

BIOKÉMIA

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

Szerkesztőbizottság:

ALKONYI ISTVÁN, BÁNFALVI GÁSPÁR, FALUS ANDRÁS, FÉSÜS LÁSZLÓ,
GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS

Felelős szerkesztő:

SZÉKÁCS ANDRÁS

XXVII. ÉVF. 1. SZÁM

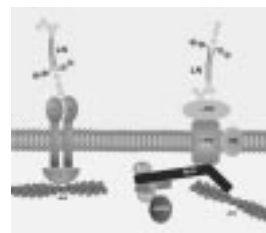
2003. MÁRCIUS

A tartalomról:

- ◇ Alacsony affinitású, nem konvencionális ligandumkötőhelyek megközelítése nem tradicionális módszerekkel: a Hsp90 ATP-kötőhelyeinek analízise – *Sóti Csaba és Csermely Péter*
- ◇ A sejtvázs és az extracelluláris mátrix kapcsolatának kutatása videomikroszkópos mozgáselemzés segítségével – *Méhes Előd*
- ◇ Rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S termékképzése a pH és a hőmérséklet függvényében – *Kupcsulik Bálint és Sevela Béla*
- ◇ Új távlatok a molekuláris biológiában – Bio-Science Szimpózium az Akadémián – *Nagy Zsolt*
- ◇ Vegyi anyagok toxikus hatásainak mérése és kockázatbecslése a talajban (könyvismertetés, Gruiz K.: Környezettoxicológia) – *László Elemér*

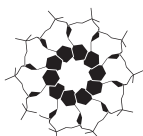
Címlapkép:

A laminint kötő receptorkomplexek feltételezett szerkezete Müller-gliasejtekben.
(Rövidítések: LN: laminin-1; α DG: alfa-disztroglikán; β DG: béta-disztroglikán;
SG: szarkoglikán; Dp71: 71 kD-os disztrofin; DB: disztrobrevin; Syn: szintrofin;
Act: filamentáris aktin; α : integrin alfa alegység; β : integrin béta alegység;
L: kapcsoló molekulák) (ld. a vonatkozó közleményt a 9–14. oldalakon.)



Contents:

- ◇ Identification of low affinity, non-conventional ligand binding sites with novel approaches: analysis of the Hsp90 nucleotide-binding sites – *Csaba Sóti and Péter Csermely*
- ◇ Investigation of the relationship between cytoskeleton and extracellular matrix by videomicroscopic motility analysis – *Előd Méhes*
- ◇ Recombinant protein production with *Pichia pastoris* Mut^S strain as a function of pH and temperature – *Bálint Kupcsulik and Béla Sevela*
- ◇ New perspectives in molecular biology – Bio-Science Symposium at the Hungarian Academy of Sciences – *Zsolt Nagy*
- ◇ Detection and risk assessment of toxic effects by chemicals in soil (book review) – *Elemér László*



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1518 Budapest, Pf. 7

e-mail: biokemia@nki.hu <http://www.webio.hu/biokemia>

Felelős kiadó: Dr. Friedrich Péter

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455

Készíti és terjeszti a **dart studio** (1137 Budapest, Újpesti rakpart 6. Tel.: 349-3426)

Ára • a Magyar Biokémiai Egyesület tagjai részére: tagdíj ellenében,
• nem egyesületi tagoknak: 680 Ft + postaköltség



Construct BAC or Fosmid Libraries of Clones That Are Inducible to High Copy Number



with CopyControl™ Cloning Kits

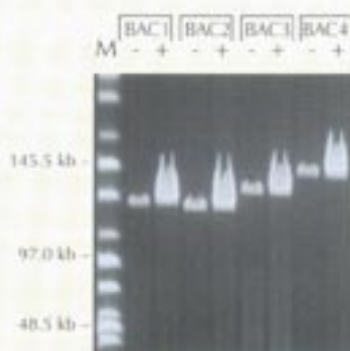
from EPICENTRE

EPICENTRE's CopyControl™ Cloning Kits – based on technology developed in the laboratory of Dr. Waclaw Szybalski¹ – enable the user to construct CopyControl BAC or CopyControl Fosmid libraries of single-copy clones to ensure insert stability and cloning of potentially toxic expressed DNA fragments. Then, whenever desired, the clones can be induced to high-copy number for high yields of DNA for fingerprinting, DNA sequencing and subcloning.

Learn more about the CopyControl cloning technology at www.epicentre.com/cc_tutorial.asp.

CopyControl™ Fosmid Library Production Kit

- Blunt-end cloning process ensures complete and unbiased libraries of >10⁶ clones containing 40-kb inserts.
- Get high yields of DNA when you induce your CopyControl Fosmid clones from single copy to 10-50 copies per cell.
- Construction of a complete fosmid library is much faster and easier than BAC library construction.



CopyControl™ BAC clones can be induced from single-copy to high-copy number for higher yields of DNA. DNA from an equal number of cells of induced (+) and uninduced (-) cultures of 4 CopyControl™ BAC clones was digested with Not I and analyzed by PFGE.

CopyControl™ BAC Cloning Kits

- Induce your CopyControl BAC clones from single copy to 10-20 copies per cell.
- Get high cloning efficiency and low backgrounds using the Cloning-Ready CopyControl pCC1BAC™ Vectors supplied in the kits.
- Kits for cloning BamH I-, EcoR I-, and Hind III-digested genomic DNA are available.

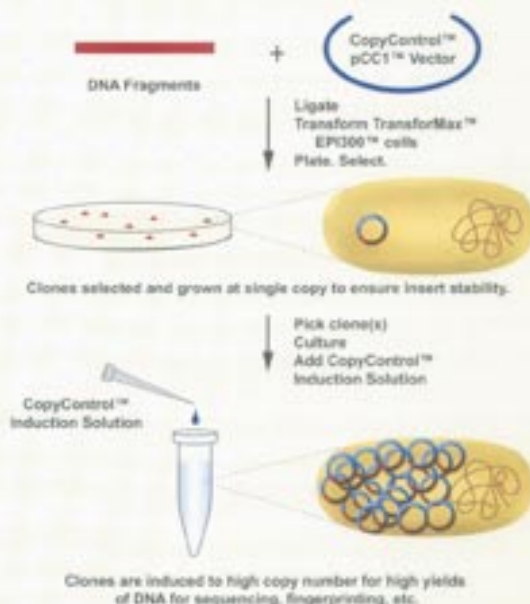
Now, Incorporate CopyControl Capability Into Existing Single-Copy BAC and Fosmid Clones.

Visit www.epicentre.com/transposomics.asp for information.

Reference

1. Wild, J. et al., (2002) *Genome Research* 12, 1434.

www.epicentre.com/ccfos.asp
www.epicentre.com/ccbac.asp
www.epicentre.com/transposomics.asp



CopyControl™ products are covered by U.S. Patent No. 5,874,259 licensed to EPICENTRE and by other patents pending and assigned to EPICENTRE which cover specific vectors, including without limitation, CopyControl™ pCC1™, pCC1BAC™ and pCC1FOS™, and specific cells, including without limitation, TransformMax™ EPI300™. By purchasing CopyControl systems or vectors, the purchaser receives the right to use the product purchased from EPICENTRE or an authorized distributor for life science research.



EPICENTRE

For the EPICENTRE distributor
in your country, visit

www.epicentre.com

kvalitex

Tudományos, Technológiai, Kereskedelmi Kft. • Scientific, Technological, Trading Ltd.

H-1136 Budapest, Pannónia u. 7. Tel.: (36-1) 340-4700 Tel./fax: (36-1) 339-8274 E-mail: kvalitex@exelero.hu

Alacsony affinitású, nem konvencionális ligandumkötőhelyek megközelítése nem tradicionális módszerekkel: a Hsp90 ATP-kötőhelyeinek analízise

Identification of low affinity, non-conventional ligand binding sites with novel approaches: analysis of the Hsp90 nucleotide-binding sites

Sóti Csaba, Csermely Péter

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani,
Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet,
1088 Budapest, Puskin u. 9.,
E-mail: csaba@puskin.sote.hu

Összefoglalás

Az alacsony affinitású molekuláris kölcsönhatások a szervezetünkben játszódó folyamatok fontos szabályozó tényezői, ezért a közeljövő orvostudományi kutatásainak vonzó célpontjai lehetnek. Az alacsony affinitású fehérje–ligandum kölcsönhatások és a nem konvencionális szerkezetű ligandumkötőhelyek tanulmányozására a hagyományos bioinformatikai és biokémiai megközelítések nem alkalmasak. A 90 kD molekulatömegű dajkafehérje nukleotid-kötőhelyeinek konkrét példáján keresztül bemutatjuk azokat a módszereket, melyekkel lehetővé válik a gyenge kötések detektálása, kvantitatív jellemzése és a kötőhelyek térképezése. A felületplazmon-rezonancia, a gyors megkötés nitrocellulóz szűrőmembrán-felületen, a ligandum affinitásjelölés és -hasítás teret nyerhet ott, ahol a konvencionális metodikák kudarcot vallanak, és elősegíthetik az alacsony affinitású kötőhelyek terápiás célpontokként történő hasznosítását.

Sóti, Cs., Csermely, P

Semmelweis University, Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry,
Puskin u. 9., H-1088 Budapest, Hungary,
E-mail: csaba@puskin.sote.hu

Summary

Low affinity molecular interactions are important determinants of biochemical processes in the living organism. They may become promising targets of medical research in the near future. Weak protein–ligand interactions as well as non-conventional ligand binding sites are not readily explored by traditional bioinformatics and biochemical techniques. Using the nucleotide binding sites of the 90 kD molecular chaperone, Hsp90, we give a brief review of methods capable to identify, quantify and map low affinity ligand binding sites. Biochemical and analytical approaches like surface plasmon resonance, rapid nitrocellulose filter binding, ligand affinity labeling and affinity cleavage may facilitate the identification and utilization of low affinity binding sites as novel therapeutic targets.

Bevezetés: a Hsp90 ATP-kötésének jelentősége

A 90 kD molekulatömegű stresszfehérje (Hsp90) az eukarióta sejt esszenciális, nagy mennyiségben előforduló dajkafehérjéje [1]. N-terminális ATP-kötő és C-terminális dimerizációs doménjét egy töltött aminosavakban gazdag régió köti össze. Bár rendelkezik passzív chaperonhatással is, jelentőségét egy dajkafehérje-komplex, a foldoszóma központi részeként kifejtett aktív chaperonhatása adja. ATP-

kötése és ATPáz aktivitása nélkülözhetetlen specifikus *kliensfehérjéinek* felgombolyodásához, illetve funkcionális konformációjuk stabilizálásához. Az eukariótákban tömegesen jelennek meg a labilis, több doménből álló, reaktív felszínnel rendelkező fehérjék, legjellegzetesebb képviselőik a jelátviteli és szabályozási folyamatok szigorúan Hsp90-re utalt kulcsmolekulái közül kerülnek ki (transzkripciós faktorok, pl. szteroidreceptorok, p53; kinázok, pl. src, Raf; polimerázok, pl. telomeráz) [2].

A Hsp90 az első olyan stresszfehérje, melynek specifikus gátlószere ismert. Az *N*-terminális ATP-antagonista geldanamycin gátolja a kliensfehérjék felgombolyodását, amely a növekedési és túlélési jelpályák kiesését, és a tumorok pusztulását eredményezi [3]. A geldanamycin származéka fázis II klinikai vizsgálatok tárgya, prototípusa lehet az új támadáspontú, chaperonantagonista daganatellenes szereknek. De a dajkafehérjék ATP-ciklusának farmakológias befolyásolása lehetőséget kínálhat egyéb patológias állapotok kezelésére is (pl. kliensfehérje-mutációk, polimorfizmusok korrekciója, a chaperonhatás fokozása, öregedés és degeneratív betegségek) [4,5].

A Hsp90 ATP-kötésének vizsgálata

1991-ben mutattuk ki, hogy a Hsp90 ATP/GTP-kötésre és autofoszforilációra képes [6], majd 1993-ban igazoltuk, hogy az ATP mélyreható szerkezeti átalakulást hoz létre a fehérjében [7]. A vizsgálatok legfontosabb tanulsága a nukleotidkötés szubmilimólos, viszonylag alacsony affinitása volt, melynek jelentősége csak a Hsp90 *N*-terminális doménjének kristályosítása [8], illetve egy nem kanonikus kötőhellyel rendelkező fehérjecsald felfedezése [9] után vált nyilvánvalóvá. Kezdeti predikciós próbálkozásaink ugyan felleltek Walker-típusú ATP-kötőhelyekre emlékeztető motívumokat a *C*-terminális doménen, de a GHKL-doméntípus felfedezése nyilvánvalóvá tette, hogy a hagyományos lineáris motívumok keresése csődöt mond az eltérő aminosavsorrend ellenére kirívóan hasonló harmadlagos szerkezetet felmutató fehérjék (topoizomerázok, hisztidin-kinázok stb.) esetén.

A Hsp90 nukleotidkötőhelyének szokatlan szerkezete és alacsony affinitása a szokványos biokémiai

metodikák nagy részét kudarcra ítéli (*I. táblázat*). Így például a Hsp90 *N*-terminális ATP-kötőhelye egyáltalán nem tűri az adeninyűrü szubsztitúcióját, a ribóz módosítása pedig nagyságrendekkel csökkenti az amúgy is gyenge kötés erősségét [Sóti és *mtsai*, közlésre benyújtva]. Ugyan egy nagyon gyenge ATP-kötést sikerült kimutatnunk radioaktív nukleotid natív gélen történő retardációjának kimutatásával, ebből sem kvantitatív, sem helyspecifikus információt nem sikerült nyernünk [10]. A Hsp90 ATP-kötésének első vitathatatlan biokémiai bizonyítékaként számon tartott γ -foszfát-kapcsolt ATP-Sepharose affinitáskromatográfia gyengesége a változékonny ligandumsűrűség és a kvantitatív jellemzés bizonytalansága [11,12, Sóti és *mtsai*, közlésre benyújtva]. Mivel a fenti kísérletek és előrejelzéseink egy második, *C*-terminális nukleotidkötőhely létezését valószínűsítették, érdeklődésünk olyan módszerek felé fordult, melyek kielégíthetik az alacsony affinitású kötőhely vizsgálatának kritériumait, melyek ideális esetben a következők: (1) a ligandum ne legyen módosítva (nincs sztérikus gátoltság); (2) csak a jelet vagy a jel okozta következményt detektáljuk, a háttér ne zavarjon (alacsony jel/zaj arány); (3) a kötés vagy az ennek kapcsán fellépő változás a ligandum-fehérje komplex eredeti oldatbeli koncentrációviszonyát és telítettségét őrizze meg (a mérés után többféle lehetőség az eredmény kiértékelésére); (4) nyújtson helyspecifikus információt (a kötőhely motívumainak azonosítása, két hasonló kötőhely megkülönböztetése). Az alábbiakban néhány – a fenti követelményeket, vagy azok egy részét kielégítő – nem tradicionális módszert szeretnénk jobban megismertetni az olvasóközönséggel (*II. táblázat*). A táblázatban szereplő módszerek közül részletesen csak az affinitáshasítást mutatjuk be.



Sóti Csaba (1970) orvos, PhD-fokozatát a Hsp90 szerkezet-funkció kapcsolatának kutatásából szerezte. Érdeklődési és kutatási területe a szervezet általános védekezőmechanizmusai és ezek patológias eltérései, különös tekintettel a stresszválaszra és az öregedésre. Fontosabb elismerések: Köztársasági Ösztöndíj (1991–1994), Madzsar József emlékérem (1993), Kovács Tibor-díj (1999), Veritas et Virtus-díj (2002), illetve a Magyar Biokémiai Egyesület Ifjúsági Díja (2002).

Csermely Péter 1958-ban született, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetének professzora és a Biorex Rt. vezető kutatója. Kutatási területe a stresszfehérjék működésével, az öregedéssel és a cukorbetegséggel kapcsolatos. Eddig négy könyve és több mint 120 tudományos cikke jelent meg. A cikkek össz-impaktja 260, idézettsége 1200 feletti. Tudományos teljesítménye több mint kétharmadát itthon végzett munkával érte el. 1995-ben egy új kezdeményezést indított el, amely mára már több mint ötezer tehetséges középiskolás diáknak nyújt lehetőséget a Magyarországon folyó legmagasabb szintű kutatásokba történő bekapcsolódásra. Csermely Péter a Magyar Biokémiai Egyesület főtitkára és a *Cell Stress Society International* alapító titkára.



I. táblázat Hagyományos módszerek a fehérje–ligandum kölcsönhatások tanulmányozásában. E módszerek kiválóak az erős kötések detektálására, az alacsony affinitású és nem konvencionális kötőhelyek felderítésében azonban számos hátrányos vonással rendelkeznek.

| MÓDSZEREK A MÉRÉSI ELV SZERINT | HÁTRÁNYOK |
|---|---|
| Indirekt (szerkezetvizsgáló) módszerek cirkuláris dikroizmus belső fluoreszcencia proteáz-hozzáférhetőség differenciálpasztázó kalorimetria | – a mérés jellegéből következően nem adnak közvetlen információt, vagy egyáltalán nem informatívak a kötésről |
| A nukleotid módosításán alapuló módszerek fluoreszcens analóg kötése affinitáskromatográfia affinitásjelölés módosított ligandummal | – fluorofór mérésnél a fehérjekoncentrációnak a K_D tartományában kell lennie – a szubsztitúció tovább csökkentheti az affinitást, gátolhatja a kötést – a szubsztituenssel aspecifikus kölcsönhatás alakulhat ki |
| A komplex elválasztásán alapuló módszerek gélfiltráció natív gélelektroforézis affinitáskromatográfia szilárd fázisú kötés (membránon) electrospray tömegspektrometria | – a minta a térfogat-változások, mosási lépések miatt kihígul, a ligandum disszociál – kevés mosásnál megnő az aspecifikus kölcsönhatások lehetősége – a fehérje állapota a gélelektroforézis, electrospray kapcsán változhat |
| A kötést vagy annak kapcsán fellépő reverzibilis változást detektáló módszerek mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) egyensúlyi dialízis izotermális titrációs kalorimetria (ITC) | – a fehérjekoncentrációnak a K_D tartományában kell lennie – a kötés (a jel) az eredeti viszonyok változása (pl. hígulás) során változik |

II. táblázat A fehérje–ligandum kölcsönhatások tanulmányozásának nem tradicionális lehetőségei. A különféle módszerek előnyeinek és hátrányainak ismeretében eldönthetjük, hogy a kívánt információt melyik módszerrel vagy mely módszerek kombinációjával szerezzük meg.

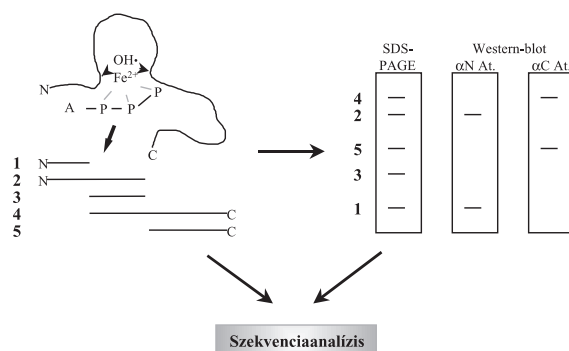
| MÓDSZER | ELV | ELŐNY | HÁTRÁNY | IRODALOM |
|---|--|---|--|----------|
| Felületplazmon-rezonancia (SPR) | immobilizált fehérje ligandumkötése következtében létrejövő törésmutató-változás | – a jel szelektív detektálása – valós idejű mérés – kvantitatív jellemzés | – nem közvetlenül a kötést méri – immobilizálási nehézségek – nincs adat a sztöchiometriára vonatkozóan | [10,13] |
| Megkötődés gyors nitrocellulózfilteren | radioaktív ligandum–fehérje komplex visszatartása | – nagyszámú minta gyors, kvantitatív jellemzése | – nem ad helyspecifikus információt | [12,14] |
| Affinitásjelölés | reaktív radioaktív ligandum kovalens adduktot képez a kötőhelyen (pl. bázis UV-fotolízise) | – egyszerűség, gyorsaság | – alacsony hatásfokú jelölés | [12,15] |
| Ujjlenyomatvétel kémiai proteolízissel | a ligandum megvédi a kötőhelyet a hasadástól (a DNS-footprinting mintájára) | – egyszerűség | – negatív jel, konformációváltozás hatására is – a fehérje terminálisának jelölését igényli – csak hozzávetőleges helymeghatározás | [16,17] |
| Oxidatív affinitáshasítás | a fehérje ligandum-kelált fém általi redox hasítása a kötőhelyen | – egyszerűség – kötőhely-meghatározás | – a fehérje terminálisának jelölését és/vagy – érzékeny detektálási/analitikai módszert igényel | [12,18] |

Oxidatív affinitáshasítás

Az affinitáshasítás kombinálja az affinitásjelölés és az ujlyenomatvétel előnyeit, azok hátrányai nélkül. Szemben az ujlyenomatvételrel, itt nem a hasítás hiánya, hanem megléte a kötés indikátora, ezért a helyzet sokkal tisztább, konformációváltozástól adódó jelek pedig nem zavarhatnak (ld. II. táblázat). A reakció alapja itt is kémiai proteolízis, azzal a különbséggel, hogy a ligandumot vagy partnerfehérjét valamilyen módon komplexbe hozzuk egy redox-ingázásra képes fémionnal (pl. $\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$ vagy $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^{+}$) [19]. A kelált fém oxidációja hidroxilgyököket generál, amelyek rövid életidejük és hatótávolságuk következtében közvetlenül a kötőhelyen hasítják a polipeptidláncot. A reakciót először a kalmodulin trifluoperazin-kötőhelyének és a streptavidin biotinkötőhelyének vizsgálatára használták, ahol a vasat, illetve a rezet a ligandumhoz kovalensen kapcsolt EDTA kelálta [20,21]. Ennél jóval szerencsésebb a helyzet a divalens kation-ligandum komplexet kötő fehérjék térképezésénél, hiszen itt a vasiont maga a ligandum szállítja oda, minden külső beavatkozás nélkül. Ily módon tanulmányozták a NADP-specifikus izocitrát-dehidrogenáz izocitrát-kötőhelyét [22], és a karbamoil-foszfát szintetáz egyik ATP-kötőhelyét [18]. A fenti esetekben a foszfátcsoportok a kelátorok, ezért a hasítás a nukleotidok divalens kation-foszfátkötőhelyeiről ad helyspecifikus információt. A módszer érdekessége és bizonyító ereje ellenére nem széles körben ismert.

A reakció elve sematikus az 1. ábrán látható. A vas(III) állandó redukcióját feleslegben adott aszkorbát biztosítja, amelyet a szintén feleslegben jelen lévő ligandum – jelen esetben nukleotid – kelál és szállít oda a kötőhelyre. Az idő és a koncentráció finomra hangolásával biztosíthatjuk a fehérjeláncok egyszeri hasadását, így megelőzhetjük a kinetikai hatásokat és az aspecifikus fragmentációt. Szerencsére a beállítás nem bonyolult, a kötő domén háromdimenziós szerkezete egy hasadás alkalmával felbomlik, ami nagy affinitásbeli csökkenést eredményez. Pl. denaturálószer (SDS, guanidinium-hidroklorid) alkalmazásával csak minimális háttér-fragmentációt kaptunk. Ha mégis nehézség adódik, a kötőhelyen történő szelektív hasítást gyökfogók (pl. glicerol) hozzáadásával lehet erősíteni. A reakció specifitását a ligandum kötéséhez szükséges divalens kation általi gátlással,

illetve ha rendelkezésre állnak, specifikus gátlószerre vagy kötéskeptelen mutánsok felhasználásával lehet tesztelni. Mivel az utóbbiak megléte általában azt jelenti, hogy a kötőhely már ismert, ezért az újonnan felfedezett kötőhelyek esetén nem marad más hátra, mint a hasítás helyének azonosítása. Ez többféle módon történhet. A terminális (fúziós partner, „tag”) elleni antitestekkel ujlyenomatot vehetünk a kötőhelyről. Végleges választ a hasítás helyének aminosavra pontos felfedése ad. Az Edman-degradáció mellett a korszerű tömegspektrometriás módszerekkel a fragmentumok szekvenálhatók, a terminalist tartalmazó fragmentumok molekulatömege nagy pontossággal viszont csak Q-TOF készülékekkel határozható meg.



1. ábra Nukleotid-kötőhelyek térképezése oxidatív nukleotid affinitáshasítással. Az adenozin-trifoszfát (A-P-P-P) által kelált vas oxidációja hidroxilgyököket generál, amelyek oxidatív módon hasítják a polipeptidláncot a kötőhelyen. A keletkező fragmentumok pl. SDS-gélelektroforézis és Western-blot segítségével tehetők láthatóvá, a fragmentumok szekvenációját az oldatból vagy a blotmembránról történő Edman-degradációval, illetve tömegspektrometriával határozható meg.

A Hsp90 legnagyobb mennyiségben keletkező N-terminális ADP/ATP-kötő fragmentumát sikerült Patthy András segítségével szekvenáltatnunk. A fragmentum hasítási helye hajszálra egyezett a kristályszerkezetből ismert Mg- α -foszfát kötőhellyel, mely ugyanakkor a GHKL-típusú nukleotid-kötőhelyek III. motívuma. Ezáltal először született közvetlen bizonyíték a módszer megbízhatóságára [12]. A Hsp90 középső doménjén találtunk egy γ -foszfátkötő motívumot, mely a GHKL-fehérjékben szintén jelen van. Sajnos ezt a fragmentumot nem sikerült szekvenálni, de a család fehérjetagjainak manuális másodlagos szerkezeti illesztésén alapuló módszer bevezetésével, illetve anti-

test építóp-térképezéssel a motívum helyét behatároltuk [12]. Eredményeink szerint az affinitáshasítás alkalmazható a Hsp90 nukleotid specificitásának vizsgálatára, a kötőhelyek biokémiai jellemzésére [Sőti és *mtsai*, közlésre benyújtva]. Az affinitáshasítás segítségével egyéb fehérjék ATP-kötését is sikerült kimutatnunk [nem közölt adatok]. Hasonló elven működik a nukleotid γ -foszfát-kötőhelyek kimutatásánál hasznos vanadát-fotooxidációs hasítás, ahol az ultraibolya fény hatására keletkező vanadát-gyökök hasítják a polipeptidláncot [23]. A módszert Kern András és Váradi András hozta tudomásunkra, amiért ezúton is köszönettel tartozunk.

A nem tradicionális módszerekkel kapott eredményeink

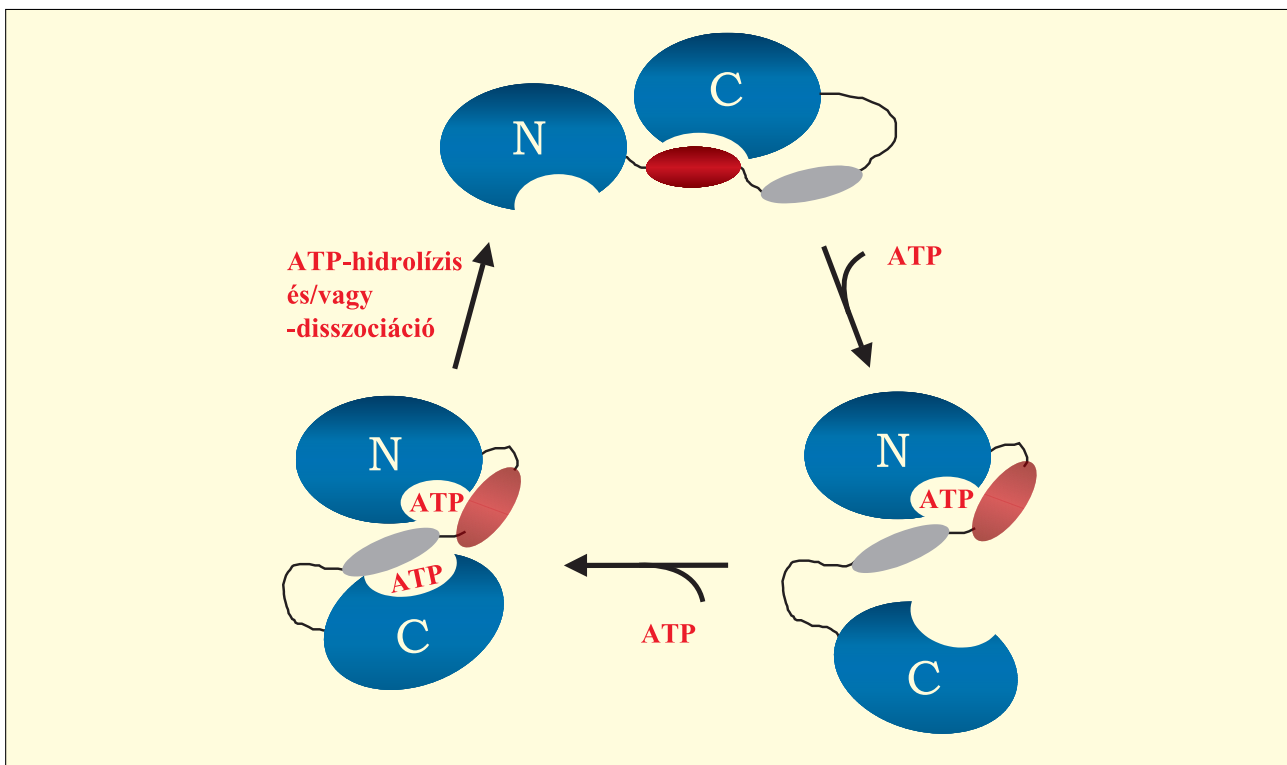
A natív gélkötés, fluoreszcenciaspektroszkópia és cirkuláris dikroizmus mérések kapcsán ébredt gyanúkat, miszerint a Hsp90 rendelkezik egy geldanamicinnel nem gátolható nukleotid-kötőhellyel, SPR-rel és fotoaffinitás-jelöléssel támasztottuk alá, illetve nitrocellulóz szűrőmembránon történő megkötéssel kinetikailag jellemeztük a két alacsony affinitású kötőhelyet. Az affinitáshasítás alkalmazásával sikerült bizonyítanunk, hogy a Hsp90 második nukleotid-kötőhelye a fehérje középső doménjén helyezkedik el. A fragmentumokat eddig sem szekvenálással, sem tömegspektrometriával nem sikerült azonosítani. Antitest építóp-térképezés és a Hsp90 proteolitikus fragmentumainak/trunkációs mutánsainak látszólagos molekulatömege alapján szerkesztett kalibrációs „egyenes” segítségével a C-terminális kötőhely foszfát-kötő régiója a középső doménen helyezkedik el, az elsődleges szerkezetben átfed az N-terminális γ -foszfát-kötő motívummal (2. ábra). Szintén az affinitáshasítás révén derült fény arra, hogy az alapállapotban rejtett C-terminális nukleotidkötő domént az N-terminális domén ATP-kötése által működtetett „molekuláris kapcsoló” teszi az ATP számára elérhetővé.

A C-terminális kötőhely ugyan geldanamicinre nem érzékeny, novobiocinnal és ciszplatinnal viszont specifikusan gátolható. A ciszplatin feltehetően a Hsp90 reaktív SH-csoportjain keresztül fejt ki hatását. Míg a novobiocin az N-terminális ATP-kötőhelyet is allosztérikusan gátolja, és mindenféle Hsp90-ko-chaperon-komplexet megbont, a ciszplatin csak a C-terminálison kötő ko-chaperonra hat [12].

A ciszplatin kemoterápiás szer, és a Hsp90-et gátló koncentráció a protokoll során alkalmazott tartományba esik. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a Hsp90 részt vehet a ciszplatin hatásainak közvetítésében. A ciszplatin Hsp90-működésére való hatását egy német kutatócsoporttal együttműködésben vizsgáljuk [Rosenhagen és *mtsai*, közlésre benyújtva]. Szemben a geldanamicinnel és a novobiocinnal, a Hsp90-függő kliensfehérjék nagy részének funkcióját nem gátolja, és nem indukál hősokk-választ, ezáltal a daganatok geldanamicin okozta rezisztenciája kikerülhető. Eredményeink alapján a ciszplatin Hsp90-specifikusabb származékai szelektívebb Hsp90-inhibitorok lehetnek, kevesebb mellékhatással, melyek felhasználhatók pl. hiperszteroid állapotok kezelésére is. A ciszplatin Hsp90-gátló adjuváns hatása pedig magyarázhatja, miért értek el a hormonfüggő here-, prosztatata- és emlőrákok gyógyításában eddig is kiváló eredményeket ciszplatintartalmú kemoterápiás protokollokkal.

Záró gondolatok

Az utóbbi években számos paradigma dőlt meg, vagy inog. Ilyen az Anfinsen-féle szabály vagy a statikus, rigid szerkezettel rendelkező fehérjéről alkotott elképzelések. Ehhez hasonlóan a citoplazma már nem individuális fehérjék kaotikus halma, hanem dinamikusan változó, alacsony affinitású fehérjekomplexek rendezett hálózata. A hálózatokra *in vivo* feltehetően számos gyengén kötődő kis molekula fejt ki szabályozó hatását. A kis affinitású endogén regulátorok hatását hasonló affinitású exogén vegyületekkel befolyásolhatjuk, amint erre már a múltban is több gyógyszer esetén példa kínálkozott, így az alacsony affinitású kölcsönhatások tanulmányozása teret hódíthat a közeljövőben. De az alacsony affinitású ligandumok gyakran nem konvencionális kötőhelyeinek jóslására és feltérképezésére nem alkalmazhatók a hagyományos bioinformatikai és biokémiai módszerek. Áttekintésünk a 90 kD-os dajkafehérje példáján bepillantást engedett abba, hogyan valósítottuk meg az alacsony affinitású fehérje-ligandum kölcsönhatások vizsgálatát. Kérdéses, hogy a gyógyszeripar fejlődése megbirkózik-e az időigényes biokémiai vizsgálatok és a nagy kapacitású robotizált szűrőrendszerek egyesítésének nem kis feladatával. Amíg ez nem történik meg, addig a fentiekhez hasonló módszerek csupán a felfedezőkedvű tudóstársadalom eszköztárát gazdagítják.



2. ábra A Hsp90 ATP-függő molekuláris kapcsolójának modellje. A jól ismert N-terminális doménhez kötő ATP (N) felszabadítja az eddig ismeretlen C-terminális nukleotid-kötőhelyet (C) a töltött régió (piros) által kifejtett gátlás alól. A fehérjében átfedő foszfátkötő motívumok (szürke) is megtalálhatók.

Irodalomjegyzék

- [1] Csermely, P., Schnaider, T., Sóti, Cs., Prohászka, Z., Nardai, G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, **79**: 129–168.
- [2] Pratt, W. B., Toft, D. O. (2002) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exptl. Biol. Med.*, nyomtatás alatt.
- [3] Neckers, L. (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol. Med.*, **8**: S55–S61.
- [4] Sóti, Cs., Csermely, P. (2002) Chaperones come of age. *Cell Stress Chaperones*, **7**: 186–190.
- [5] Sóti, Cs., Nardai, G., Csermely, P. (2002) Stresszfehérjék az orvostudományban. *Orvosi Hetilap*, nyomtatás alatt.
- [6] Csermely, P., Kahn, C. R. (1991) The 90 kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP-binding site and autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.*, **266**: 4943–4950.
- [7] Csermely, P., Kajtár, J., Hollósi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C. R., Gergely, P. Jr., Sóti, Cs., Mihály, K., Somogyi, J. (1993) ATP induces a conformational change of the 90 kDa heat shock protein (hsp-90). *J. Biol. Chem.*, **268**: 1901–1907.
- [8] Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, **90**: 65–75.
- [9] Dutta, R., Inouye, M. (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **25**: 24–28.
- [10] Sóti, Cs., Csermely, P. (1998) Characterization of the nucleotide binding properties of the 90 kDa heat shock protein (Hsp90). *J. Biosci.*, **23**: 347–352.
- [11] Grenert, J. P., Sullivan, W. P., Fadden, P., Haystead, T. A. J., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H. J., Schulte, T. W., Sausville, E., Neckers, L. M., Toft, D. O. (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ADP/ATP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.*, **272**: 23843–23850.
- [12] Sóti, Cs., Rácz, A., Csermely, P. (2002) A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90: N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.*, **277**: 7066–7075.
- [13] Sóti, Cs., Radics, L., Yahara, I., Csermely, P. (1998) Interaction of vanadate oligomers and permolbdate with the 90-kDa heat-shock protein, Hsp90. *Eur J. Biochem.*, **253**: 611–617.
- [14] Wong, I., Lohman, T.M. (1993) A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 5428–5432.
- [15] Biswas, S.B., Kornberg, A. (1984) Nucleoside triphosphate binding to DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. A direct photoaffinity labeling study. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7990–7993.
- [16] Heyduk, E., Heyduk, T. (1994) Mapping protein domains involved in macromolecular interactions: a novel protein footprinting approach. *Biochemistry*, **33**: 9643–9650.
- [17] Baichoo, N., Heyduk, T. (1997) Mapping conformational changes in proteins: application of a protein footprinting technique to cAMP-induced conformational changes in cAMP receptor protein. *Biochemistry*, **36**: 10830–10836.
- [18] Alonso, E., Rubio, V. (1995) Affinity cleavage of carbamoyl-phosphate synthetase I localizes regions of the enzyme interacting with the molecule of ATP that phosphorylates carbamate. *Eur. J. Biochem.*, **229**: 377–384.
- [19] Datwyler, S.A., Meares, C.F. (2000) Protein-protein interactions mapped by artificial proteases: where factors bind to RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.*, **25**: 408–414.
- [20] Schepartz, A., Cuenoud, B. (1990) Site-specific cleavage of the protein calmodulin using a trifluoperazine-based affinity reagent. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**: 3247–3249.
- [21] Hoyer, D., Cho, H., Schultz, P.G. (1990) A new strategy for selective protein cleavage. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**: 3249–3250.
- [22] Soundar, S., Coleman, R.F. (1993) Identification of metal-isocitrate binding site of pig heart NADP-specific isocitrate dehydrogenase by affinity cleavage of the enzyme by Fe²⁺-isocitrate. *J. Biol. Chem.*, **268**: 5264–5271.
- [23] Cremo, C.R., Grammer, J.C., Yount, R.G. (1989) Direct chemical evidence that serine 180 in the glycine-rich loop of myosin binds to ATP. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6608–6611.



BIO-SCIENCE

Akció február 15-től április 30-ig

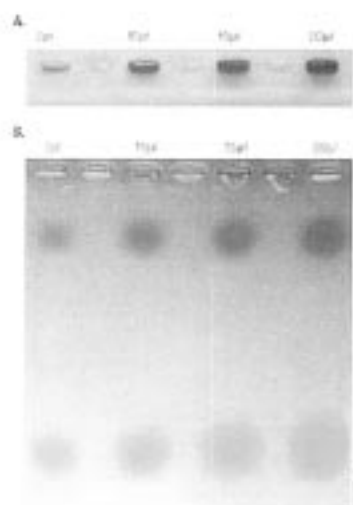
35% árengedménnyel vásárolhatók a következő
Promega termékek:

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

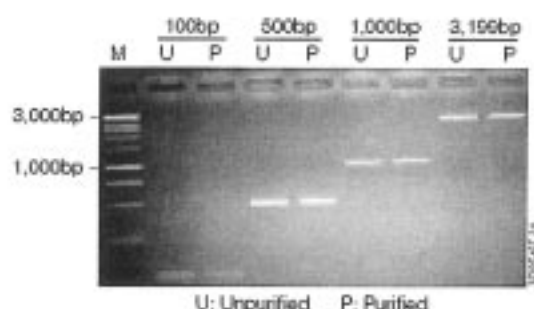
A9181 50 preps
A9282 250 preps

„Green” GoTaq akció

M3001 „Green” GoTaq DNA Polymerase 100 U 6 000 Ft



GoTaq DNA Polymerase reactions with 1X Green
GoTaq Reaction Buffer before (Panel A) and after
(Panel B) electrophoresis

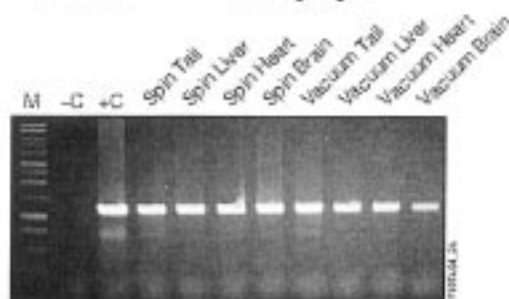


U: Unpurified P: Purified

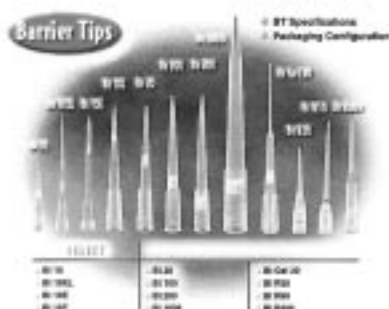
Gel analysis of 100 bp, 500 bp, 1 000 bp and 3
199 bp DNA fragments before (U=unpurified)
and after (P=purified) gel extraction using the
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

Wizard SV Genomic DNA Purification System

A2360 50 preps
A2361 250 preps



Twenty mg of each tissue was processed by either
spin or vacuum method and eluted as instructed. One
 μ l of each eluate was amplified for a 1.2kb portion of
the single-copy IL-1 β gene using a 30 cycle program.



Continental Lab Products akció

0,2 ml-es PCR cső 7 000 Ft/1000 db
0,5 ml-es PCR cső 6 000 Ft/1000 db
filteres pipettacsúcsok 15 000 Ft/960 db



Bio-Science Kft.

1119 Budapest, Andor u. 47-49.

Tel.: 463-5077, 463-5069 Fax: 463-5261

E-mail: bio-sci@bio-science.hu Internet: www.bio-science.hu

A sejtvez és az extracelluláris mátrix kapcsolatának kutatása videomikroszkópos mozgáselemzés segítségével

Investigation of the relationship between cytoskeleton and extracellular matrix by videomicroscopic motility analysis

Méhes Előd

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Anatómiai és Szövetani Tanszék, 1078 Budapest,
István utca 2., Tel.: (1) 478-4225, Fax: (1) 478-4224

Összefoglalás

Retinából izolált Müller-gliasejteket használtunk modellrendszerként a laminin-1 sejtmozgásra gyakorolt hatásának vizsgálatához, számítógép vezérelt videomikroszkóppal készített gyorsított („time-lapse”) mozgóképek statisztikai elemzése segítségével. Eredményeink szerint a lamininnal borított felszín növeli a tenyésztett Müller-sejtek motilitását és útkereső aktivitását, továbbá serkenti a sejtek nyúlvány-növesztő, -visszahúzó dinamizmusát. A homogén laminin-1 felszínen tapasztalt útkereső aktivitásnövekedése és a nyúlványdinamika fokozódása arra mutat, hogy a laminin-1 és a Müller-sejtek között funkcionális kapcsolat áll fenn, amely feltételezhetően a sejtvez felé irányuló jelátvitellel párosul.

Morfológiai következményként azt feltételezzük, hogy a laminin-1 szerepet játszik a Müller-sejtek *in vivo* nyúlványarborizációjában. Ez a folyamat elvezet ahhoz, hogy a Müller-glia-végtalpából kialakul a retinát az üvegtesttől elválasztó funkcionális barrier, a belső határhártya. A laminin motilitást növelő hatásának átvitelében a lamininreceptoroként ismert disztroglikán-komplex és az integrinek játszhatnak szerepet. Tervezett kísérleteinkben megpróbáljuk tisztázni a disztroglikán-komplex molekuláris összetételét, és megkíséreljük befolyásolni vagy utánozni laminin-1 funkcionális doméneinek kötődését a receptorokhoz, hogy a laminin-1 motilitást serkentő hatásának mechanizmusát feltérképezhessük.

Méhes, E.

Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Department of Anatomy and Histology, H-1078 Budapest, István u. 2., Hungary,
Phone: (+36 1) 478-4225, Fax: (+36 1) 478-4224

Summary

Muller glial cells isolated from retinae are used as a model system to investigate the impact of laminin-1 on cell motility with the aid of statistical analysis of computer-controlled videomicroscopic time-lapse movies. We demonstrate that laminin-1 covered surface increases motility and path-searching activity of Muller cells *in vitro* and it also enhances the cells' process formation/withdrawal dynamism. Increase in path-searching activity and cell process dynamism on homogeneous laminin-1 layer indicates that there is a functional relationship between laminin-1 and Muller cells presumably involving signaling towards the cytoskeleton.

As a morphological consequence we hypothesize that laminin-1 is involved in process arborization of Muller cells *in vivo*, resulting in the formation of the internal limiting membrane of the retina: a functional barrier made up of Muller glial processes isolating retinal space from the vitreous body. The motility increasing effect of laminin may be transmitted towards the cytoskeleton by integrins and dystroglycan, known as laminin receptors. We will attempt to clarify the molecular composition of the dystroglycan complex, and we will try to influence or mimic the binding of laminin-1 functional domains to their receptors in order to elucidate the mechanism of the motogenic effect.

Bevezetés

A többsejtű lét evolúciós kialakulásának bizonyára kulcsfontosságú mérföldköve volt a sejt–sejt közötti kommunikációt biztosító, sejtmembránhoz kapcsolt fehérjekomplexek kialakulása. Ezek a komplexek teszik lehetővé egyúttal a sejtek és az extracelluláris tér makromolekulái közötti kapcsolatokat is. Ezeket a fehérjéket, amelyek extracelluláris mátrix (sejtközötti állomány, ECM) molekulák gyűjtőnéven ismertek, természetesen ugyancsak sejtek termelik; felhalmozódásuk és monomerekből kiinduló önösszeszerelődésük az extracelluláris térben vagy a sejtek felszínén történik. Kezdetben csak térkitöltő és mechanikai stabilizáló szerepet tulajdonított nekik a sejtbiológia (pl. a kollagénrostok szerepe a kötőszövetekben), azonban később ismertté vált, hogy az ECM molekuláinak specifikus sejtfelszíni receptorai vannak számtalan sejt típuson és egyfajta térben rögzített, pozicionális információt jelenthetnek az őket kötni képes sejtek számára a sejt morfológia, -mozgás és -osztódás szabályozásában.

Az ECM molekulái – így a laminin, a fibronectin, a fibulin, a tenasczin, a kollagén, elasztin, a perlekán és az entaktin is – a különféle sejtek felszínén lévő receptorkomplexekhez kötődnek, és hatást gyakorolnak a sejt vázra és a sejt mozgásra. Több ECM-molekula esetében ez a hatás részleteiben is ismert. A legismertebb mátrixreceptor-családot a heterodimer szerkezettel rendelkező integrinek alkotják. Alegység-összetételük gazdag kombinációs lehetőségeitől függően az integrinek különféle ECM-molekulákat képesek specifikusan kötni. Az intracelluláris oldalon kapcsolómolekulák csoportja (talin, vinkulin, alfa-aktinin) teremt kapcsolatot a plazmamembrán alatti sejt váz aktinhálózatával. Az integrinek és kísérőmolekuláik adhéziós foltokba rendeződnek, ahol kinázok (pl. az src gén által kódolt tirozin-kináz) jelenléte jelátviteli tevékenységre utal. Innen indulnak a sejtalakfenntartásban szerepet játszó vastag aktinrostok, az ún. stresszrostok is [1].

Egy másik ECM-receptor a disztroglikán, amelynek kapcsolatai részleteiben kevésbé ismertek. Ismert az, hogy a heterodimer szerkezetű disztroglikán laminint, perlekánt és agrint is képes kötni. A disztroglikán citoplazmatikus oldalán több csatlakozó molekulából (disztrofinok, szintrofinok, disztrobrevin) álló komplex szerveződik, amely izomsejtekben kapcsolódik az aktinvázhoz. Jelátviteli tevékenységre utal nitrogén-oxid-szintáz kapcsolódása a komplexhez [2]. Mindezeket a molekuláris kölcsönhatásokat foglalja össze az 1. ábra a modellrendszerünket jelentő Müller-gliasejtekben.

1. ábra (lásd a címlapon) *A laminint kötő receptorkomplexek feltételezett szerkezete Müller-gliasejtekben. (Rövidítések: LN: laminin-1; α DG: alfa-disztroglikán; β DG: béta-disztroglikán; SG: szarkoglikán; Dp71: 71 kD-os disztrofin; DB: disztrobrevin; Syn: szintrofin; Act: filamentáris aktin; α : integrin alfa alegység; β : integrin béta alegység; L: kapcsoló molekulák)*

A sejt és az ECM közötti kölcsönhatások különösen a daganatsejtekben és az embrionális fejlődés során bírnak jelentőséggel. A daganatsejtek mozgását befolyásolja az őket körülvevő ECM. Ez különösen így van a vérerek alaphártyáján történő átjutáskor: az invazív sejtek integrinokkal kötődnek az alaphártya lamininmolekuláihoz, majd a felszínükön lévő IV. típusú kollagént hasító kollagenázzal bontják az alaphártyát, miközben átlépnek rajta. Az áttéteket alkotó tumorsejtek specifikus kolonizációja bizonyos szövetekben szintén függ az ECM szövetspecifikus sajátosságaitól.

Az embrionális fejlődésben – pl. fejlett gerinceseknél – a szöveti, szervi differenciáció során sok anatómiai területen van kitüntetett jelentősége a célzott sejt vándorlásnak, illetve az egyedfejlődésben az idegrendszer kialakulása során a sejt nyúlvány-növekedésnek. A célzott sejt vándorlás és nyúlvány-növekedés irányítója lehet részint valamely koncentrációfüggően ható kemotaktikus anyag jelenléte, részint pedig a szomszédos sejtek felszínén vagy az extracelluláris térben elhelyezkedő



Méhes Előd az Eötvös Loránd Tudományegyetemen végzett 1996-ban biológusként a sejt- és fejlődésbiológiai szakirányon. 1997-től az Állatorvostudományi Egyetem (ma Szent István Egyetem) Doktori Iskolájában folytatja doktori tanulmányait. Kísérletes munkáit az Anatómiai és Szövettani Tanszéken, az ELTE Biológiai Fizika Tanszékével együttműködésben végzi. Érdeklődési területe a sejtmozgás és a sejt váz, illetve ezek kapcsolata a sejt közötti állomány makromolekuláival.

fehérjék mintázata, amelyek egyrészt letapadási felszínt nyújtanak a vándorláshoz/nyúlványnövekedéshez, másrészt pozicionális információként részt vesznek annak térbeli irányításában. A vándorló sejteknek néha saját méretükhöz képest nagy távokat kell leküzdeniük, többféle sejtípus között kell áthaladniuk, hogy elérjék azt a területet, ahol a számukra programozott feladatot elláthatják. Egy ismert példa, hogy az embrionális fejlődés során a kialakuló központi idegrendszerből kilépő bizonyos sejtek ECM-molekulákból (fibronektin) ösvényen haladva vándorolnak a mellékvese-velőálmányba.

Az agyidegek kötegelte szerveződésekor a növekvő axonok irányításában a szomszédos sejtek felszínén lévő „taszító” molekulák (pl. szemaforinok) és a szomszédos axonok felszínén lévő „kötegelő” molekulák jelenléte játszik irányító szerepet (*axon guidance*). Az axonok, illetve az axonokból kötegelődő idegek célirányos növekedésénél ugyancsak az extracelluláris mátrix és sejt felszíni adhéziós molekulák célzott összhangja szükséges az állatvilág olyan anatómiai bravúrjainak létrejöttéhez, mint pl. a zsiráf 6 méter hosszú nervus vagusa, vagy a bálna agykérgi mozgatómezőjétől a gerincvelőig nyúló piramispályája.

Kísérleti modellünkben retinából izolált Müller-gliasejtek esetében tanulmányozzuk az ECM-molekulák hatását. A Müller-sejtek a retina teljes keresztmetszetét átérő gliasejtek, amelyek szorosan

záródó nyúlvány végtalpaikkal felépítik a retinát az üvegtesttől elválasztó belső határhártyát; a fotoreceptorokkal alkotott szoros kapcsolataik (*tight junction*) révén pedig részt vesznek a retinát határoló másik struktúra, a külső határhártya felépítésében is (2. ábra).

A Müller-sejtek *in vivo* környezetében megtalálható lamininok, kollagén IV és más ECM-molekulák is, amelyek e sejtek morfológiájának és élettani szerepeinek kialakulásában és fenntartásában szerepet játszhatnak. A laminin-1-molekulák megtalálhatók a retina belső határhártyájában (*membrana limitans interna*) is, amely fontos barriert képez a retina ion- és metabolit-homeosztázisában és elválasztja a retinát az üvegtesttől.

Ismert, hogy az ECM-molekulák közül a laminin-család tagjai motilitást serkentő (motogén) hatással vannak több sejtípusra. Kísérleteinkben arra keressük a választ, hogy a laminin-1 milyen hatással van a Müller-sejtek motilitására, valamint a motilitás – korábbi vizsgálatokhoz képest több információt adó – kvantitatív paramétereire, és ez a hatás milyen sejt felszíni receptorkomplexeken és kapcsoló molekulákon keresztül közvetítődik a sejt váz felé.

Anyag és módszer

Az itt ismertetett módszerek részletes leírása a *Cell Motility and the Cytoskeleton* című folyóiratban megjelent cikkben szerepel [3].

Sejtenyészetek

Posztnatális 14 napos C57BL10 egerek retináit izoláltuk és darabokra vágtuk 10% főtális borjúsavót (FCS, GIBCO) tartalmazó DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) tápfolyadékban steril körülmények között. A 37 °C hőmérsékletű, 5% CO₂-tartalmú, 100% páratartalmú inkubátorban tartott tenyészetekben a retinadarabokból 3–5 nap elteltével morfológiai és immuncitokémiai tulajdonságaik alapján Müller-gliasejtekként azonosítható sejtek vándoroltak ki az aljzatra és egyrétegű (*monolayer*) tenyészetet alkottak. Ugyanezt a módszert alkalmaztuk posztnatális 10 napos Wistar-patkányokból izolált Müller-sejtek esetén is. A retinadarabokat a tápoldat cseréjével távolítottuk el. A tenyészeteket meghatározott idejű tenyésztést követően 5 mM EDTA-tartalmú izotóniás foszfátpuffer (PBS) közegben lemostuk az aljzatról, majd a sejteket DMEM 10% FCS tápfolyadékban reszusz-



2. ábra A retina kifejlett szerkezetének egyszerűsített képe emlős állatokban

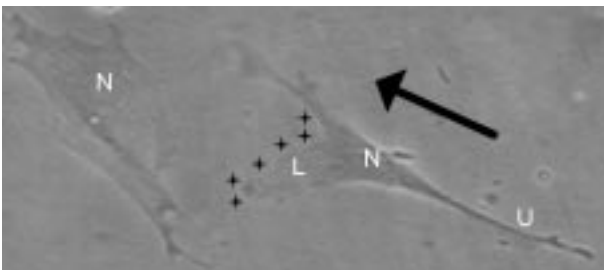
pendáltuk, és kezeletlen, illetve 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laminin-1-oldattal (EHS laminin, SIGMA) szobahőmérsékleten egy éjszakán át előinkubált tenyészedénybe ültettük át.

Számítógépes videomikroszkópia

A tenyészeteket 37 °C hőmérsékletet, 5% CO_2 -atmoszférát és 100% páratartalmat biztosító mini-inkubátorba helyeztük. Az inkubátort inverz fáziskontraszt-mikroszkóp léptetőmotorokkal vezérelhető tárgyasztalára szereltük, és 10 percenként digitális felvételt készítettünk a mikroszkópos látóterekről (5–40 db), amelyeket a számítógép-vezérelt léptetőmotorok előreprogramozott módon beállítottak. Az egyes látóterekről készített képekből gyorsított (*time-lapse*) mozgóképeket készítettünk. Számítógépes követőprogram segítségével rögzítettük az egyes képkockákon lévő sejtek pozícióját, majd a pozíciókból számoltuk az egyes sejtek útvonalát (trajektóriát) és a sejtmozgás egyéb paramétereit [4,5].

Statisztikai elemzések

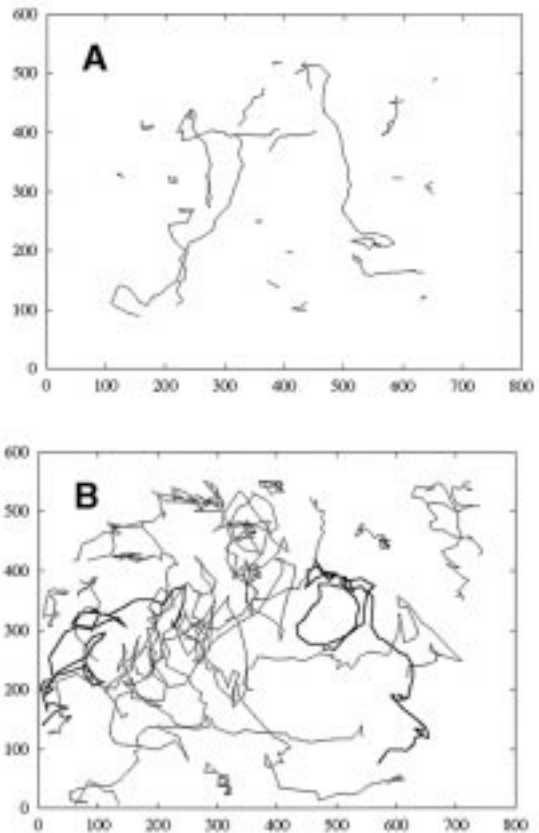
Számoltuk a sejtenyészetekben mérhető sebesség eloszlását. Ezt sebességeloszlás-függvénnyel ábrázoltuk. A sebességeloszlás azoknak a sejteknek a számát mutatja (logaritmikus skálán), amelyek egy véletlenszerűen választott időpontban egy adott (az x tengelyen feltüntetett) sebességértéknél gyorsabban mozognak. Számoltuk a sejtek elmozdulását; az ebből származó $d(t)$ elmozdulásfüggvény a sejtek átlagos elmozdulását (d) adja meg egy tetszőlegesen választott (t) időtartam alatt. Az elmozdulásfüggvény dupla logaritmikus átalakítása után numerikus deriválásával nyertük a bolyongási index függvényét [4,5].



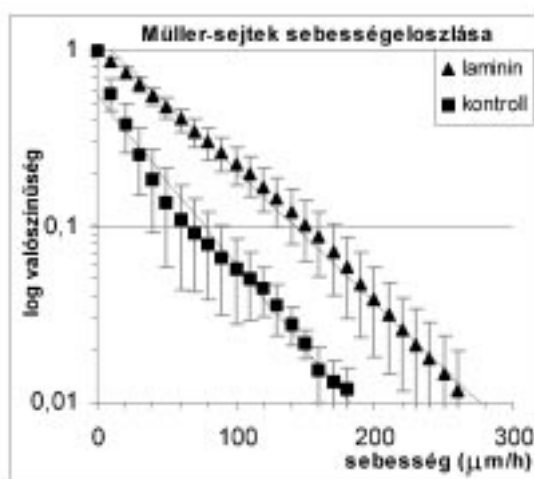
3. ábra Tenyésztett Müller-gliasejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe. Egy álló (bal) és egy vándorló (jobb) sejt morfológiája figyelhető meg. A nyíl a vándorló sejt mozgásának irányát jelzi. (Rövidítések: N: sejtmag; L: lamellopodium; U: uropodium; a csillagok a vezető élt jelzik a lamellopodium elülső részén)

Eredmények és diszkusszió

Az ECM-molekulák és a sejtek közötti kapcsolódás egyik következménye a letapadás és a sejtmozgás. Az ECM-molekulák sejtmozgásra gyakorolt hatásának értékeléséhez jó lehetőségeket nyújt a sejtenyészetek hosszú távú videomikroszkópos megfigyelése (3. ábra). Kísérleteinkben gyorsított („*time-lapse*”) mozgóképeket készítettünk inkubátorban tartott sejtenyészetekről fáziskontraszt mikroszkóppal; a sejtek elmozdulását az egyes felvételkészítések között (amely általában 10 perc időtartam) számítógépes program segítségével követjük nyomon, majd az összes megfigyelt sejt útvonalának elemzésével, statisztikai módszerekkel jellemezzük a sejtmozgást. Ehhez a munkához kapcsolódóan a videomikroszkópos laboratóriumunkban készített mozgóképállományok (mpeg, *quicktime* formátumban) az interneten is megtalálhatók [6].

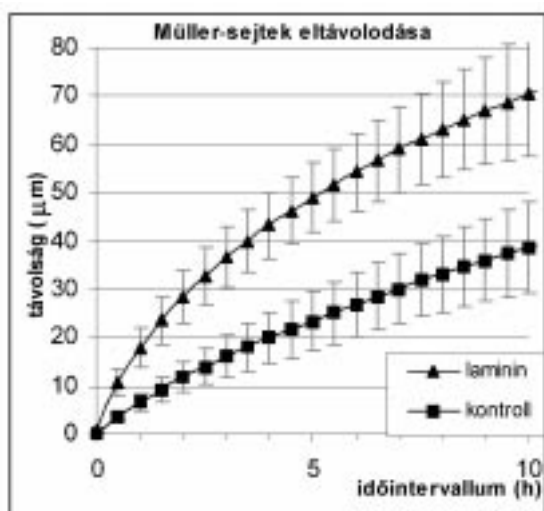


4. ábra Kezeletlen (A) és laminin-1-előkezelt (B) aljzaton 22 óráig vándorló Müller-sejtek videomikroszkóppal megfigyelt trajektóriája. Mindkét mezőben 20 véletlenszerűen választott sejt trajektóriája látszik. Két reprezentatív trajektória vastag vonallal szerepel a B mezőben, ahol egyben nagyszámú trajektória-fordulópont is megfigyelhető. Az x és y tengelyek valós síkkoordinátákat jelentenek, méretezésük mikronban készült.



5. ábra Kezeletlen vagy lamininnal előkezelt felületen vándorló Müller-sejtek sebességeloszlás-függvénye. A függőleges tengelyen (logaritmikus skálán) annak a gyakorisága szerepel, hogy adott, véletlenszerűen választott sejt a vízszintes tengelyen ábrázolt sebességnél nagyobb sebességgel mozog.

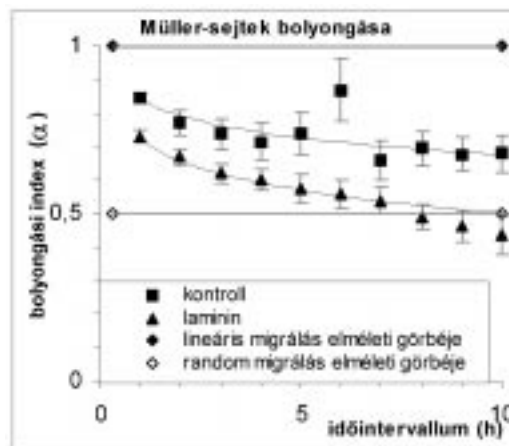
Vizsgálataink arra mutatnak, hogy a laminin-1 jelentős motilitásserkentő hatással van Müller-sejtekre (4. ábra). A laminin-1-molekulákkal borított aljzaton mozgó Müller-sejtek átlagsebessége mintegy 110%-kal nagyobb a kezeletlen aljzaton vándorlókéhoz hasonlítva [be nem mutatott eredmény]. A motilitást kétféle statisztikai módszerrel jellemezzük: (1) számoljuk a sejtek sebességének eloszlását, tehát azoknak a sejteknek a számát, amelyek egy véletlenszerűen választott pillanatban egy adott se-



6. ábra A Müller-sejtek által megtett távok és a vándorlás időintervallumai közötti összefüggés laminin jelenlétében, illetve hiányában. A távolságok minden időintervallumban nézve szignifikánsan nagyobbak lamininnal előkezelt aljzaton, mint kezeletlen aljzaton.

bességnél gyorsabban mozognak (5. ábra); (2) számoljuk az összes lehetséges időintervallumban mért sejtenkénti elmozdulások átlagait, amely az eltávolodásfüggvényt adja (6. ábra).

Az eltávolodásfüggvény egyrészt meredekségével információt ad a sejtek sebességátlagairól, mivel az adott időintervallumban mért átlagolt elmozdulásokat mutatja, másrészt a függvény alakja következtetéseket enged levonni a sejtek útvonalvezetéséről (trajektóriáját) illetően. Jellemzően más-más függvényalakot eredményez az adott területre visszavisszatérő trajektória, a lineárisan távolodó trajektória és a véletlenszerű bolyongás trajektóriája. Az eltávolodásfüggvény további transzformálásával egy ún. bolyongási (diffúziós) index számolható (7. ábra), amely egyértelműen elválasztja a trajektóriáknak/útvonalvezetésnek ezt a három elméleti típusát.



7. ábra Kezeletlen vagy lamininnal előkezelt aljzaton vándorló Müller-sejtek útkereső aktivitása. A lineárisan vándorló, illetve véletlenszerűen bolyongó elképzelt sejt populációkhoz tartozó 1, illetve 0,5 bolyongási index (α) értéket felvevő függvények szintén szerepelnek. A lamininen vándorló Müller-sejtekhez tartozó görbe a vándorlás nagyobb időintervallumait tekintve megközelíti a 0,5 α értéket. (A bolyongási index további magyarázata az Anyag és Módszer részben található.)

A bolyongási index szerint a lamininen tapasztalt gyorsabb mozgáshoz véletlenszerűbb útvonalválasztás társul, mint a kezeletlen aljzaton, így a sejtek trajektóriája közelít a véletlenszerűen bolyongó részecskék kétdimenziós trajektóriájához. Ez utóbbi úgy értelmezhető, hogy a folyamatos nyúlványképződéskor a legerősebb nyúlvány/lamellopódium, amely végül „elhúzza” egy adott irányban a sejtestet – vagy annak súlypontját – közelítőleg véletlenszerűen választott irányban nő ki. Ennek eredményeként a trajektória fordulópont-

jainál az útvonalválasztás közel véletlenszerű az előző útirányhoz képest, és az egész trajektóriából számolt bolyongási index az elméleti bolyongásra jellemző indexhez közelít, különösen ha a nagyobb időintervallumokat vizsgáljuk.

Az aljzatra előinkubált laminin-1 egyenletesen borítja a felszínt; atomerő-mikroszkópiás (AFM) felvételeink szerint a magától felépülő lamininhálózat nem mutat inhomogenitásokat a sejtek mérettartományában [*be nem mutatott eredmény*], tehát a lamininen vándorló sejtek nem valamilyen borítottsági sűrűséggradiens mentén mozognak. Mozgásukat és annak irányultságát nyúlványképzésük megnövekedett dinamizmusa befolyásolhatja, amelyet a laminin-1-molekulákhoz való kötődés során meginduló – javarészt tisztázatlan – jelátviteli tevékenység közvetíthet a sejtvezérlés felé.

A megnövekedett nyúlványdinamika közvetlenül is megfigyelhető. A tenyésztett sejtek kis hányada nem vándorol lamininen sem, valószínűleg azért, mert a több nyúlvány közül egyetlen irányban sem alakul ki az egész sejtet elhúzni képes „domináns” vezetőél. Ezek a sejtek megfigyeléseink szerint azonban nagyobb átlagos nyúlványszámmal rendelkeznek, és a nyúlványok kinövési, visszahúzási dinamizmusa nagyobb (a nyúlványcsúcsok sejtközépponthez viszonyított sebessége mintegy háromszoros) a kezeletlen aljzaton lévő álló sejtekkel összehasonlítva.

Konklúzió

A laminin nyúlványdinamikát serkentő hatásának szerepe lehet a retina szerkezetének kialakulásában. Az egyedfejlődés korai szakaszában a retina külső oldalán elhelyezkedő progenitor sejtekből a késői sejt differenciációs hullám részeként keletkeznek a Müller-sejtek. Nyúlványaikkal átnőnek a retina teljes keresztmetszetén a belső oldalig, ahol a benövő nyúlványokat a már korábban odaérkező ganglionsejtek fogadják, amelyek laminint termelnek. A felhalmozódó laminin-1 hatására a benövő Müller-glianyúlványok arborizálnak, és a folyamat végül is elvezet a szorosan záródó nyúlvány végtagok által alkotott belső határhártya kialakulásához.

A laminin-1 motogén és nyúlványdinamika-fokozó hatásának közvetítésében a lamininreceptorként ismert alfa1/béta1-integrin és/vagy a disztroglikán játszik szerepet [2,7], amelyek egyaránt megta-

lálhatók a Müller-sejtek nyúlványvégtagjaiban *in vivo* [8]. A disztroglikánkomplex összetétele az izomsejtekben részleteiben ismert: a disztroglikánt a disztrofin fehérjecsald legnagyob molekulatöme- gű tagja, a Dp 427 köti az aktinvázhoz [2]. A Müller-sejtekben lévő disztroglikánkomplex felépí- tése feltehetően hasonló a más sejt típusokban elő- forduló disztroglikánkomplexével, vagyis szarkog- likánok, szintrofinok, disztrobrevin is részt vesz- nek benne [8]. A komplex összetétele részleteiben azonban nem tisztázott. Müller-sejtekben a memb- ránon átívelő disztroglikán és az aktinváz között feltehetően a kis molekulatöme- gű disztrofin, a Dp71 teremti meg a kapcsolatot.

A közeljövőben tervezett kísérleteink a Müller- sejtekben lévő disztroglikánkomplex összetételé- nek és a sejtmozgás során bekövetkező esetleges össze-/szétszerelődésének tisztázására irányulnak. Megvizsgáljuk azt is, hogy a laminin mely funkció- nális doménjei felelősek a motogén hatásért, vala- mint hogy az integrin vagy a disztroglikánkomplex játszik-e jelentősebb szerepet ebben.

Köszönetnyilvánítás

A jelen közlemény alapjául szolgáló kísérletek az OTKA T030330 és az OTKA 034995 számú pályáza- ti források segítségével valósultak meg. Külön köszönettel tartozom az ezt a munkát első közlés for- májában bemutató, a *Cell Motility and the Cytoskeleton* című folyóiratban megjelent közlemény [3] tár- s szerzőinek: Czirók Andrásnak, Hegedűs Baláznak, Vicsek Tamásnak és Jancsik Veronikának.

Irodalomjegyzék:

- [1] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1994) Cell Junctions, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix. In: Molecular Biology of the Cell (3rd Edition), (Garland Publishing, New York, USA) pp. 911-949.
- [2] Henry, M. D., Campbell, K. P. (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**: 602-607.
- [3] Méhes, E., Czirók, A., Hegedűs, B., Vicsek, T., Jancsik, V. (2002) Laminin-1 increases motility, path-searching, and process dynamism of rat and mouse Muller glial cells in vitro: Implication of relationship between cell behavior and formation of retinal morphology. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **53**: 203-13.
- [4] Czirók, A., Schlett, K., Madarász, E., Vicsek, T. (1998) Exponential distribution of locomotion activity in cell cultures. *Phys. Rev. Lett.*, **81**: 3038-3041.
- [5] Hegedűs, B., Czirók, A., Fazekas, I., Bábel, T., Madarász, E., Vicsek, T. (2000) Locomotion and proliferation of glioblastoma cells in vitro: statistical evaluation of videomicroscopic observations. *J. Neurosurg.*, **92**: 428-434.
- [6] <http://ange.elte.hu/cellmotility/laminin>
- [7] Colonato, H., Yurchenco, P. D. (2000) Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev. Dynam.*, **218**: 213-134.
- [8] Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F., Sahel, J., Reichenbach, A., Rendon, A. (2000) Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**: 294-304.

EGYESÜLETI HÍREK

A Magyar Köztársaság Elnöke 2003. március 15. alkalmából a legmagasabb állami elismeréssel,
Széchenyi-díjjal tüntette ki egyesületünk tagját:

Muszbek László akadémikust,

a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar egyetemi tanárát,

a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet igazgatóját

a véralvadás és a trombociták biokémiájának kutatásában elért – nemzetközileg is nagyra értékelt – tudományos eredményeiért, az orvosi laboratóriumi diagnosztika fejlesztésében végzett tudományos iskolateremtő és tudományos szervező munkásságáért.

*A Magyar Biokémiai Egyesület nevében szívből gratulálunk,
és további eredményes munkát kívánunk a kitüntetettnek.*

Felhívjuk minden érdeklődő figyelmét, hogy a FEBS Newsletter
2003. januári száma olvasható az alábbi internetes címen:

http://www.febs.org/News/Newsletter/Febs_Newsletter.htm

Ugyanott az idei FEBS 2003 Congress, Meeting on Signal Transduction

(Brüsszel, 2003. július 3–8.) rendezvényvel kapcsolatos különszám is olvasható.



CD 2003

9th International Conference on Circular Dichroism in Chemistry and Life Sciences

August 31 – September 4, 2003, Eötvös Loránd University Budapest, Hungary

Chairman: **Miklós HOLLÓSI**,
Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

Co-Chairman: **Sándor ANTUS**,
University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Main Topics: Theoretical Aspects *
Instrumentation and Methodology * Electronic CD,
FD CD, CPL * Vibrational Optical Activity: VCD
and ROA * Anisotropic Phases, Oriented Molecules
* Enantiomeric Separation by HPLC, Capillary
Electrophoresis * Chiral Stationary Phases, Chiral
Selectors * Natural Products and Biopolymers –
Structural Studies * Supramolecular Interactions,
Proteome, Interactome * New Materials, Polymers
* Applications in Analytical, Medicinal, Forensic,
Agricultural and Food Chemistry

Plenary lecture: **K. Nakanishi**, Columbia University,
New York, NY, USA.

Keynote lectures: **L. D. Barron**, Univ. Glasgow, UK;
L. Di Bari, Univ. Pisa, Italy; **B. Feringa**, Univ.



Groningen, The Netherlands; **N. Harada**,
Tohoku Univ., Sendai, Japan; **J. Hirst**, Univ.
Nottingham, UK; **Y. Inoue**, Osaka Univ.,
Japan; **K. Kano**, Doshisha Univ., Kyoto,
Japan; **T. Keiderling**, Univ. Illinois, USA;
H-G. Kuball, Univ. Kaiserslautern, Germany;
D. Lightner, Univ. Nevada, USA; **C. Toniolo**, Univ.
Padova, Italy; **R. Woody**, Colorado State Univ., USA.

*Deadlines for early registration and submission of
abstracts: **May 1, 2003.***

More information: Dr. Gábor Dibó, Secretary of
CD 2003 (Department of Organic Chemistry,
Eötvös Loránd University
P.O. Box 32, Budapest 112, Hungary, H-1518
Phone: +36-1-372-2771; Fax: +36-1-372-2620
E-mail: cd2003@chem.elte.hu
Web-site: <http://cd2003.chem.elte.hu>



AKTIVIT

TERMÉKAJÁNLAT:



BIOANALITIKAI TERMÉKEK:

Készletek nukleinsav-tisztításhoz

NUCLEOBOND® oszlopok és készletek
anioncserélő technika alkalmazásával

Nucleotrap® és **Nucleotrap®CR** kiték DNS tisztításhoz
szilikagól mátrix technika alkalmazásával

NucleoSpin® termékcsalád nukleinsav-tisztításhoz
szilikagól membrántechnika alkalmazásával

- NucleoSpin® Plus
- NucleoSpin® Multi 8 Plasmid és Multi 8 Plus Plasmid
- NucleoSpin® Extract
- NucleoSpin® Blood és Blood L
- NucleoSpin® Multi 8 Extract
- NucleoSpin® C + T
- NucleoSpin® Plant
- NucleoSpin® RNS
- NucleoSpin® Virus és Virus L

Speciális HPLC kolonnák bioszeparációhoz

- Ioncserélő kolonnák
- Fordított fázisú kolonnák
- Gél töltésű kolonnák

Transzfer közegek és szűrő rendszerek

- CHROMAFIL® membránszűrők
- porablot® transzfer membránok
- Blotting papírok
- BIO-LAB-TOP

Mikrobiológiai gyorsesztek

- BioFix® tesztsíkok mikrobiológiai vizsgálatokhoz
- Mikrobiológiai gyorsesztek higiénias vizsgálatokhoz

ALTALÁNOS LABORATORIUMI ESZKÖZÖK ÉS GÉPEK:

analitikai és gyorsmérlegek, súlysorozatok, ♦ pH papírok, tesztpapírok, ♦ pH és vezk. mérő műszerek, ♦ szűrőpapírok, membránszűrők, extrakciós hüvelyek, ♦ kémcsőkeverők, rázógépek, víz- és olajfürdők, termosztátok, ♦ malmok, ultrahangos keverők, labor reaktorok ♦ Mágneses és pálcás keverők, ♦ diszpergálók és homogenizálók, labor szivattyúk, roncsolók, desztillálók



SZERVES KÉMIAI ANALITIKA:

♦ HPLC oszlopok, cartridge rendszerrel is, GC kapillárisok, polimer kolonnák ♦ TLC hordozók, szorbensek és kész VRK-lapok Al, műanyag és üveg hordozón ♦ C-H-H-O-S és összes N automata elemösszetétel analízátorok ♦ BIO-ANALITIKAI TERMÉKEK széles VÁLASZTÉKA

AKTIVIT Kft. 1145 Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel.: 47-00-125, 221-7865, 221-7866

FAX:
252-9940

Gyártók: AUTOMESS GmbH., BEHR GmbH., ELEMENTAR GmbH.,
GRÖGER & OBST GmbH., HYDROLAB Co., IKA WERKE GmbH.,
KERN GmbH., MACHEREY-NAGEL GmbH., SKALAR BV., WTW GmbH.



Arató Eszter, *Kastély* (1997), tusrajz

adott esetben élő formákra (pl. sejtekre) emlékeztető alakzatokra épül. A kép egyes térrészeit egymással párhuzamosan alakítja, így azok egymással mintegy kommunikálnak, egymásra válaszolnak vagy éppen konfliktusban állnak. Tábor Ádám

elemzésében: „A legtöbb képen rendszerint van egy főalak vagy egy, a képsíkot domináló nagyobb arc. A mellékalakok, torzók, kisebb figurák, absztrakt ornamentelek mind ehhez a főalakhoz viszonyulnak, mintegy annak kivetülései, projekciói. ... Az expresszív figurális és a geometrikus-rationális absztrakt ornamentika a legmagasabb szinten ötvöződik bennük. Ezért ezeken a képeken valóban a lélek önmagát növelő logosza manifesztálódik – és ez a legtöbb, ami egy műről elmondható.”



Arató Eszter, *Varázslat* (1998), tempera, tus, kréta

Arató Eszter további képei megtekinthetők az alábbi internet címen: <http://www.kalota.com/ae/>

Arató Eszter 1958-ban született Budapesten. Önmagát alapvetően autodidaktának tekintő művész – az alkotómunkához szükséges technikai tudást részint képzőművészeti kurzusokon, részint önnön folyamatos próbálkozásain keresztül szerezte meg. 1997 óta tagja a Szabad Képző- és Iparművészek Országos Szövetségének, képeit hazai kiállításokon és külföldön is bemutatja. Egy rajzát a képzőművészeti munkákat a világ minden országából gyűjtő Very Special Arts International (Washington DC, USA) 1994-ben felvette a gyűjteményébe, 1996-ban – nyolc alkotó egyikeként – elnyerte a nemzetközi Yamagata Képzőművészeti Program ösztöndíját a Corcoran Múzeum Művészeti Iskolájában (Washington DC, USA).

Munkája eredendően önmagának kifejlesztett technika, célzottan nem tudatos, hanem ösztönös önkifejezési mód, melyet szellemi eszmélése óta folyamatosan alakít. Képeiben az emberi kapcsolatok kifejezőmódja dominál, amely – saját bevallása szerint – olyan „belső világ, amiben sok mindenki magára, a saját dolgaira ismerhet”. Képei döntően vegyes technikával készített tusrajzok: a csótollal kialakított tusrajzolatot színes ceruzával vagy pasztellel színezi, színes papírral kollázsá alakítja. A kompozíciókat rendszerint a kép központi helyzetű vagy egymásba ágyazódó főalakjai strukturálják, s ezen alakok környezetét vagy a köztük kialakuló térrészeket később, aprólékos munkával tölti ki a képnek nem csupán háttérét, de egyben hangulatát is megadó ornamentikával, mely hol egyszerű vonalegyüttesekre, hol összetettebb,



Arató Eszter, *Kötődés* (2001), színes ceruza, tus, kollázs



sartorius



Protein isolation,
concentration and
purification

Monoclonal antibody
purification from
tissue culture supernatant

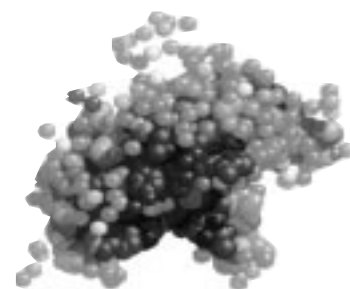
Endotoxin Removal

Charged carbohydrate
purification

Clinical diagnosis,
analyses

membran

Sartorius-Membrán Kft.
2092 Budakeszi, Kagyló utca 5.
Tel.: 06-23-457-148, 06-23-457-227, 06-23-457-228
Fax: 06-23-457-147
E-mail: s-membran@s-membran.hu
web: www.s-membran.hu



Rekombináns *Pichia pastoris* Mut^S termékképzése a pH és a hőmérséklet függvényében

Recombinant protein production with *Pichia pastoris* Mut^S strain as a function of pH and temperature

Kupcsulik Bálint és Sevelle Béla

Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 1521 Budapest, Szt. Gellért tér 4. E-mail: bkupcsulik@mail.bme.hu

Kupcsulik, B. and Sevelle, B.

Department of Agricultural Chemical Technology, Budapest University of Technology and Economics, H-1521, Budapest, Szt. Gellért tér 4. E-mail: bkupcsulik@mail.bme.hu

Summary

The influence of pH and temperature was found to be significant on the specific product formation rate of recombinant *Pichia pastoris* Mut^S GS115 HSA. An unstructured mathematical model, composed of a Michaelis pH formula and two Arrhenius equations, was fitted to the specific product formation rate. The model is of general

interest, since it can be applied with minimal alterations for any recombinant protein expressed in *Pichia*. The predicted optimum for product formation at pH 5.7 and 20 °C resulted in the highest product concentration and specific product formation rate, which suggests different optima for the cell mass and product forming phases of the fermentation.

A *Pichia pastoris* élesztő alkohol-oxidáz promóterein alapuló rekombináns fehérjetermelő rendszer jelenleg a világon ismert legsikeresebb eljárások közé tartozik, s a mai napig mintegy háromszáz heterológ fehérje előállítását jelentették [1]. A *P. pastoris* élesztővel a termelni kívánt fehérjét nagy koncentrációban, könnyen tisztíthatóan és az eredeti biológiai tulajdonságokkal lehet előállítani [2].

A *P. pastoris* metanogén élesztőt először a Phillips Petroleum használta egysejtfehérje előállítására metanolon mint egyedüli szénforráson. Az élesztő FAD-függő alkohol-oxidáz enzimei segítségével a metanolból formaldehidet képez, majd a formaldehidet további enzimkatalizált lépésekben ecetsavvá, végül szén-dioxiddá oxidálja. A formaldehid dihidroxi-aceton-szintetáz enzim segítségével kapcsolódik a sejt fő metabolikus rendszeréhez. A reakcióút sebességmeghatározó lépése a metanol oxidációja. A metanol oxidálásakor hidrogén-peroxid képződik, amit kataláz bont. Mivel a képződő hidrogén-peroxid károsítja a sejtet, az alkohol oxidációja külön kompartmentekben, a peroxisómákban történik. A nagy – 1,2% (V/V) feletti – metanol-

koncentrációval járó fokozott hidrogén-peroxidképződés révén a magas szubsztrátkoncentráció toxikus a sejtekre [3].

A *P. pastoris* két alkohol-oxidáz enzimmel rendelkezik (Aox1 és Aox2). Az Aox enzimek nagy szerkezeti homológiát mutatnak (95%), azonban expressziós szabályozásuk eltér: aktivált állapotban az Aox enzimek 85–90%-át az AOX1 gén kódolja. Mindkét fehérje kifejeződése katabolit represszió alatt áll, glükóz vagy glicerin jelenlétében a sejtben gyakorlatilag nem mérhető alkohol-oxidáz-aktivitás. Az Aox enzimek kifejeződését a metanol indukálja, aktivált állapotban a sejtek teljes fehérjemennyiségének akár 30%-a is Aox lehet. Az expressziós rendszer a szigorúan szabályozott, erős AOX1 promóteren alapul. A heterológ fehérje beépülési helyétől függően többféle rekombináns *Pichia*-törzs hozható létre: ha az AOX1 génbe épül, az élesztő megmaradt intakt AOX2 génjével metanolon csak lassan képes növekedni (Mut^S, *Metanol Utilization Type Slow*), ha pedig a kromoszóma egyéb részébe, általában a HIS4 génbe épül, akkor a vad törzsnek megfelelő lesz a növekedési sebes-

ség (Mut⁺, *Metanol Utilization Type +*). Létrehozható Mut⁰ variáns is, amely nem rendelkezik intakt AOX génnel. Annak ellenére, hogy a Mut⁺ variáns növekedése 6-7-szer gyorsabb, mint a Mut^S variánsé, a poszttranszlációs módosítások időigénye miatt gyakran az utóbbi eredményez magasabb biológiai aktivitással rendelkező heterológ fehérjekoncentrációt.

A *P. pastoris* élesztő alkohol-oxidázán alapuló rekombináns fehérje-előállítás a következő előnyös tulajdonságokkal rendelkezik: (1) az expressziós rendszer kereskedelmi forgalomban kapható, (2) a rekombináns élesztő eltartása genetikai stabilitása miatt egyszerű, (3) genetikai manipulálása a *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmusra alkalmazott módszerekkel lehetséges [4], (4) a genetikai stabilitás és az indukálható termékképzés megbízható fehérje-előállítást tesz lehetővé, (5) a *Pichia* nem folytat fermentatív metabolizmust, így egyszerű eszközökkel nagy sejtkoncentráció érhető el [5], (6) a hagyományos szervezetekhez (*Escherichia coli*, *S. cerevisiae*) képest kiemelkedően magas termékkoncentrációk érhetőek el, (7) legalább 65 kD fehérjeméretig extracelluláris a fehérjeexpresszió (*S. cerevisiae* α -mating factor szignálszekvenciájával), (8) általában natív szerkezetű funkcionális fehérjét termel eukarióta eredetű rekombináns termékek esetében is [6], (9) szemben a fehérjéket hiperglikoziláló *S. cerevisiae* élesztővel, glikopeptideknél főként a humán szerkezetnek megfelelőbb (Man)₈ egységek kapcsolása [7,8], (10) genetikailag stabil, (11) tiszta tápoldatban (csak szénforrás és szervesetlen sók) tenyészthető. A nagy termékkoncentráció, az extracelluláris kifejeződés és a tiszta tápoldat alacsony költségű terméktisztítási eljárásokat enged meg.

A *P. pastoris* glicerinen pH 2,7–7,5 között széles hőmérséklet-tartományban képes növekedni [9], azonban kísérleti rendszerekben gyakorlatilag kizárólagosan a forgalmazó által ajánlott pH 5,0 és 30 °C értéket használják. Mivel a *Pichia* kis mennyiségű alkalikus és neutrális proteázt is termel, amelyre bizonyos fehérjék érzékenyek [10], elsődleges célunk a törzs heterológ fehérjetermelő képességének vizsgálata volt alacsony pH-értékeken. Mivel pH 4,2 alatt nem tapasztaltunk termékképzést, viszont a fehérjetermelés hőmérsékletfüggést mutatott, eredeti lineáris ortogonális kísérleti tervünket kiterjesztettük egy másodfokú ortogonális Box-Behnken kísérleti tervvel, így pH 3,2–7,2 és 17–29 °C-os tartományt vizsgáltunk. A fermentációs kísérleteket *P. pastoris* GS115 Mut^S humán szérumban albumint (HSA) termelő törzsszel végeztük 800 ml térfogatban, BIOSTAT Q (B. Braun) típusú, 4 párhuzamos fermentáció végzésére alkalmas keverős fermentorban. A fermentáció glicerines sejttömegnövelő fázisa 22–24 órán keresztül, pH 5,0 értéken, 29 °C-on folyt a glicerinteljes felhasználásáig, amit az oldott oxigénkoncentráció emelkedése jelzett. A metanolos szakasz során infúziós adagolóval, állandó sebességgel adagoltuk a metanol, ami korábbi méréseink szerint egy átmeneti adaptációs periódus után a termékképzésnek megfelelő 0,5 g/l metanolkoncentrációt biztosít [11]. A HSA fehérjét SDS PAGE elválasztással (Pharmacia Phast System) választottuk el, koncentrációját Kodak Digital Science 1D Image Analysis programmal határoztuk meg. A termék proteolitikus bomlását a vizsgált tartományban nem tapasztaltuk. A mért HSA-koncentrációkból (P) szárazanyagra (x) vetített fajlagos termékképzési sebességet (μ_p) képeztünk, azt feltételezve, hogy ennek értéke a termékképzési szakasz során állandó:



Kupcsulik Bálint 1999-ben végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki karán mint biológus, ipari biotechnológia szakirányon. 1997/98-ban a *University of Georgia* egyetemen genetika szakon töltött három trimesztet a *Georgia Rotary Student Program* ösztöndíjával. 1999-ben három hónapot a dél-afrikai *University of Stellenbosch* Mikrobiológiai Tanszékén töltött a STINT program keretében. 2000-tól a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén doktoráns. Főbb kutatási területei: fermentációs kinetikai vizsgálatok rekombináns *Pichia pastoris*-, *Aspergillus terreus*-, *Acetobacter*- és *Enterobacter*-törzsekkel.

Sevella Béla vegyészmérnök, 1970 óta a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék oktatója, a tudomány kandidátusa, 1993 óta habilitált professzor és a tanszék, azon belül a fermentációs kutatócsoport vezetője. Főbb kutatási területei: fermentációs technológiák fejlesztése, optimalítása, fermentációs rendszerek kinetikai, anyagátadási folyamatainak vizsgálata. Az általa vezetett iskolából graduális vegyészmérnökök és biomérnökök százai kerültek ki, több egyetemi doktori és kandidátusi disszertáció készült irányítása alatt, és jelenleg is több PhD-hallgató témavezetője.



$$\mu_p = \frac{P}{\int_0^t x dt}$$

Statistica for Windows 6.0 programmal végzett analízis szerint a termékképzést biztosító beállítások (I. táblázat) mellett μ_p -re a pH, a pH^2 , valamint a hőmérséklet hatása is szignifikáns, a kereszthatások elhanyagolhatóak. A mért értékekre nem strukturált, Michaelis pH-függvényen és két Arrhenius-egyenleten alapuló függvényt illesztettünk (II. táblázat). A függvény maximuma pH 5,7-nél és 20 °C-nál van (I. táblázat); az ezen körülmények között végrehajtott fermentáció valóban a legjobb eredményt adta a vizsgált beállítások közül (894 mg/l

I. táblázat Az elvégzett fermentációk paraméterbeállításai és eredményei

| pH | T [°C] | μP [mg/g/h] |
|-----|--------|------------------------|
| 3,2 | 29 | 0 |
| 5,2 | 29 | 0,093 |
| 3,2 | 23 | 0 |
| 5,2 | 23 | 0,177 |
| 4,2 | 26 | 0 |
| 6,2 | 20 | 0,197 |
| 6,2 | 17 | 0,172 |
| 7,2 | 20 | 0,137 |
| 5,2 | 20 | 0,126 |
| 7,2 | 17 | 0,043 |
| 6,2 | 23 | 0,160 |
| 5,2 | 17 | 0,180 |
| 5,7 | 20 | 0,194 |
| 7,2 | 23 | 0,070 |

II. táblázat Az illesztett modell függvényparaméterei

| Illesztett Arrhenius-függvény | | | | | | |
|---|-----------------------|-------|-------|-----------------|-----------------|------------------|
| $\mu_p = \mu_{p_{\max}} \cdot \frac{K_1 \cdot [H^+]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 \cdot [H^+] + [H^+]^2} \cdot \left\{ a \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H_1}{RT}\right) - b \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H_2}{RT}\right) \right\}$ | | | | | | |
| Arrhenius-paraméterek | | | | | | |
| K_1 | K_2 | a | b | $-\Delta H_1/R$ | $-\Delta H_2/R$ | $\mu_{p_{\max}}$ |
| $2,14 \times 10^{-5}$ | $2,27 \times 10^{-7}$ | 6,43 | 15,6 | -43,8 | -71,5 | 1,48 |
| Varianciaanalízis (ANOVA) | | | | | | |
| | DF | SS | MS | F | P | r^2 |
| Regresszió | 6 | 0,211 | 0,035 | 13,04 | 0,0017 | 0,918 |
| Reziduális | 7 | 0,019 | 0,003 | | | |
| Teljes | 13 | 0,230 | 0,018 | | | |

HSA). Az eredmények azt mutatják, hogy a sejt-tömegképzési szakasz (pH 5,0 és 29 °C) és a termékképzési szakasz (pH 5,7-nél és 20 °C) körülményeinek szétválasztása növeli a produktivitást. Az eredményekre történő illesztéssel kapott matematikai modell (II. táblázat) $\mu_{p_{\max}}$ maximális fajlagos termékképzési sebesség változtatásával tetszőleges fehérjére alkalmazható, és várhatóan *P. pastoris* Mut⁺ variánsra is használható.

Irodalomjegyzék

- [1] Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 45–66.
- [2] Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**: 329–332.
- [3] Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A., Meagher, M.M. (2000) Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol. Bioeng.*, **70**: 1–8.
- [4] Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, **11**: 905–910.
- [5] Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M. (1998) High cell-density fermentations. In: *Methods in Molecular Biology*, **103**, (Higgins, D.R., Cregg, J.M., Eds.), (Humana Press, Totowa, NJ) pp. 107–120.
- [6] Miele, R.G., Nilsen, S.L., Brito, T., Bretthauer, R.K., Castellino, F.J. (1997) Glycosylation properties of the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **25**: 151–157.
- [7] Grinna, L.S., Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, **5**: 107–115.
- [8] Ikegaya, K., Hirose, M., Ohmura, T., Nokihara, K. (1997) Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal. Chem.*, **69**: 1986–1991.
- [9] Chiruvolu, V., Eskridge, K., Cregg, J., Meagher, M. (1999) Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **75**: 163–173.
- [10] Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., Ohmura, T. (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J. Biosci. Bioeng.*, **89**: 55–61.
- [11] Kupcsulik, B., Sevela, B., Ballagi, A., Kozma, J. (2001) Evaluation of three methanol feed strategies for recombinant *Pichia pastoris* Mut^S fermentation. *Acta Alim. Hung.*, **30**: 99–111.

Új távlatok a molekuláris biológiában – Bio-Science Szimpózium az Akadémián

Jelentős tudományos eseménynek lehettünk tanúi ez év október 4-én: a Magyar Tudományos Akadémián megrendezték az első Bio-Science Szimpóziumot a Bio-Science Kft. szervezésében. Az egész napos program a molekuláris biológia legújabb módszereivel, eredményeivel foglalkozott, amely komoly érdeklődést váltott ki. A rendezvényen több mint 300 regisztrált szakember vett részt, köztük a szakma hazai és nemzetközi vonatkozásban is ismert vezető szaktekintélyei.

Dr. Tátrai Ágnes, a Bio-Science Kft. igazgatója bevezetőjében kifejtette, hogy a cég a kereskedelmi tevékenység mellett számos tudományos projektben is részt vállal, de ettől függetlenül is feladatának érzi a tudományos közösség támogatását magas színvonalú rendezvények szervezésével is. Ennek eddigi legkomolyabb megnyilvánulása ez a szimpózium.

A rendezvény moderátora Dr. Lakatos Péter (SE I. Belklinika) volt, aki nemcsak kutatóként, hanem klinikusként is szemléli a molekuláris biológiában az utóbbi években végbement fejlődést. Ez megnyilvánult abban is, hogy számos esetben a gyakorlati felhasználás irányába terelte az előadásokat követő diszkussziót.

Az első előadó Falus András akadémikus (SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet) volt, aki a genomika jelenét és jövőjét vitette a hallgatóság elé, nemritkán filozofikus hangvétellel, különösen kiemelve az etikai vonatkozásokat. Dr. Puskás László (Szegedi Biológiai Központ) már a gyakorlatban mutatta be, hogy mire képes a chiptechnológia, és mindezt hazai példákkal illusztrálta. Különösen érdekesek voltak a skizofrénia genetikai hátterével kapcsolatos adatai.

Dr. Dimitri Pappaioannou (Molecular Probes, Hollandia) első előadásában a nukleinsavak detektálására alkalmas fluoreszcens festékekről adott részletes áttekintést. A kávészünet után pedig a fehérjék kimutatására kifejlesztett legújabb festéket mutatta be számos gyakorlatban jól használható szempontot említve. Dr. Wolfgang Fiedler (Martin Luther University, Németország) a vastagbél adenomatosus polyposisát okozó génmutációk kimutatására kifejlesztett ún. *protein truncation* tesztet mutatta be. A polyposis gyakran vezet daga-



nathoz, így vizsgálata különösen fontos. A módszer egyébként más, hasonló kórképek genetikai hátterének tisztázására is alkalmas. Dr. Poonam Taneja (Alpha Innotech Corp., USA) a CCD kamerák tulajdonságait, a gélfényképezés finomságait elemezte. Szenzációsan adta elő a géldokumentációs rendszerek vásárlásának gyakorlati szempontjait.

Az igen bőséges és ízletes ebéd után Dr. Ingrid Liegl-Magiera (Promega, Németország) a luciferáz jelölő gén teszt (*luciferase reporter gene assay*) alapjait magyarázta el, illetve a legújabb változatait és alkalmazásait mutatta be. Hihetetlenül érdekes volt látni, hogy ez a viszonylag régi módszer milyen új területekre volt képes betörni. Ezt követően Dr. Nagy László (DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) rendkívül magas színvonalú előadásában a szteroid hormonhatás molekuláris történéseit ecsetelte fehérje–fehérje kölcsönhatásokra bontva. Helyenként multimédiás animációkat is alkalmazva, szemléletes képet adott a szteroidreceptor működéséről. Dr. Michael Hoffmann (Freiburg University, Németország) egy új lumineszcens eljárást, a READIT módszert ismertette, és populációs genetikai szűrésekben történő alkalmazásokra mutatott példákat. A módszer mindössze 4 hónapos, de már hazai alkalmazással is találkozhattunk Dr. Lakatos Péter és Kósa János előadásában, amelyben a csontritkulás diagnosztikájában és a terápiás döntésben fontos kollagén 1A1 gén sp1 mutációjának vizsgálatára kifejlesztett READIT módszerüket szemléltették. A rendszer nagyszámú minta gyors és pontos vizsgálatát teszi lehetővé az elektroforézis mellőzésével.



A szimpóziium utolsó előadását Dr. Pádár Zsolt (ORFK Bűnügyi Szakértő és Kutató Intézet) tartotta a molekuláris genetika szerepéről a kriminalisztikában. Meggyőződhattünk róla, hogy a helyenként tudományos fantasztikumnak tűnő azonosítási (*genetic identity*) lehetőségek valóban speciális ágát képezik a genetikának.

A rendezvényen elhangzott előadások színvonala a világ bármely pontján megállta volna a helyét.

A rangos külföldi előadók mellett a szakma hazai kiválóságainak szereplése azt is jelzi egyúttal, hogy ezen a téren nincs szégyenkeznivalónk. A hallgatóság soraiban számos akadémikus, egyetemi tanár és vezető kutató foglalt helyet, akik közül többen állították, hogy sok új és hasznos információhoz jutottak az előadásokból és az azokat követő megbeszélésekből. Hogy mennyire stimuláló volt a hangulat, arra jellemző a szünetekben kialakított új, külföldi–magyar és magyar–magyar kollaborációk egész sora.

Dicséret és köszönet illeti a Bio-Science Kft. céget azért, hogy az egész rendezvényre az önzetlenség volt jellemző, marketingízű tevékenységnek még a nyomát sem lehetett felfedezni. Csak remélhetjük, hogy egy sorozat kezdetének voltunk tanúi, és a cég a jövőben is támogatni fogja a tudományos közéletet hasonlóan magas színvonalú konferenciák szervezésével.

Nagy Zsolt
Simmelweis Egyetem

Tisztelt Fiatal Kutatók,

emlékeztetjük, hogy a **Sigma-Aldrich pályázat** benyújtási határideje 2003. április 30.

A pályázat feltételeiről honlapunk aktuális rovata a

<http://www.sigma-aldrich.com/hungary>

nyújt tájékoztatást.

Egyben felhívjuk minden **Kedves Olvasó** figyelmét, hogy új kiadásban megjelent a **Sigma Élettudományok 2003–2004** katalógus. A kiadványban a részletes technikai információkkal és új reagensekkel kibővített termékínálat az alábbi tematikai csoportokban található:

- Molekuláris biológia • Sejtkultúra • Jelátvitel és idegtudományok • Immunokémia
- Fehérje analitika és proteomika • Fehérje kromatográfia
- Gyógyszerkutatás és biológiai vizsgálatok

Az ingyenes katalógus honlapunkon rendelhető meg.

Szívélyes üdvözlettel,



SIGMA-ALDRICH

Sigma-Aldrich
Magyarország

Vegyí anyagok toxikus hatásainak mérése és kockázatbecslése a talajban

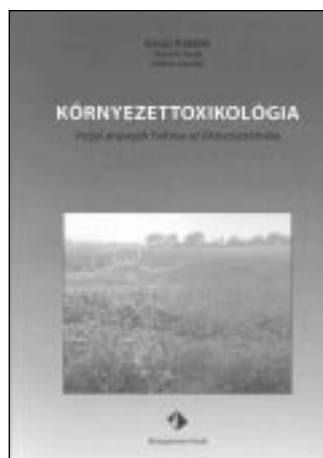
Gruiz Katalin: KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIA Vegyí anyagok hatása az ökoszisztémára (Könyvismertetés)

Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2001

Gruiz Katalin társszerzőkkel (Horváth Beáta és Molnár Mónika) írt 171 oldalas könyve iránti igényt a modern környezetirányítási rendszerek, azon belül is a vegyí anyagok és a szennyezett területek környezeti kockázatának kvantitatív felmérése hívta életre. A könyv széles körű felhasználásra készült; nemcsak a környezetvédelmet főfoglalkozásként művelők, de a környezetvédelem iránt fogékony, egyéb területen dolgozó szakemberek és nem szakemberek számára is. Fontos szerepe lehet egy környezetbarát nemzedék kiképzésében, ezért ajánlható a könyv egyetemek, sőt egyes középiskolák számára is. A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyész-mérnöki Kar Biomérnök és Környezetmérnök szakán a tananyagnak is részét képezi a környezettoxikológia és a kockázatfelmérés.

A könyv a talajt állítja érdeklődése középpontjába, egyben ez jelenti újszerűségét is. A talaj környezeti állapotának megítélésére és a talajba került kockázatos anyagok hatásának mérésére alkalmas komplex metodika kifejlesztése napjaink tudományának feladata. A könyvben szereplő szemlélet és konkrét, talajra specifikus környezettoxikológiai módszerek biztosíthatják, hogy a talaj mint az elemek körforgásának színhelye és ezzel a földi ökoszisztéma fontos és védendő része, a vízhez hasonló részletességgel vizsgálható, megítélhető és védhető legyen.

A magyar nyelvű könyv megjelenése hiánypótló a környezetvédelem területén, sőt külföldön is alig található hozzá hasonló részletességgel megírt mű. Az elmúlt században a vegyipar gigantikus fejlődése következtében a környezetbe kerülő vegyí anyagok mennyisége is drasztikusan megnőtt, sőt ez a tendencia, ha csökkent mértékben is, de ma is folytatódik. Ezért nagyon fontos, hogy olyan mérési lehetőségek álljanak rendelkezésünkre, amelyek



megbízhatóan jellemezhetik a környezetbe kerülő vegyí anyagok hatását a teljes ökoszisztémára (binnen végeredményben az emberre is) vonatkozóan.

A biokémikus is sok esetben *in vitro* körülmények között modellezi az élővilág eseményeit. A kör-

nyezettoxikológus sem emberrel kísérletezik, hanem az ökoszisztéma alacsonyabb rendű egyedeit használja kísérleti alanyokként, és a náluk észlelt hatásokból következtet az egyes vegyí anyagoknak a teljes élő rendszerre kifejtett hatására. Természetesen ebben az esetben is fontos a kísérleti alanyok kiválasztása, mert ezzel tudjuk a kockázatbecslés hibáját minél kisebbre csökkenteni. A megjelent könyv ehhez nyújt segítséget az alábbi főbb témakörök részletes tárgyalásával:

1. Környezettoxikológia és a kockázat kezelése:
 - Vegyí anyagok hatása a környezetre
 - Toxikológiai tesztek egyedi és több faj bevonásával
2. Ökotoxikológia és a vegyí anyagok kockázata:
 - A kockázat mérésének alapja, kockázatfelmérés, határértékképzés
 - A szennyezett területek kockázata és egyedi határértéke
 - Környezetirányítási döntések
3. Szennyezett talajok ökotoxikológiai jellemzése:
 - A talajökoszisztéma tagjai, a talaj tesztelésére alkalmas módszerek (egy és több fajt alkalmazó módszerek, rezisztencia, szabadföldi tesztek, bioszenzorok, géntechnikák stb.).

A fenti témakörök kiegészítésére részletes praktikum, szakirodalom és fogalomtár is található a könyvben. A könyvet a Műegyetemi Kiadó adta ki 2001-ben. Készült a Műegyetemi Nyomdában. Azonosító száma: 65036, ISBN 963 420 676 x

László Elemér

 **NOVO-LAB**

BIOMETRA THERMOCYCLEREK



*T*personal



*T*gradient



*T*1




*T*3

Gyorsaság és pontosság
5 variációja



*T*robot

Whatman **Biometra®**

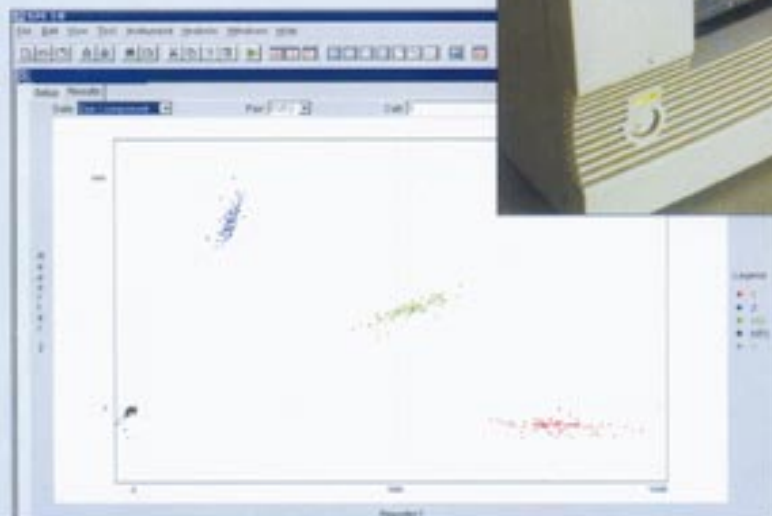
 **NOVO-LAB**

1191 Budapest, Üllői út 200. Tel/Fax: 281-3692
Levél cím: 1068 Budapest, Pf.: 21 e-mail: info@novolab.hu



SNP FELFEDEZÉS ÉS GENOTIPIZÁLÁS

- A komparatív szekvenálás eszközei
- SNaPshot™ Multiplex Kit:
egy nukleotid primer extenzió



- TaqMan® allél-diszkrimináció
- Kész tesztek több mint
120 000 humán SNP-re

Science for Life™

AB Applied Biosystems

Data. Decipher. Discover.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists. Applied Biosystems consists of the Applied Biosystems and Celeris Genomics businesses. The PCR process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F.Hoffmann-La-Roche Ltd. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

1146 Budapest, Hermina ut 17.
T (1) 471 8989 F (1) 471 8980