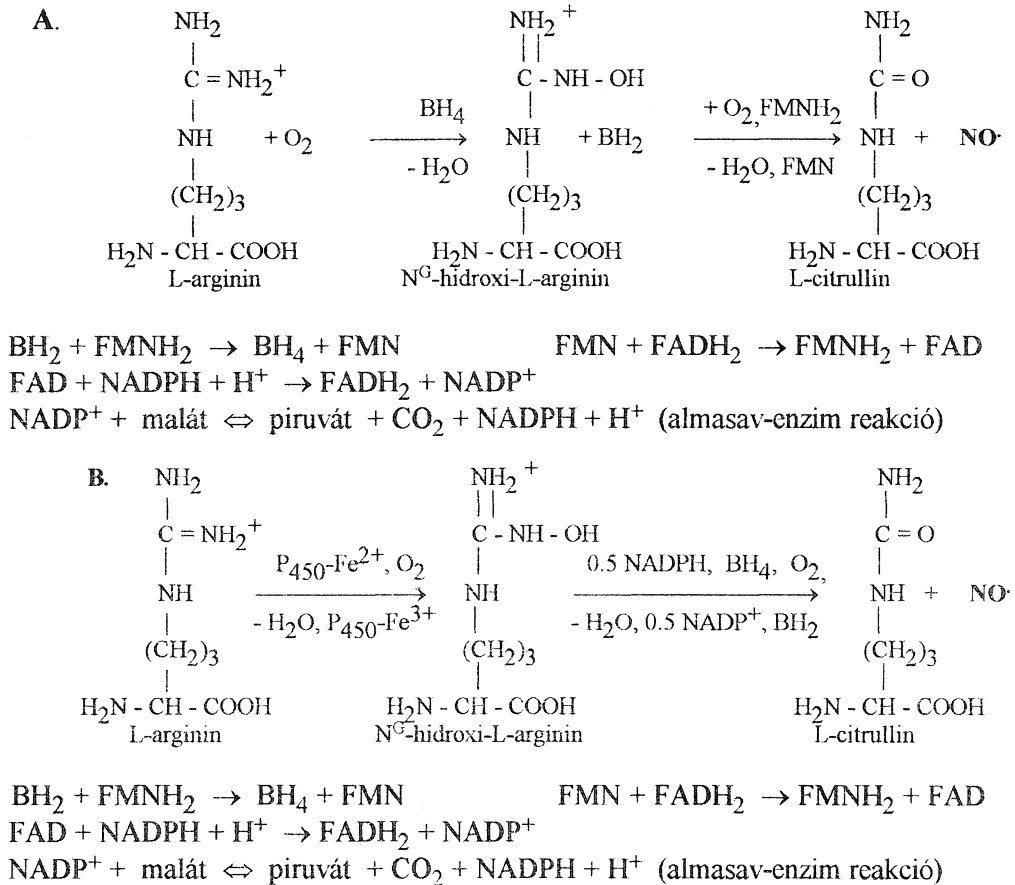
Az idegsejtekben a NO-szintáz ugyancsak konstitutív,  $\text{Ca}^{2+}$ -igényes, viszont szolubilis [9]. A képződött NO hatásmechanizmusa sok tekintetben hasonló az endotelhez, mivel itt is a cGMP szint emelkedését mérték [10-12]. A NO szintézis a posztzinaptikus neuronban glutamát hatására indul meg, amikor a preszinaptikus neuron vezikulumaiból felszabadult glutamát a posztzinaptikus NMDA receptorokhoz kötődik. Ez a posztzinaptikus neuronban  $\text{Ca}^{2+}$  belépését segíti elő, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok pedig kalmodulinhoz kötődve elősegítik a NO szintáz aktiválását (az NO szintáz kalmodulin-kötő helyet tartalmaz, mely még a  $\text{Ca}^{2+}$ -független indukálható NO-szintázon is megtalálható). Agyvérzés kapcsán a károsított idegsejtekből kiszabaduló glutamát olyan nagy koncentrációjú NO képződést eredményezhet, ami komoly neurotoxicitást okozhat [13,14]. Ez a hatás a makrofágok által termelt NO hatására emlékeztet és gátlható  $\text{N}^{\text{G}}$ -szubsztituált arginin-származékokkal. Ugyanekkor más szerzők a tanulás mechanizmusában keresik a NO szerepét. A fentihez hasonló modell esetén a keletkezett NO visszacsatolással további neurotranszmitter felszabadulásra készíteti a preszinaptikus sejtet ("retrográd messenger" hatás) [15]. Így az NMDA receptort ismételt aktiváló hatások érik, ami a memória hosszú távú konszolidálását eredményezné (long-term potentiation [16]). Az NO-szintáz hisztokémiai módszerekkel lokalizálták az agyban: a legmagasabb aktivitást a bulbus olfactorius és a kisagy mutatta. Előbbi esetén az NO-nak a cGMP-függő kationcsatornák befolyásolásában lehet szerepe [17], míg a kisagyban a szemcsejtek és kosársejtek által termelt NO a Purkinje-sejtek integratív funkcióját szabályozná [18]. Ezek a sejtek cGMP-dependens protein-kinázt tartalmaznak amely bizonyos mutáns egértörzsekben alacsony szintű [19].

A makrofágok által képzett NO-t egy szolubilis, azonban az előző kettőtől eltérően indukálható,  $\text{Ca}^{2+}$ -mal nem aktiválható enzim termeli [20], mely elsősorban citokinekkel ( $\text{TNF}\alpha$ , interferon- $\gamma$ ) és lipopoliszahariddal (LPS) indukálható [21,22], az indukció pedig glukokortikoidokkal gátlható [23]. A keletkező NO a sejt környezetében levő egyéb sejtekbe jutva kapcsolódik a Fe-S centrumokhoz és bénítja a légzési láncot [24]. Élettani szempontból kiemelkedő jelentőségű a makrofágok tumor-ellenes, valamint anti-parazita és baktericid hatása [25-27]. Amint erre majd kitérünk, a makrofágok esetében fontos a NO szintézis kapcsolata az arginin-anyagcsere egyéb útjaival is.

A következőkben a NO szintáz enzim legfontosabb tulajdonságait tekintjük át. Az enzim által katalizált reakció során L-argininből NO és L-citrullin keletkezik. A reakció mechanizmusa még nem teljesen bizonyított, de valószínűleg egy dioxigenáz reakcióról van szó, melynek első lépését a enzim oxigenáz doménje katalizálja: ennek során egy molekula oxigén és az enzimhez szorosan kötött tetrahidrobiopterin kofaktor hidrogénjeinek felhasználásával először  $\text{N}^{\text{G}}$ -hidroxi-L-arginin köztitermék, valamint víz képződik. A köztiterméket az oxigenáz domén tovább oxidálja, ennek során keletkezik a NO gyök, a molekula további részéből pedig citrullin képződik. A dihidrobiopterint ( $\text{BH}_2$ ) az enzim másik, reduktáz doménje alakítja vissza funkcióképes állapotba, ehhez egy  $\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FMNH}_2 \rightarrow \text{NADPH}$  redukciós sorozatra van szükség (az enzim egyedülálló abban a tekintetben, hogy egyaránt tartalmazza a kétféle flavin-nukleotidot). A  $\text{NADP}^+$  visszaredukálását az egyik erre alkalmas rendszer, az almasav-enzim végzi, amely gyakran funkcionális komplexet képez az NO-szintázzal ([28], 1. ábra A).

A reakció során érdekes módon páratlan számú, öt elektron átvitele történik meg. Ezért a fent említett mechanizmust később módosították [29], feltételezve, hogy az első lépésben 1 mól NADPH két elektront ad át FAD/FMN és citokróm  $\text{P}_{450}$  kofaktorokon keresztül, így az egyik oxigén vízzé redukálódik, a másik beépül az  $\text{N}^{\text{G}}$ -hidroxi-argininbe (1. ábra, B). A második lépésben 1 mól  $\text{N}^{\text{G}}$ -hidroxiarginin 1 mól citrullinná oxidálódik (újabb 2 elektron), míg 0.5 mól NADPH egy páratlan elektront vinne át, így egy második mól víz keletkezik (1. az ábrát) és a maradék páratlan elektron kerülne a nitrogénoxidra, annak gyökös karakterét okozva. Ebben a sémában a tetrahidrobiopterin a reakció második lépésében szerepel. Egyes szerzők szerint a biopterin szerepe csupán a NO-szintáz alloszterikus aktiválása lenne és nem elektronátvitel. A tetrahidrobiopterin ilyen regulátor szerepét

néhány adat is alátámasztja, pl. a biopterint mindig teljesen redukált formában találták meg a NO-szintázhoz kötve, továbbá a NO-szintáz rezisztens metotrexátra, amely gátolja a dihidropteridinek visszaredukálását, stb.[30].



1. ábra. A NO-szintáz enzimek feltételezett hatásmechanizmusa. BH<sub>4</sub> ill. BH<sub>2</sub> = tetra- ill. dihidrobiopterin.

Az NO-szintáz izolálását 2'5'-ADP-Sepharose affinitáskromatográfiával végzik, azonban a preparátumok sokszor jelentősen veszítenek aktivitásukból, valószínűleg attól függően, hogy a tetrahydrobiopterint a tisztítás mennyire károsítja[31-33]. A NO-szintázok cDNS-eik bázisszortájából megállapított aminosav-szekvenciája is ismert: a konstitutív, kisagyi eredetű enzim(cNOS) egy polipeptidlánca 1429 aminosavból áll(molekulatömege kb. 155 kD), míg az indukálható, makrofág-eredetű enzim(iNOS) polipeptid-lánca jóval rövidebb, 1144 aminosavat tartalmaz(molekulatömege kb. 130 kD). A közel 300 amino-savnyi különbség főleg az N-terminális szakasz 223 aminosavának hiányából adódik az iNOSban. Több kofaktor kötőhelyét is nagy valószínűséggel ki lehet következtetni a szekvenciából: a kalmodulin kötőhely a cNOS 725-750 (az iNOS 503-532) aminosava közé esik, a FMN-t a cNOS 881-914, a FAD pirofoszfátját az 1028-1040, izoalloxazinját az 1172-1181, a NADPH-ribózt a 1246-1265, a NADPH-adenint a 1344-1360-as aminosav-szekvenciariészlet kötné meg[34]. Ezek a nukleotidkötő részletek egy domént képeznek, amely 30-40 %-ban homológ a NADPH-citokróm P<sub>450</sub> reduktázzal. Az enzim tartalmaz egy, a citokróm P<sub>450</sub>-nel kb. 50 %-ban homológ szakaszt is az N-terminális vég közelében, itt egy hem-kötő régiót feltételeznek, valamint ennek közelében több olyan konszenzus-szekvenciát, amelyek foszforilálhatók. Nem tudták még lokalizálni a tetrahydrobiopterin kötőhelyét sem, amit az is magyaráz, hogy egyes vizsgálatok szerint az agyi enzim nem sztöchiometrikus mennyiségben használja fel[30], bár minden NO-szintáz igen specifikus a 6(R)-sztereoiszomerre. A legkevésébbet a szubsztrát- és inhibitor-

kötőhelyekről, valamint az esetleges alloszterikus regulációs helyekről tudunk, ezeket az enzimek az N-terminális közlebbi felében valószínűsítik. Érdekes, hogy az NO-szintáz aránylag jól bontja az argininnél egy  $-CH_2-$  csoporttal hosszabb L-homoarginint is, viszont éles sztereospecifitást mutat: a D-arginin nem szubsztrátja. Hasonlóan specifikusak az enzim arginin-analóg gátlószerei, ezeknek is csak az L-izomerjük hatásos[24]. Ezeket a tényeket magunk is elemeztük az enzim-szubsztrát kapcsolat kritériumainak meghatározása céljából(1. alább). Az enzim térszerkezetéről is vannak információk: az eddigi izoformák homodimereknek bizonyultak[35].

Az enzim aktivitását több módszerrel is meg lehet határozni. A legáltalánosabban az NO azon tulajdonságát használják fel, hogy szabad gyök jellege miatt instabil és spontán eloxidálódik nitrit és nitrát ionokká, a nitrit-ion pedig az ún. Griess-reakcióval könnyen kimutatható, fotometriásan kvantitatíve is meghatározható[36]. Az esetleges nitrátot előzetesen nitritté lehet visszaredukálni, így a teljes szintetizált NO-val arányos  $NO_2^-$  mérhető. Ennek a módszernek számos hátránya van: 1. aránylag kevésbé érzékeny, a  $NO_2^-$ -nek mikromólos koncentrációban kell jelen lennie; 2. mérhető mennyiségű nitrit keletkezése a szokásos enzimaktivitás-mérésekhez képest hosszú időt(min. 10-12 óra) igényel; 3. a nitrit csak intakt sejtekben képződik, sejtthomogenátumban nem használható. Ezért több más módszert is felhasználnak a NO-szintáz mérésére. Jelentősebb enzimentartalom esetén felhasználható a hemoglobín spektrumának megváltozása NO hatására[37]. A NO, mint szabad gyök, fizikai módszerekkel is mérhető, ezek azonban eléggé költséges műszereket igényelnek[38]. Az utóbbi néhány évben terjedtek el azok a módszerek, amelyek az NO-val ekvivalens citrullin mérésén alapulnak[39,40]. Ez utóbbi módszer alkalmazásának feltétele az arginin(szubsztrát) és citrullin(termék) megbízható szétválasztása, amely elvben történhet HPLC-vel(de meglehetősen költséges), általában azonban valamilyen más kromatográfiás módszert alkalmaznak. Ha az arginin jelzett volt, a citrullin is jelzett lesz és mint termék mérhető. A  $Ca^{2+}$ -dependens enzimek esetén a reakció leállítása EGTA-val történik, az independens enzimeknél magas koncentrációjú jelzetlen argininnel. Mivel a NO-szintázok  $K_M$ -értéke argininre 2-10  $\mu M$  körüli, a telítési koncentrációt jelzett argininnel sem túl nehéz elérni.

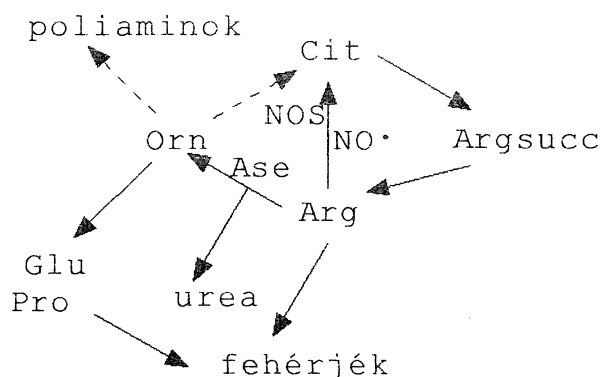
Az NO-szintáz enzimek közül az indukálható forma különös érdeklődésre tarthat számot. Ez az enzim elsősorban makrofágokban található, ezt klónozták is[34], de számos más sejtben (máj, uterus, granulociták) is kimutatták. Az indukció elsősorban endotoxinnal(LPS) és citokinekkel történik[20-22]. A bakteriális endotoxin hatására önmagában nem jön létre komoly indukció, azonban ha egyúttal interferon- $\gamma$ -t is adnak, a nitrit(NO) szintézise jelentősen megnő. Az utóbbi év jelentős sikerei közé tartoznak az indukció molekuláris biológiai vizsgálatának eredményei. Egér makrofágok NO-szintázának promotor régiójától 5'-irányban két olyan régiót találtak, amelyek egyike az LPS-indukcióval kapcsolatos transzkripciós faktorok(-48-tól -209 nukleotid pozíció), másika pedig az IFN  $\gamma$ -indukcióval kapcsolatos transzkripciós faktorok(-913-tól -1029 nukleotid pozíció) kötésére alkalmas. Egyes transzkripciós faktorok képződését a TNF- $\alpha$  indukálja. A citokinek és az LPS szerepére az arginin-anyagcsere kapcsolatok tárgyalásakor visszatérünk. Maga az LPS kb. 75-szörös NO-szintáz aktivitás-növekedést eredményez, ezt az IFN $\gamma$  további 10-szeresére(750x) növeli[41].

A makrofágok esetében a NO-szintáz vizsgálatát és funkciójának értékelését bonyolítja az a körülmény, hogy a makrofágok az arginint nem csupán NO szintézisére, hanem argináz enzim(Ase) szubsztrátjaként is felhasználják[42,43]. Ezekben a sejtekben tehát a két enzim azonos szubsztrátért vetélkedne(2. ábra). Bár az esélyek elsőre nem tűnnek azonosnak, hiszen a NO szintáz  $K_M$ -je két-három nagyságrenddel alacsonyabb az arginázénál, számos kísérlet eredménye utal arra, hogy az argináz jelenléte nem hanyagolható el a makrofágok arginin-anyagcserejének vizsgálatában. Mindenekelőtt, egyes állatfajok valamint állatfajokon belüli törzsek argináz és NO-szintáz termelése nem azonos, ráadásul az argináz aktivitás kevésbé van kitéve citokinek indukáló hatásának. Az LPS és a TNF ugyan ennek az enzimek a termelését is fokozza, az interferon  $\gamma$  esetén azonban azt írták le, hogy csökkenti az argináz aktivitást("down-regulation")[44]. Kísérleti eredmények alapján állítható, hogy az argináz-út a poliamin-szintézis irányába vezetvén a tumor növekedésének, míg a NO-szintáz út a tumor elpusztításának kedvez. A két út érzékeny egyensúlyát az IFN $\gamma$  lokális szintje is

befolyásolhatja és a lokális Orn/NO arány igen fontos lehet a tumorelles védekezés hatékonyságában[45].

Igen divatos témáról lévén szó, a hazai, a kérdés iránt érdeklődő kutató fő gondja, hogy hol lehet ezen a területen még újat leírni, "labdába rúgni". A téma élvonalbeli kutatásában nemzetközileg is aránylag kevés csoport képes érdeklődésre számot tartó eredményt elérni. Munkacsoportunk még a nyolcvanas évek végén, Antoni professzor vezetésével kezdett el a témával foglalkozni, miután ezt megelőzően a makrofágok argináz-aktivitásának vizsgálatában szereztünk tapasztalatokat. Ez utóbbi esetben a korai ígéretes időszak után megfeneklett a kutatás: a világon ezzel foglalkozók nem találták meg az argináz-termelés fiziológiai jelentőségét és máig sem ismert, hogy a makrofág mire használja ezt az enzimet.

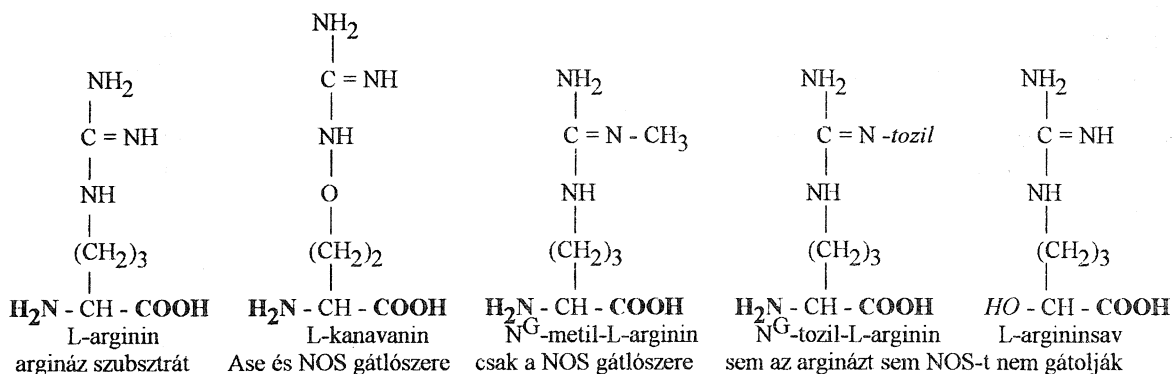
Eleinte elsősorban az argináz és a NO szintézis közötti összefüggésekkel foglalkoztunk. Eredményeink közül fontosnak tartjuk, hogy az argináz és a NO-szintáz aktivitást nem csupán citokinekkal lehet indukálni, hanem egerek és parkányok peritoneumában (elsősorban kazeinnel) *in vivo* kiváltott steril gyulladásokkal is. Ennek a módszernek előnye, hogy nagyobb számú sejthez jutunk, nincs szükség a rendkívül költséges rekombináns egér- vagy patkány-interferonra, hátránya viszont, hogy az indukció nem *in vitro* specifikusan adott, tiszta citokinnel, hanem a hasüregből eltávolított sejtek keveréke által termelt citokin-keverékkel történik. Mindamellert a biokémiai vizsgálatok céljára megfelelő mennyiségű és enzimentartalmú kiinduló anyagot lehet így kinyerni. Másik fontos eredményünk, hogy species-különbséget találtunk a két enzim termelésében: az egér peritoneális makrofágokban az argináz aktivitása magasabb és nagyobb sejtszám szükséges a NO-szintézis megindulásához, patkány makrofágokban viszont magas NO<sub>2</sub>-termelés mellett az argináz aktivitás gyakorlatilag mérhetetlenül alacsony[46-48]. A későbbiekben elsősorban az arginin szubsztrát forrását illetve a NO-szintáz és az argináz szelektív gátlhatóságát kezdtük vizsgálni. Kimutattuk, hogy az endotel sejtekben igen fontos citrullin-arginin visszaalakulás[49] makrofágokban nem csupán kisebb mértékű[50], de a makrofágok magas proteolitikus aktivitása lehetővé teszi számukra, hogy nem csak a szabad arginint(ennek koncentrációja a vérplazmában igen alacsony, 70-170 µM) tudják felhasználni, hanem a peptidekből, fehérjékből is képesek szükség esetén proteolízissal arginint mobilizálni[51]. A NO-szintáz néhány kompetitív gátlószere már ismert volt, ezek főleg a guanidino-csoportban N-subsztituált arginin-származékok(pl. metil-, nitro-, amino-arginin)vagy pl. N-iminoetil-ornitin [52,53]. Kísérleteink egyik fő területévé vált annak vizsgálata,



2. ábra. Az arginin legfontosabb anyagsereútjai makrofágokban. Ase = argináz, NOS = NO szintáz. A szaggatott nyilakkal jelölt utakat nem mutatták ki makrofágokban, így az urea-ciklus csonka. Az Orn-poliamin reakcióutat limfocitákban korábban már leírták, az Orn-transzkarbamiláz hiánya miatt az arginin utánpótlás részben citrullinból, részben proteolízissal fehérjékből történik, valamint a sejt környezetéből aktív transzporttal veszi fel az arginint.

hogy a NO-szintáz és az argináz mennyire szelektíven gátlható különböző gátlószerekkel, továbbá számítógépes analízissel megpróbáltunk olyan közös szerkezeti sajátságokat találni az egyes

inhibitorokban illetve a szubsztrátokban, melyek lehetővé teszik egyrészt a kötésben esszenciális strukturális elemek definiálását, másrészt ezen elemek ismeretében szelektív gátlók tervezését, esetleg már létező vegyületek szelektív gátló hatásának prognosztizálását. Ezen kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a NO szintáz kompetitív gátló  $N^G$ -szubsztituált arginin-származékok az arginázra hatástalanok, az L-homoarginin, amely az NO-szintáz szubsztrátja, az argináz számára nem az, az L-kanavanin viszont az arginázt még erősebben gátolja: ezek az eredmények arra utalnak, hogy az argináz aktív helye szorosabban illeszkedik a szubsztráthoz, míg a NO-szintáz esetén - elsősorban a guanidino-csoportot kötő részen lazább az illeszkedés. A guanidino csoport befogadásához még elfogadható méreteket, a gátlószereknek az argininhez viszonyított konformációs eltéréseit számítógépes módszerrel határoztuk meg. Megállapítottuk továbbá, hogy az arginin-analógok közül csak az L-sztereoizomerek hatásosak és az  $\alpha$ -amino és -karboxilcsoport jelenléte egyaránt szükséges(3. ábra, [54]).

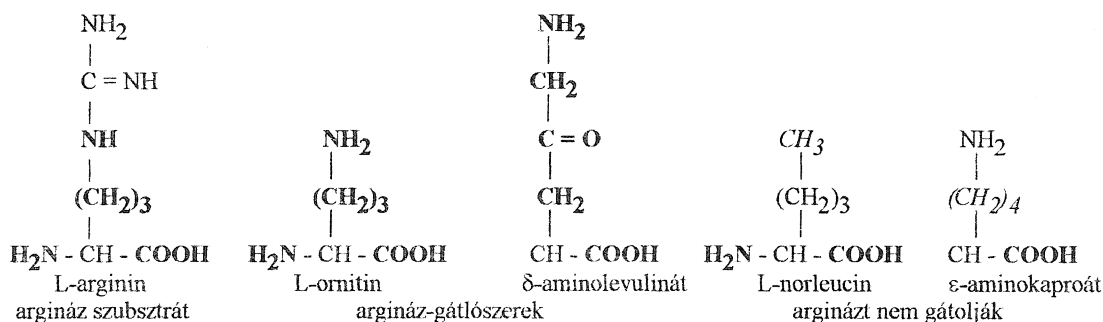


3. ábra. Az argináz és NO-szintáz kompetitív gátlásához szükséges csoportok az arginin-analógokban:  $\alpha$ -amino és -karboxil, továbbá az  $N^G$ -szubsztituens mérete nem lehet akkora, hogy a guanidino-csoport felszíne a  $180 \text{ \AA}^2$ -öt elérje. A kötés szempontjából kedvező csoportok kövér, a kedvezőtlenek dőlt betűkkel vannak szedve.

Ezen az úton továbblépve az argininnel rokonságban nem álló aminosavak argináz- és NO szintáz gátló hatását is szisztematikusan végigvizsgáltuk. Számos  $\alpha$ -L-aminosav erősen gátolja kompetitíve az arginázt(ornitin, valin, leucin, norvalin stb.), ezek közül az ornitinnek, mint az argináz reakció termékének, szabályozó hatása is lehet. Az említett aminosavak ugyanekkor az NO-szintázra hatástalanok. Ez utóbbi enzimet néhány aminosav-származék gátolta, pl. a putreszcin, spermidin és az L-valinol. Az eredmények számítógépes kiértékelésével arra a következtetésre jutottunk, hogy az argináz aktív centruma legalább öt különböző kötőhellyel rendelkezik, amelyek közül legalább háromnak megfelelő kötő csoportnak kell jelen lennie ahhoz, hogy egy vegyület gátlószere legyen. Ezen sajátosságok közül esszenciális egy L- $\alpha$ -helyzetű karboxilcsoport, valamint egy, az  $\alpha$ -helyzetű szénatomon két vagy három három szénatom hosszúságú apoláros lánc(mely lehet elágazó is). Ezen kívül vagy egy  $\alpha$ -helyzetű aminocsoport, vagy egy, a  $\delta$ -szénatomon elhelyezkedő N jelenléte is szükséges, valamint stabilizáló hatású lehet egyes poláros oldallánc-csoportok jelenléte(keto, szulfhidril stb.). A túlságosan hosszú apoláros láncrészlet kedvezőtlen a kötés számára, mert az erősen poláros guanidino-N kötőhelyére esik az  $\epsilon$ -szénatom(L-norleucin,  $\epsilon$ -aminokapronsav, 4. ábra[55]).

Az NO-szintáz aktív centrumára vonatkozóan ezek a kísérletek nem adtak újabb információt, mivel az új gátlószerek valószínűleg nem oda, hanem valamilyen feltételezett alloszterikus helyre kötődnek. A fentiek alapján további kutatásainkban is elsősorban a különböző arginin-analógok és egyéb gátlószerek vizsgálatában, az arginin-transzport és az NO-szintézis kapcsolatának tanulmányozásában látunk fantáziát, mivel ez utóbbi kevésbé ismert. Érdekes összehasonlító vizsgálatokra ad lehetőséget az NO szintáz izoenzimek eltérő gátlószere-érzékenysége is. A gátlószerek vizsgálata igen fontos, hiszen terápiás célból máris próbálkoznak a NO szintézis befolyásolásával: magas arginin-adagokkal

sikerült *in vivo* kísérleti állatokban értágító hatást és ezzel a magas vérnyomás csökkentését elérni, míg  $\text{N}^G$ -metilarginin segítségével érszűkítés, következésképpen vérnyomásemelés érhető el[56]. Utóbbinak nagy jelentősége lehet a bakteriális endotoxinok által okozott szeptikus sokk kiküszöbölésében, amely valószínűleg éppen az LPS(endotoxin) által indukált magas NO-szintáz aktivitással és a következményként beállt vérnyomás-zuhanással magyarázható. Kísérleti terveinkben szerepel az argináz/NO szintáz alternatív reakcióutak enzimgátlókkal és az indukciót gátló szerekkel történő befolyásolásának hatása az NO szintáz citotoxikus funkcióira, elsősorban tumor- és parazitaellenes hatásait szeretnénk kooperációban is vizsgálni. Ennek elvi alapját a két reakcióút termékeinek a tumor fennmaradását illetve elpusztítását ellentétesen befolyásoló hatása adja[45].



4. ábra. Az argináz kompetitív gátlásához szükséges csoportok:  $\alpha$ -amino és -karboxil, optimálisan  $\text{C}_3$  apoláros lánc, a 6-guanidino-N-nek megfelelő pozícióban N-tartalmú csoport(- $\text{NH}_2$ ), valamint preferenciálisan a 4. szénatomnak megfelelő helyen poláros csoport(pl. keto, -SH). A kövér és dőlt betűk magyarázatát l. a 3. ábránál.

## IRODALOM

1. Koshland D.E. Jr., Science **258**, 1861 (1992)
2. Stuehr D.J. and Marletta M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7738-7742 (1985)
3. Ignarro L.J., Lipton H., Edwards J.C., Baricos W.H., Hyman A.L., Kadowicz P.J. and Gruetter C.A., J. Pharmacol. Exp. Ther. **218**, 739-749 (1981)
4. Furchgott R.F. and Zawadzki J.V., Nature **288**, 373-376 (1980)
5. Palmer R.M.J., Ferrige A.G. and Moncada S., Nature **327**, 524-526 (1987)
6. Ignarro L.J., FASEB J. **3**, 31-36 (1989)
7. Förstermann U., Pollock J.S., Schmidt H.H.H.W., Heller M. and Murad F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 1788-1792 (1991)
8. Ignarro L.J., Biochem. Pharmacol. **41**, 485-490 (1991)
9. Brecht D.S. and Snyder S.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 682-685 (1990)
10. Garthwaite J., Charles S.L. and Chess-Williams R., Nature **336**, 385-388 (1988)
11. Brecht D.S. and Snyder S.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 9030-9033 (1989)
12. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M.J. and Moncada S., Proc. Natl. Acad. Sci. **86**, 5159-5162 (1989)
13. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J. and Moncada S., Eur. J. Pharmacol. **172**, 413-416 (1989)
14. Choi D.W., Neuron **1**, 623-634 (1988)
15. Barinaga M., Science **254**, 1296-1297 (1991)
16. Izquierdo I., Trends Pharmacol. Sci. **12**, 128-129 (1991)
17. Nakamura T. and Gold G.H., Nature **325**, 442-444 (1987)
18. Snyder S.H. and Brecht D.S., Trends Pharmacol. Sci. **12**, 125-128 (1991)
19. Lohmann S.M., Walter U., Miller P.E., Greengard P. and De Camilli P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 653-657 (1981)
20. Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S. and Nathan C.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 7773-7777 (1991)
21. Ding A.H., Nathan C.F. and Stuehr D.S., J. Immunol. **141**, 2407-2412 (1988)
22. Drapier J.C., Wietzerbin J. and Hibbs J.B.Jr., Eur. J. Immunol. **18**, 1587-1592 (1988)



23. Di Rosa M., Radomski M., Carnuccio R. and Moncada S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1246-1252 (1990)
24. Hibbs J.B.Jr., Vavrin Z. and Taintor R.R., *J. Immunol.* **138**, 550-565 (1987)
25. James S.L., *Exp. Parasitol.* **73**, 223-226 (1991)
26. Cox G.W., Melillo G., Chattopadhyay U., Mullet D., Fertel R.H. and Varesio L., *J. Immunol.* **149**, 3290-3296 (1992)
27. Metz G., Carlier Y. and Vray B., *Parasite Immunol.* **15**, 693-699 (1993)
28. Rusche K.M., Hevel J.M. and Marletta M., in "The Biology of Nitric Oxide" Part II., pp. 45-47, Portland Press, Colchester (1992)
29. Stuehr, D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L. and Wiseman J., *J. Biol. Chem.* **266**, 6259-6263 (1991)
30. Campos K.L., Giovannelli J. and Kaufman S., in "The Biology of Nitric Oxide" Part II., pp. 47-48, Portland Press, Colchester (1992)
31. Hevel J.M., White K.A. and Marletta M.A., *J. Biol. Chem.* **266**, 22789-22791 (1991)
32. Mitchell J.A., Sheng H., Förstermann U. and Murad F., *Br. J. Pharmacol.* **104**, 289-291 (1991)
33. Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K. and Kawai C., *J. Biol. Chem.* **266**, 12544-12547 (1991)
34. Xie Q.-w., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T. and Nathan C.F., *Science* **256**, 225-228 (1992)
35. Schmidt H.H.H.W., Pollock J.S., Nakane M., Gorsky L.D., Förstermann U. and Murad F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 365-369 (1991)
36. James S.L. and Glaven J., *J. Immunol.* **143**, 4208-4212 (1989)
37. Olken N.M., Rusche K.M., Richards M.K. and Marletta M.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 828-833 (1991)
38. Palmer R.M.J., Ashton D.S. and Moncada S., *Nature* **333**, 664-666 (1988)
39. Ma L., Ishizaki Y., Morita I. and Murota S., *Neurosci. Lett.* **132**, 23-25 (1991)
40. Robbins R.A., Hamel F.G., Floreani A.A., Gossman G.L., Nelson K.J., Belenky S. and Rubinstein I., *Life Sci.* **52**, 709-716 (1993)
41. Lowenstein C.J., Alley E.W., Raval P., Snowman A.M., Snyder S.H., Russell S.W. and Murphy W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9730-9734 (1993)
42. Currie G.A., *Nature* **273**, 758-759 (1978)
43. Schneider E. and Dy M., *Immunology Today* **4**, 136-140 (1985)
44. Benninghoff B., Lehmann V., Eck H.-P. and Dröge W., *Intern. Immunol.* **3**, 413-417 (1991)
45. Mills C.D., Shearer J., Evans R. and Caldwell M.D., *J. Immunol.* **149**, 2709-2714 (1992)
46. Hrabák A., Antoni F. and Csuka I., *Int. J. Biochem.* **23**, 997-1003 (1991)
47. Hrabák A., Antoni F. and Csuka I., *Acta Physiol. Hung.* **81**, 45-57 (1993)
48. Hrabák A., Temesi Á., Csuka I. and Antoni F., *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 839-845 (1992)
49. Hecker M., Sessa W.C., Harris H.J., Änggård E.E. and Vane J.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8612-8616 (1990)
50. Wu G. and Brosnan J.T., *Biochem. J.*, **281**, 45-48 (1992)
51. Hrabák A., Idei M., Temesi Á., *Life Sci. közlésre elfogadva.*
52. Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F. and Moncada S., *Br. J. Pharmacol.* **101**, 746-752 (1990)
53. Gross S.S., Stuehr D.J., Aisaka K., Jaffe E.A., Levi R. and Griffith O.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 96-103 (1990)
54. Hrabák A., Bajor T. and Temesi Á., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 206-212 (1994)
55. Hrabák A., Bajor T. and Temesi Á., *Biochem. Biophys. Res. Commun. közlésre benyújtva*
56. Chen P.Y. and Sanders P.W., *J. Clin. Invest.* **88**, 1559-1567 (1991)

**Néhány összefoglaló tanulmány a témában(a szövegben konkrét hivatkozást nem tettünk rájuk, de az összeállításban rendszeresen támaszkodtunk adataikra):**

1. Marletta M.A., *Trends Biochem. Sci.* **14**, 488-492 (1989)
2. Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A., *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142 (1991)
3. Nathan C.F., *FASEB J.*, **6**, 3051-3064 (1992)



Szakmagyar

Napjainkban egyre több szó esik a magyar nyelv, ezen belül a magyar tudományos nyelv helyzetéről, állapotáról. A megváltozott politikai és gazdasági körülmények között nyelvünkbe rengeteg idegen — elsősorban angol — elem (idegen szó és idegenes szerkezet) kerül bele. Ez természetes folyamat, amelyet nem akarunk (de nem is tudnánk) feltartóztatni. Ez azonban nem jelentheti azt, hogy akár jottányit is engedjünk abból a nyelvi-stilisztikai igényességből, amelyet nagy elődeink: Szarvas Gábor, Simonyi Zsigmond, Bárczi Géza, Lőrincze Lajos és a többiek, a választékosan és magyarosan fogalmazó természet- és társadalomtudósok nemzedékei hagytak ránk örökül. Az új fogalmakat és az őket jelölő szavakat, kifejezéseket nyitott szívvel és elmével, előítéletek nélkül kell fogadni: de befogadni csak azokat szabad, amelyek valóban gazdagítják nyelvünket.

Az alább következő cikkel folyóiratunk új rovatot indít. A rovat címéül választott *szak(ma)gyar* két összetevője, a *szakma* és a *magyar* rovatunk két fő témakörét jelzi: összevonásuk pedig azt, hogy e témaköröknek érintkezési, fedési sávjával, metszetével kívánunk foglalkozni; végül a két szó metszetében (szó)játékosan kiemelődő *ma* arra utal, hogy mindezt a mai nyelvállapot alapján és szempontjából tesszük.

Rovatunk fő tárgyköre: a mai magyar tudományos nyelv és stílus, különös tekintettel az idegen/nemzetközi/angol szókincs benyomulására. Ennek megfelelően szívesen látunk cikkeket a szakterminológia, terminologizál(ód)ás témaköréből. Rendszeresen foglalkozni kívánunk a számítógépes nyelvészet problémáival is; hogyan befolyásolja a számítógépes szövegszerkesztés elterjedése a mai magyar írott nyelvet, különösen a tudományos stílust?; hogyan fogalmazunk élőszóban, szövegszerkesztőn és E-mailen (ez utóbbinak még magyar neve sincs!); „gépesíthető”-e a magyar elválasztás?; a helyesírás-ellenőrző programok használhatósága; stb.

Az új rovat reményeink szerint ettől a számtól kezdve rendszeresen jelentkezik. Szerzőinktől *legfeljebb négy gépelt lapnyi* terjedelmű cikkeket várunk a tudományos és szaknyelvi stílus témaköréből, különös tekintettel az újabban feltűnő idegen elemekre, idegenszerűségekre, illetőleg ezek magyarításának lehetőségére. A rovat jellegéből fakad, hogy nemcsak nyelvészekről kérünk és várunk cikkeket, hozzászólásokat, hanem más társadalom- és természettudományi területek képviselőitől is.

*Kemény Gábor*  
a rovat szerkesztője

## A magyar tudományos nyelv védelmében

Nagy érdeklődéssel olvastam Szentgyörgyi Zsuzsa cikkét a Magyar Tudomány szeptemberi számában. A nyelvhelyesség kérdéseinek vizsgálata természetesen állandó feladat, a Magyar Tudományban is számos dolgozatban és hozzászólásban foglalkoztak különböző vonatkozásaival az elmúlt években. Ma azonban talán égetőbb a probléma, mint korábban bármikor, elsősorban az angol eredetű műszavak mértéktelen — és sokszor teljesen felesleges — tömeges átvétele miatt. De nem csupán ezért. Mielőtt a műszavak kérdését taglalnám, arra szeretnék rámutatni, hogy a tudománnyal foglalkozóknak sokkal inkább kellene törekedniök a kiküszöbölhető idegen szavak használatának elkerülésére, mint a köznyelvben, éppen azért, mert a tudományos nyelv amúgy is sok idegen eredetű kifejezés rendszeres alkalmazását követeli meg. A köznyelvben is felesleges például a *maximális* jelző használata az egyenértékű *teljes*, vagy *legnagyobb mértékű* helyett, de magyar nyelvű tudományos szövegben szinte bicskanyitogatóan hangzik. Még inkább ez a helyzet, ha például a magyar szövegben *tentatív* áll az *ideiglenes* helyett.

Azt hiszem, hogy az idegen szavak átvételével vagy helyettesítésével kapcsolatban tulajdonképpen nagyon egyszerű általános szabály fogalmazható meg. Meg kell fontolnunk, hogy az adott szónak van-e magyar megfelelője, ha igen, nem kell tovább okoskodnunk: azt kell használni. Ha nincs nyelvünkben közvetlenül adódó megfelelője, akkor megfontolandó, hogy van-e a magyar szókincsnek olyan eleme, amely felruházható az új jelentéssel. A század első felében a sportnyelvben számos olyan magyar kifejezés honosodott meg, melyre korábban az angolból szolgáiban átvett szót használtak. Elegendő a *szögletre* (*corner*) és a *lesállásra* (*off-side*) utalnunk. Megmaradt például a magyarosra átírt *gól*, mert a magyar nyelv ebben a jelentésében nem tudja befogadni szótári egyenértékűjét, a *célt*. Ha nem találunk alkalmas magyar megfelelőt, akkor meg kell vizsgálnunk, hogy az angol vagy más élő nyelvben szereplő új jelentésű kifejezés milyen eredetű. Ha latin vagy görög, akkor a magyar nyelvbe ennek megfelelően kell beilleszteni, és csak akkor veendő át a modern nyelvből eredeti formájában, ha az másképpen nem lehetséges. Az ilyen esetekben két lehetőség van. Vagy teljesen meghagyjuk eredeti formájában, de ilyenkor idézőjellel vagy eltérő betűtípussal kell jeleznünk idegen voltát, vagy hangzásában, szóképzésében bele kell illeszteni nyelvünkbe.

Számos szó esetében a magyar nyelv kínál megfelelőt. Például a Szentgyörgyi Zsuzsa által lefordíthatatlanként említett *proceedings* esetében a *munkálat* pontosan kifejezi azt, amit kell. Elegendő utalnunk a Magyar Orvosok és Természetvizsgálók Vándorgyűléseinek *Munkálataira*; sok kötetük becses tudománytörténeti dokumentum. Más kérdés, hogy számos *proceedings* esetében az angol szót nem használják pontos jelentésének megfelelően: igen gyakran nem egy konferencián elhangzott előadásokat és *vitákat*, hanem pusztán az előadások szövegét vagy éppenséggel azok kivonatát közlő kiadványokat illetnek vele.

Néhány évtizede fedeztek fel olyan molekulákat, melyeknek sajátos voltát az angol *cluster* szóval kívánták kifejezni. Ezt a magyarba a *flaszterre* veszedelmesen emlékeztető *klaszter* formában vettek át. Nyelvünkben két szép megfelelője is van a *cluster*-nek: a *raj* és a *fürt*. Az adott helyzettől függően az *atomraj*, *atomfürt*, illetve *molekularaj* vagy *molekulafürt* tökéletesen kifejező, sőt árnyaltabb megfelelője lehet az angol kifejezésnek.

A tudománymetria alkalmazásával kapcsolatban teljesen általánosan, de feleslegesen, nem is mindig valódi jelentésének megfelelően használják az *impact*, illetve „magyarosan” *impakt*, továbbá az *impact factor* kifejezéseket. Magyar megfelelőjük a *hatás*, illetve a *hatástényező*. Lehetséges, hogy ha a magyar szavakat használnánk, nem fordulna elő olyan gyakran téves jelentésben való alkalmazásuk.

Egyre gyakrabban használják a *know-how* kifejezést. Ez valóban érzékletes, de az adott helyzettől függően a *miként* (esetleg a *hogyan és miként*), vagy pedig a Bolyki Jánostól hallott *fortély* pontosan kifejezheti az angol terminus jelentését.

A számítástechnika rohamos fejlődése különösképpen hozzájárult az angol műszavak tömeges átvételéhez. Hátborzongató pl. a *szévol* egyre gyakoribb használata, pedig a magyar *megóvni* ige ebben az értelemben pontos megfelelője az angol *to save*-nek. A szinte teljesen általánosan használt *input* és *output*-nak majdnem minden esetben tökéletes megfelelője a *bemenet* és *kimenet*.

Szinte érthetetlen, hogyan került az utóbbi években általános használatba a PhD (piécsdi!) rövidítés. Az egyetemi doktori fokozat megjelölésére csak az Egyesült Államokban alkalmazzák a *Philosophical Doctor* rövidítéseként. Az európai államok egyikében sem honosodott meg sem a kifejezés, sem a rövidítése. Magyarországon korábban a *bölcsészdoktor* megjelölést használták a tudományegyetemen, és a *mérnökdoktor* vagy a *műegyetemi doktor* megjelölést a Műegyetemen szerzett egyetemi doktori fokozatra. Ma már igencsak ódon és pontatlan kifejezés a *bölcsészdoktor* — bár pontos megfelelője a *philosophical doctornak* —, hiszen a filozófia ma már korántsem azt jelenti, mint évszázadokkal ezelőtt. Értelmetlen és félrevezető egy kémiai, fizikai, nyelvészeti stb. kérdésről készített értekezést „filozófiai doktori értekezés”-nek nevezni. Ma az *egyetemi doktor* megjelölés a pontos; mellette fel lehet tüntetni azt a tudományszakot, amelyre éppen vonatkozik. Sajnálatos, hogy a PhD még a vonatkozó magyar törvény szövegébe is bekerült.

A magyartalanságnak nem az idegen szavak felesleges alkalmazása az egyedüli forrása. Vannak szavak, melyeket teljesen elkoptatott gyakori használatuk. Ilyen például a *biztosít* és a *rendelkezik*. Egy anyagnak tulajdonságai *vannak*, nem pedig *rendelkezik* velük! Felfoghatatlan számomra, miért mondják és írják(!) unosuntalan azt, hogy *jelen pillanatban*, vagy a tárgyú *per pillanat*-ot a teljesen egyenértékű *most* helyett. Sajnos nagyon gyakran mondanak és írnak *magast nagy*, illetve *alacsony* *kis* vagy *kicsi* helyett. Gyakran keverik össze a *hányt* a *mennyivel*. Csak a kirívó példák sorát oldalakon keresztül lehetne folytatni.

A helyes nyelvhasználat feltétele a megfelelő szakmai és általános műveltség, a szellemi készenlét a hatalmas magyar szókincs alkalmazására; legnagyobb ellensége pedig a nem teljesen tisztázott fogalmak használata és a gondolkodásbeli restség.

Beck Mihály



## SZENT-GYÖRGYI CENTENARIUM EMLÉKKIADVÁNY

Ez a kötet méltó összefoglalása mindannak, ami a Prof születésének centenáriumi ünnepnapjain Szegeden történt.

Az ünnepi megemlékezések fejezetében (I) a köztársasági elnök, a miniszterelnök, a művelődési és közoktatási miniszter, az egyetem rektorának, majd egykori tanítványok - J.Gergely, Diczfalusi Egon, Andrew G.Szent-Györgyi, W.H.F.Mommaerts és Guba Ferenc köszöntő leveleit és díszbeszédeit olvashatjuk (1-42.o.)

A tudományos ülések fejezete (II) Dux László oktatási rektor-helyettes megnyitója után a következőket öleli fel :

G.Fodor : The Role of Albert Szent-györgyi in the Progress of Organic Chemistry. (43-52.o.)

L.Ernster : Developments of Concepts in Bioenergetics: A Tribute to Albert Szent-Györgyi. (55-74.o.)

Dirk Pette : Plasticity of Myofibrillar Protein Expression (75-91)

A.N.Martonosi : Muscle Biochemistry : The Harvest of Fifty Years. (93-118.o.)

P.Venetianer : The Szent-Györgyi Heritage : Szeged, the Fortress of Molecular Biology (121-125.o.)

E.Diczfalusi : World-Population and Reproduction Health : Quo vadis homo sapiens ?

Az emlékkiadvány magas színvonalú nyomdai előállítására jó összhangban tartalmával. (bd)

SZENT-GYÖRGYI ALBERT EMLÉKEZETE  
REMEMBERING ALBERT SZENT-GYÖRGYI  
MEMORIAL ADDRESSES

at

Albert Szent-Györgyi's Bust in the Pantheon of Dóm Square

**Andrew G. Szent-Györgyi**

Brandeis University  
Waltham, USA

Albert Szent-Györgyi was born one hundred years ago and died as a young man at an age of ninety three. His love of life, vitality, energy, warmth, sense of humor and courage was legendary. He stood by his convictions and could not be silenced. His science was the focus of his life but his worry was the worry of whole mankind. His scientific work in Szeged deserved two Nobel-prizes. This was discussed at the Symposium. His faith and character stays alive in his writings, his three short books: „The Crazy Ape“, „Science, Ethics and Politics“, „What Next“ and in his short, marvellous autobiography: „Lost in the Twentieth Century.“ I will quote from these:

I quote from „The Crazy Ape“:

*„Science even has the kernel of the new religion which the modern mind is longing for. All religions are based on the idea that there are forces greater than our own, that we are not the masters but the fruits of creation. The greatest compliment one can pay to a creative artist is not in words of praise but in the study and appreciation of his creation. If there is a creator, the greatest homage we can pay to him is the study, understanding and appreciation of his creation. This is what science does, and if I am doing my research I have the feeling of performing a divine service and feel as Haydn did about composing: he put on his best clothes whenever he sat down to compose, as though he were in church.“*

He writes in his autobiography, „Lost in he Twentieth Century“:

*„To me, science, in the first place, is a society of men, which knows no limits in time and space. I am living in such a community, in which Lavoisier and Newton are my daily companions; an Indian or Chinese scientist is closer to me than my own milkman. The basic moral rule of this society is simple: mutual respect, intellectual honesty, and good will.“*



Kiadó/Editor: Dr. Fráter Loránd  
Kiadványgondozás/Responsible editor: KREA Bt.  
Készült: 500 példányban 1994-ben.  
Published in 500 copies in 1994.  
ISBN: 963 7179 63 1

The future of mankind worried him continuously, especially the possibility of an atomic war. He writes:

*„I am troubled by grave doubts about the usefulness of scientific endeavor and have a whole drawer filled with treatises on politics and their relation to science, written for myself with the sole purpose of clarifying my mind, and finding an answer to the question: will science lead to the elevation or destruction of man, and has my scientific endeavor any sense?“*

He was concerned that political thinking could not keep in step with the progress in science. He writes:

*„I have touched upon two facets of science, its ways of thinking and the tools it creates. The danger of our days is that politics has run away with the tools, leaving the way of thinking behind. The forces created by science can be handled only by the mentality which created them. So if there is a way out it is not in suppressing, but in spreading science till scientific thought becomes sufficiently strong to create its own word order.“*

Then later:

*„The basic prescript of science is this : If you have a problem, meet it as such - as a problem collect data and then try to find the best of solutions with a neutral mind, with a cool head, unbiased by sentiment, hatred, fear or profit. with an uncompromising intellectual honesty, with good will and equity.“*

It is well known that Albert Szent-Györgyi never hid his opinion, his stand during the Second World War nearly cost his life. It is not by accident that he chose as a motto of his book „What Next“ the line of the Hungarian poet, Mihály Babits:

*„among brigands the silent is an accomplice“.*

He quotes Abraham Lincoln in his book: „Science, Ethics and Politics“

*„If democracy means a **government of the people, by the people and for the people**, and if we are the people, then we are all responsible for our government; which has to represent us and our opinions. This implies that we all have to take a stand in all vital issues as conscientiously as if our opinion would decide the issue.“*

He struggled for peace and fought against militarism. In „What Next“ he writes: *„One death is a tragedy, thousand of deaths are statistics“ .*

Later:

*„War in the cosmic age is different: the bystanders will be killed too, and all mankind will be wiped out. No powers have the right to do this just to settle their private quarrels. The planet is not their private property. It is the common prop-*

## Commemoration

---

*erty of all mankind, and so are its atmosphere and its oceans, and nobody has the right to pollute them."*

Then later:

*„It is time to place a sign on our little space-ship:*

*Playing with atomic bombs and polluting is strictly forbidden, maximum occupancy 3 1/2 billion persons“.*

He saw the future in education and in youth. He believed in an education which consisted not in an „*endless cramming, instead of inculcating a critical mind*“. His hope in young generation was demonstrated during his year as rector of the University of Szeged during which the positive creative energy of the students exploded and found expression. The present participants could describe this more fully.

He also writes in „What Next“:

*„Another foundation on which we can build a better new world (without which no new better world can be built), is decency, good will, human understanding and solidarity, the knowledge that we are all members of the same race, depending on one another. We cannot all love each other, but we can respect each other. This, together, is, I think, what the youth calls love“, in political relations. I am deeply convinced that the best policy, in the long run, is fairness, good will, and honesty, while trickery and double talk defeat themselves.“*

Albert Szent-Györgyi was a citizen of the world who worried of the fate of humanity but never forgot the land of his birth. The eighty-year-old scientist said in a television interview he gave in 1973 during his visit to Hungary that the greatness of a nation is not determined by the number of his armies, the strength of his arms, but by his contribution to science, arts and culture. Thus Hungary could become a great power.

I quote from „The Crazy Ape“:

*(What) „... will decide a nation's standing but the sum of its knowledge, its ethics, the gifts it makes to mankind, the happiness it gives to men, the measure in which it lifts human life.“*

One hopes and trusts that the country of his birth will listen to the words of Albert Szent-Györgyi and will prove his optimism. It is with this hope that I lay this wreath.



