

# 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. 2. SZÁM

2003. JÚNIUS

A tartalomból:

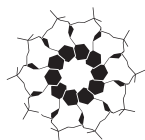
- ◇ Talajszennyezők biomonitorozása – *Kovács Tamás, Kovács Árpád László, Nagy Norbert és Tubak Vilmos*
- ◇ A fehérjék újrafelfedezett térszerkezete: Kurt Wüthrich kémiai Nobel-díja – *Gáspári Zoltán és Perczel András*
- ◇ Sanofi-Synthélabo Magyar Kutatási Díj – *Orosz Jenő*
- ◇ FluorChem 9900 – Az Alpha Innotech új géldokumentációs rendszere – *Holló Róbert*
- ◇ Biotechnológia 2003 Magyarország – *Székács András*
- ◇ Kispál Gyula professzor (1957–2003) – *Sándor Attila*

Címlapkép: *Török Ferenc, Cím nélkül (2001), olaj, vászon (ld. a „Művészarok” rovatot a 41. oldalon.)*



Contents:

- ◇ Biomonitoring of soil contaminants – *Tamás Kovács, László Á. Kovács, Norbert Nagy and Vilmos Tubak*
- ◇ Protein structure rediscovered: the chemical Nobel Prize of Kurt Wüthrich – *Zoltán Gáspári and András Perczel*
- ◇ Sanofi-Synthélabo Hungarian Research Award – *Jenő Orosz*
- ◇ FluorChem 9900 – the new gel documentation system by Alpha Innotech – *Róbert Holló*
- ◇ Biotechnology 2003 Hungary – *András Székács*
- ◇ Prof. Gyula Kispál (1957–2003) – *Attila Sándor*



MAGYAR  
BIOKÉMIAI  
EGYESÜLET

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

e-mail: [biokemia@nki.hu](mailto: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

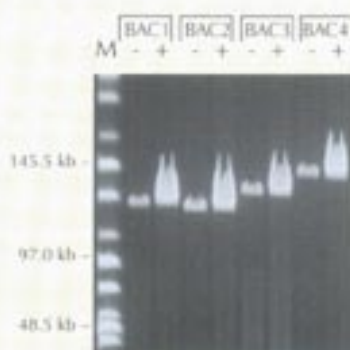
from EPICENTRE

EPICENTRE's CopyControl™ Cloning Kits – based on technology developed in the laboratory of Dr. Waclaw Szybalski<sup>1</sup> – 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](http://www.epicentre.com/cc_tutorial.asp).

## CopyControl™ Fosmid Library Production Kit

- Blunt-end cloning process ensures complete and unbiased libraries of >10<sup>6</sup> 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.

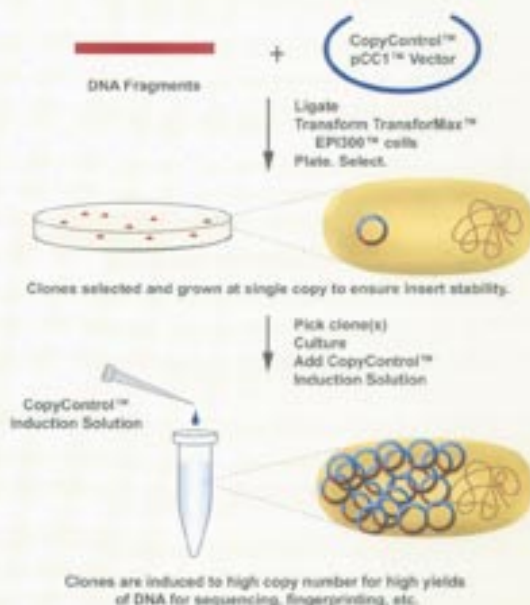
## Now, Incorporate CopyControl Capability Into Existing Single-Copy BAC and Fosmid Clones.

Visit [www.epicentre.com/transposomics.asp](http://www.epicentre.com/transposomics.asp) for information.

### Reference

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

[www.epicentre.com/ccfos.asp](http://www.epicentre.com/ccfos.asp)  
[www.epicentre.com/ccbac.asp](http://www.epicentre.com/ccbac.asp)  
[www.epicentre.com/transposomics.asp](http://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](http://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@axelero.hu](mailto:kvalitex@axelero.hu)

# Talajszennyezők biomonitorozása

## Biomonitoring of soil contaminants

Kovács Tamás<sup>1\*</sup>, Kovács Árpád László<sup>1</sup>,  
Nagy Norbert<sup>2</sup>, Tubak Vilmos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ENVIROINVEST Kft.,  
1055 Budapest, Szalay u. 4.

<sup>2</sup> TRIO-LAB Kft.,  
6720 Szeged, Petőfi sgt. 10.

\* tel.: (1) 354 0156, fax: (1) 354 0159,  
e-mail: kovacst@enviroinvest.hu

### Összefoglalás

Ha valamely szennyeződés huzamosabb ideig van jelen a talajban, spontán feldúsulhatnak az adott szennyeződést bontani képes vagy az ellene rezisztens mikroorganizmusok. A szennyeződés valamely koncentrációtartományában a szennyezőanyag koncentrációja és az ellene rezisztenciát biztosító gén gyakorisága között lineáris összefüggés állhat fenn. Célunk, hogy kidolgozzunk egy olyan biokémiai vizsgáló (*biomonitoring*) eljárást, mellyel gyorsan és olcsón nagyszámú minta szennyezőanyag-koncentrációja vizsgálható az alábbi szennyezőanyagokra: triklór-etilén,  $\gamma$ -hexaklór-ciklohexán, poliklórozott bifenilek, nehézfémek (kadmium, cink, ólom); továbbá célunk, hogy meghatározzuk a talajnak e szennyezőkre vonatkozó bioremediációs potenciálját.

### Bevezetés

A talajszennyezők közül az élőlényekre nézve rendkívül veszélyesek a nehézfémek, illetve a karcinogén vegyületek, mint például a régi típusú transzformátorolajokban található poliklórozott bifenilek (PCB-k), a klórozott szénhidrogének, például az oldószerként használatos triklór-etilén (TCE), a klórozott gyűrűs szénhidrogének, például a  $\gamma$ -hexaklór-ciklohexán (HCH), mely a közelmúltig engedélyezett rovarirtó szer (inszekticid) volt. A talajszennyezések felszámolásának ígéretes megközelítése a bioremediáció. Az ilyen beavatkozás előtt azonban ismerni kell a különböző szennyezőanyagok koncentrációját a talajban annak eldöntésére, hogy ezek eltávolítása lehetséges-e

Kovács, T.<sup>1\*</sup>, Kovács, Á. L.<sup>1</sup>, Nagy, N.<sup>2</sup>,  
Tubak, V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ENVIROINVEST Kft.,  
H-1055 Budapest, Szalay u. 4, Hungary

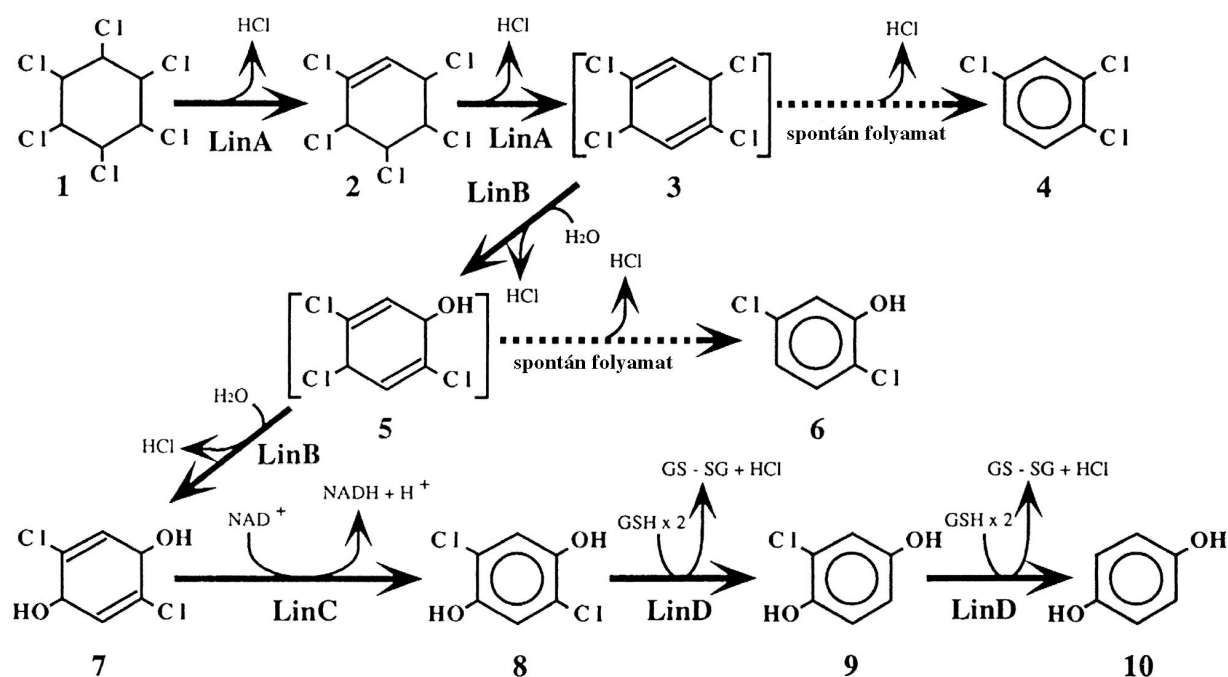
<sup>2</sup> TRIO-LAB Kft.,  
H-6720 Szeged, Petőfi sgt. 10, Hungary

\* phone: +36 1 354 0156, fax: +36 1 354 0159,  
e-mail: kovacst@enviroinvest.hu

### Summary

In case of long term persistence of a certain pollutant in the soil, there could be spontaneous enrichment of microorganisms resistant against that pollutant or capable to degrade it. In a given concentration range of pollutants a linear correlation may exist between the pollutant concentration and the frequency of the gene encoding for the corresponding degrading enzyme activity. Our goal is to develop a quick and cheap biomonitoring method, which is able to measure the pollutant concentration of the following chemicals in a high-throughput form: trichloroethylene,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, polychlorinated biphenyls and heavy metals (Cd, Zn, Pb). Moreover, we are planning to measure the bioremediational potential of the soil for these pollutants.

bioremediáció útján. A hagyományos laboratóriumi analitikai módszerekkel meghatározott értékek alapján azonban teljes biztonsággal nem dönthető el, hogy a bioremediáció végbemegy-e, hiszen a speciális helyi fizikai/kémiai adottságokon túlmenően figyelembe kell venni a szennyezőanyagok egymásra gyakorolt hatását is. Ezért célul tűztük ki, hogy kifejlesszünk egy olyan *biomonitoring* eljárást, melynek segítségével megbízhatóan és gyorsan eldönthető, hogy az adott területen sikerre vezet-e a bioremediáció, illetve meghatározható, hogy bizonyos szennyezőanyagok (TCE, PCB-k, HCH, kadmium, cink, ólom) koncentrációja eléri-e a 10/2000 (VI.2) KÖM-EüM-FVM-KHVM rendeletben megfogalmazott beavatkozási határértékeket.



1. ábra A HCH biodegradációja [4]. Enzimek: LinA:  $\gamma$ -hexaklór-ciklohexán dehidroklorináz; LinB: 1,3,4,6-tetraklór-1,4-ciklohexadién halidohidroláz; LinC: 2,5-diklór-2,5-ciklohexadién-1,4-diol dehidrogenáz; LinD: 2,5-diklórhidrokinon deklorináz.

Az általunk alkalmazni kívánt eljárás alapelve, hogy amennyiben a szennyezés mikrobiológiai lebontásának feltételei adottak, akkor spontán kialakul egy helyi mikroflóra, melyben jelen lesznek az adott szennyezés lebontására szolgáló enzimek génjei. Amennyiben a szennyezőanyag jelen van a környezetben, az ez ellen rezisztenciát biztosító,

illetve a szennyezőanyag tápanyagként való hasznosítását lehetővé tevő fehérjéket kódoló gének szelektív előnyt biztosítanak az azokat hordozó baktériumok számára. A gének előfordulási gyakorisága egy, a jelen fejlesztés során meghatározandó tartományban egyenesen arányos lehet az adott szennyezőanyag koncentrációjával. Amennyiben e



**Kovács Tamás** (1970) biológus, PhD-fokozatát a *Bacillus subtilis* molekuláris stresszbiológiájának tanulmányozásából szerezte. Érdeklődési területe a környezetvédelmi mikrobiológia, különösen a talaj és a talajvíz szennyező komponensei felszámolásának molekuláris biológiai megközelítése.



**Kovács Árpád László** (1946) vegyészmérnök, környezetvédelmi szakmérnök. A környezetvédelem és vízgazdálkodás területén 28 éves közigazgatási gyakorlatra tett szert. 1998-tól az ENVIROINVEST Kft. ügyvezetője. Több szabadalommal rendelkezik szennyvíztisztítási és kárelhárítási technológiákkal kapcsolatban.

**Nagy Norbert** (1973) orvos, közgazdász. 2001-től a TRIO-LAB Kft. ügyvezetője. Érdeklődési területe a baktériumok, vírusok, valamint a genetikai betegségek molekuláris biológiai kimutatása. Több szabadalommal és tudományos közleménnyel rendelkezik.

**Tubak Vilmos** 1989-ben végzett általános orvosként. Végzés után az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében dolgozott. Jelenleg két biotechnológiai cégben társtulajdonos és vezető tudományos munkatárs. Összimpaktszám: 20.1.



gének előfordulási gyakoriságát mérjük, meghatárjuk a talaj mikroflórájának biodegradációs potenciálját. Továbbá amennyiben lehetővé tesszük a módszer validálásával, hogy a „hagyományos” analitikai módszerekkel összehasonlítva, az adott területen néhány próbamérés után meghatározhatjuk a *biomonitoring* eljárás alapján a különböző szennyezők koncentrációját legalább olyan pontossággal, amelyből megbecsülhető, hogy az adott szennyezőanyag koncentrációja eléri-e a beavatkozási határértékeket, csökkenthető lesz az analitikai kémiai vizsgálatokra kerülő minták száma, amely költségmegtakarítást eredményez.

## Módszerek

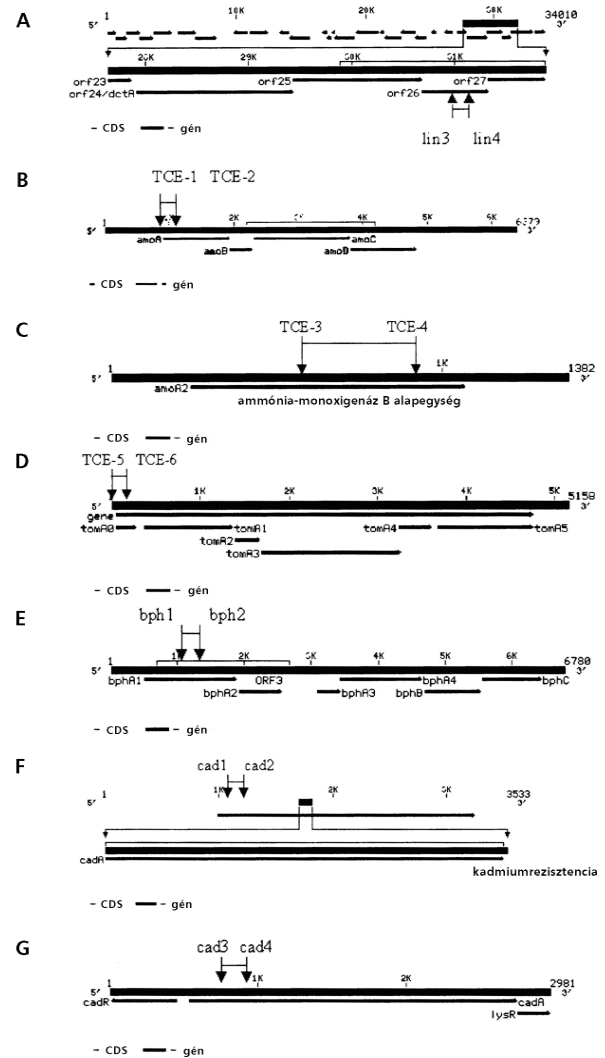
A biomonitorozás menete során a talajból összes DNS-t izolálunk [1], *slot-blotting* módszerrel nitrocellulóz membránra hígítási sort rögzítünk a DNS-ből, majd a membránra kötött DNS-t hibridizáljuk a tesztgénre specifikus, immunológiai módszerrel jelölt próbával [2]. A jelölés előhívása után a röntgenfilmet denzitometriásan kiértékeljük, és megadjuk a tesztgén koncentrációját az összes DNS-hez viszonyítva [2]. Ezt az eredményt viszonyítjuk a validálásos lépésben meghatározott DNS-mennyiséghez.

## Eredmények és diszkusszió

### $\gamma$ -hexaklór-ciklohexán-szennyeződés biomonitorozása

HCH-bontásra csupán néhány baktériumfaj képes. Közülük a legjobban jellemzettek a következők: *Sphingomonas paucimobilis*, *Rhizobium sp.* (NGR234 plazmidon kódolva), *Mesorhizobium meliloti*, *Streptomyces laevidulae* [3]. A HCH bontásának eddig leginkább tanulmányozott útja a LinA–LinB–LinC–LinD enzimek által katalizált úthoz kötődik (1. ábra). A Lin enzimek közül a HCH-biodegradáció kezdeti lépését katalizáló LinA (HCH-dehidroklorináz) génjét választottuk a *biomonitoring* számára tesztgénül. Az NGR234 plazmidot hordozó *Rhizobium sp. linA* génjével folytattuk vizsgálatainkat, mivel e baktérium talajlakó, illetve az NGR23 plazmid mozgékony genetikai elem, ami biztosítja a gyors adaptációt.

A 2. ábrán látható a primerek (*lin3*, *lin4*) által sokszorozott próba és a primerek génen belüli elhelyezkedése. A próba a fellelhető irodalmi adatok alapján kizárólag csak az NGR234-en található *linA*

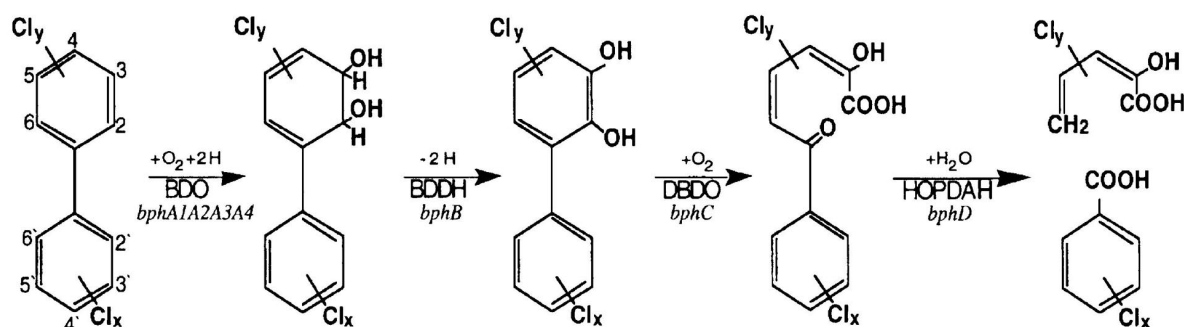


2. ábra Primerek tervezése. (A) *Rhizobium sp. linA* (*lin3*, *lin4*); (B) *N. corallina amoA1* (TCE-1, TCE-2); (C) *N. europea amoA* (TCE-3, TCE-4); (D) *B. cepacia tomA0* (TCE-5, TCE-6); (E) *P. pseudoalcaligenes bphA1* (*bph1*, *bph2*); (F) *S. aureus cadA* (*cad1*, *cad2*); (G) *P. putida cadA* (*cad3*, *cad4*).

génnel hibridizál. A jelölt próba elkészült, a *linA* gént klónoztuk pBlu2SKP plazmidba és *Escherichia coli* mikroorganizmusba transzformáltuk.

### Triklór-etilén-szennyezés biomonitorozása

A triklór-etilén (TCE) bontására a következő mono- és dioxigenáz enzimek képesek: ammónia-monooxigenáz, metán-monooxigenáz, alkén-monooxigenáz, propán-monooxigenáz, tulén-monooxigenáz, tulén-dioxigenáz, izopropil-benzol-dioxigenáz [5]. A TCE biomonitorozásában azonban sajátos problémák adódnak. Az egyik nehézség, hogy a TCE-bontás bizonyos közti termékei (epoxidok) toxiku-



3. ábra A PCB-k biodegradációja [12]. Enzimek: BphA: bifenil 2,3-dioxigenáz; BphB: bifenil-2,3-dihidrodiol 2,3-dehidrogenáz; BphC: 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenáz; BphD: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil-hexa-2,4-dienoát hidroláz.

sak a baktériumokra nézve [6], tehát ebből a szempontból a TCE-degradációs képesség megléte szelekciós hátrányt jelent. A másik nehézség, hogy (egyres ammónia-monooxigenázok kivételével [7]) a TCE-bontásért felelős gének indukciójához szükséges bizonyos aromás és alifás szénhidrogének jelenléte is [8]. Emiatt kérdéses, hogy van-e összefüggés a gényakoriság és a TCE-koncentráció között. Megoldást jelent, hogy a módszert minden esetben validálni fogjuk, továbbá többféle gén (köztük a TCE inducibilis ammónia-monooxigenáz gén) biomonitorozását fogjuk elvégezni.

A biomonitorozáshoz az alábbi három gént választottuk: (1) a *Nocardia corallina amoA* génje az alkén-monooxigenáz epoxidáz alegységét kódolja, mely bontja a TCE-t; (2) a *Nitrosomonas europea amoA1* génje az ammónia-monooxigenáz acetilénköltő alegységét kódolja, mely enzim képes a TCE-t bontani, illetve a TCE indukálja a tesztgént; a *Burkholderia cepacia tomA0* génje a tulén-orto-monooxigenázt kódolja, mely enzim bontja a TCE-t. A primerek és a próbák elhelyezkedését a 2. ábra szemlélteti.

Mindhárom faj esetében a próba a fellelhető irodalmi adatok alapján kizárólag csak az adott faj tesztgénjével hibridizál. Mindhárom jelölt próba elkészült, a tesztgéneket klónoztuk pBlu2SKP plazmidba és transzformáltuk *Escherichia coli*-ba.

#### Poliklórozott bifenílek (PCB-k) biomonitorozása

A PCB-bontás történhet aerob módon (oxidatív), illetve anaerob körülmények között, redukzív dehalogénezéssel [9]. A PCB-k biodegradálhatósága a klórozottság fokától és pozíciójától függ [10]. A bifenílhasználó baktériumok a legtöbb esetben

PCB-ket is képesek bontani [10]. A bifenílhasználásért és a PCB-bontásért felelős *bph* géneket több baktériumfajból izolálták és jellemezték [11]. A PCB-k bontásának kezdeti lépéseit a 3. ábra mutatja be.

A BphA enzim egy négy alegységből álló, IIB típusú (gyűrűaktiváló) dioxigenáz. A biomonitorozáshoz a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 *bphA1* génjét választottuk. Ez a PCB-bontás kezdeti lépését katalizáló bifeníl-dioxigenáz nagy alegységét kódolja. A *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 bifeníl-dioxigenáza bizonyítottan képes PCB-ket bontani [13]. A primerek és a próba elhelyezkedését a 2. ábra szemlélteti. A próbakkal több *Pseudomonas sp.* és *Burkholderia sp.* faj *bphA* génje fog hibridizálni. A jelölt próba elkészült, a tesztgéneket klónoztuk pBlu2SKP plazmidba és transzformáltuk *Escherichia coli*-ba.

#### Nehézfémek biomonitorozása

A kadmiumrezisztencia mechanizmusa eltér Gram+ és Gram- baktériumokban, valamint kék algákban [14]. Gram+ baktériumokban a legelterjedtebbek az ATP által energizált aktív transzportrendszerek (CadA-CadC rendszer), ugyanakkor egyes baktériumok olyan fehérjéket termelnek, melyek meggátolják a kadmium sejtbe jutását (CadB-CadX rendszer). Gram- baktériumokban a legelterjedtebbek a fémmion-proton antiporter aktívtranszport-folyamatok (CzC-CzR rendszer), ugyanakkor itt is megtalálható az ATP által energizált CadA-CadC rendszer, illetve a szintén ATP által energizált ZntA-függő transzportrendszer. Kék algákban leggyakrabban a metallotioneinekhez kapcsolódó rezisztencia fordul elő. Tesztgénként a *cadA*-t választottuk, mivel elterjedt Gram+ baktériumokban, illetve megtalálható

Gram– baktériumokban is. A CadA–CadC rendszer kétkomponensű: a CadA az ATP-áz aktivitású transzportfehérje [15], a CadC pedig szabályozó fehérje [16]. A rendszer kadmium- és cinkspecifikus, ugyanakkor nagy ólomkoncentráció esetén is indukálódik [15].

A *cadA* gént hordozó mikroorganizmusok közül a *Staphylococcus aureus* (*cadA* génje alaposan jellemzett [16], tartalmaz homológ szakaszokat más Gram+ *cadA* génekkel) és a *Pseudomonas putida* (talajlakó, az egyetlen Gram– baktérium, melyben leírták ezt a kétkomponensű rendszert) fajokat választottuk ki a *cadA* forrásául.

A *S. aureus cadA* génre tervezett próba a fémkötőhelyet kódoló szakaszra és annak közelébe esik (2. ábra). A próbával több más faj (pl. *Bacillus firmus*, *Stenotrophomonas maltophilia*) *cadA* génje is kimutatható. A *P. putida cadA* primerekkel egy 422 bp hosszú próba amplifikálható (2. ábra), mellyel csak a *P. putida cadA* génje hibridizál. Mindkét jelölt próba elkészült, a tesztgéneket klónoztuk pBlu2SKP plazmidba és transzformáltuk *Escherichia coli*-ba.

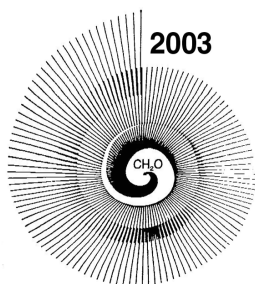
A fejlesztési munka jelen szakaszában tehát valamennyi tesztgént sikeresen izoláltuk, klónoztuk, továbbá rendelkezünk az összes szükséges jelölt próbával. Következő lépésként először megtörténik a módszer validálása, majd üzemi kísérletet fogunk elvégezni.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki az Oktatási Minisztérium biotechnológia programjának támogatásáért.

## Irodalomjegyzék

- [1] Sikorski, J., Teschner, N., Wäckernagel, W. (2002) Highly different levels of natural transformation are associated with genomic subgroups within a local population of *Pseudomonas stutzeri* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 865–873.
- [2] Kovács, T., Hargitai A., Kovács K. L., Mécs I. (1998) pH-Dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **165**: 323–328.
- [3] Thomas, J. C., Berger, F., Jacquier, M., Bernillon, D., Baud-Grasset, F., Truffaut, N., Normand, P., Vogel, T. M., Simonetm P. (1996) Isolation and characterization of a novel gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J. Bacteriol.*, **178**: 6049–6055.
- [4] Nagata, Y., Futamura, A., Miyauchi, K., Takagi, M., (1999) Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J. Bacteriol.*, **181**: 5409–5413.
- [5] Pflugmacher, U., Averhoff, B., Gottschalk, G. (1996) Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3967–3977.
- [6] Fox, B. G., Borneman, B. G., Wackett, L. P., Lipscomb, J.D. (1990) Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Mechanistic and environmental implications. *Biochemistry*, **29**: 6419–6427.
- [7] Vannelli, T., Hooper, A. B. (1990) Reductive dehalogenation of the trichloromethyl group of nitrapyrin by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3597–3601.
- [8] Berendes, F., Sabarth, N., Averhoff, B., Gottschalk, G. (1998) Construction and use of an ipb DNA module to generate *Pseudomonas* strains with constitutive trichloroethene and isopropylbenzene oxidation activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2454–2462.
- [9] Wiegel, J., Wu, Q. (2000) Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **32**: 1–15.
- [10] Seeger, M., Zielinski, M., Timmis, K. N., Hofer, B. (1999) Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3614–3621.
- [11] Arnett, C. M., Parales, J. V., Haddock, J. D. (2000) Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 2928–2933.
- [12] McKay, D. B., Seeger, M., Zielinski, M., Hofer, B., Timmis, N. (1997) Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the gene products. *J. Bacteriol.*, **179**: 1924–1930.
- [13] Furukawa, K., Hayase, N., Taira, K., Tomizuka, N., (1989) Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J. Bacteriol.*, **171**: 5467–5472.
- [14] Silver, S., Phung, L. T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**: 753–789.
- [15] Tsai, K.-J., Lin, Y.-F., Wong, M. D., Yang, H. H.-C., Fu, H.-L., Rosen, B. P. (2002) Membrane topology of the p1258 CadA Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-translocating P-type ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**: 147–156.
- [16] Endo, G., Silver, S. (1995) CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *J. Bacteriol.*, **177**: 4437–4441.



6th International Conference

## ON ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS METHYLATION AND DEMETHYLATION PROCESSES

October 12–16, 2003, Pécs, Hungary

More information: Prof. Ernő Tyihák

Tel.: +36-1-4877-515 Fax: +36-1-4877-555 E-mail: etyih@nki.hu



# 30<sup>TH</sup> FEBS CONGRESS & 9<sup>TH</sup> IUBMB CONFERENCE BUDAPEST, HUNGARY

2ND - 7TH JULY 2005

[WWW.FEBS-IUBMB-2005.COM](http://WWW.FEBS-IUBMB-2005.COM)

## The Protein World

### Proteins and Peptides: Structure, Function and Organization

President: Peter Friedrich  
Scientific Program Committee: Balázs Sarkadi (Chair)  
Organizing Committee: Peter Conway (Chair)

International Scientific Advisory Board:  
Tamas Berka (USA), Marc Esmonin (Finland),  
Julio Cebal (Denmark), Pierre Chambon (France),  
Brian Clark (Denmark), Thomas Czech (USA),  
Christopher N. Doolittle (UK), Julia Downward (UK),  
Miroslav Fligel (Croatia), Susana Gonsky (USA),  
Jose J. Gubrovic (Spain), Nikolay S. Jovan (Bosnia),  
Linda Hsu (Belgium), Robert Huber (Germany),  
Gerhard Knottner (Austria), Soomo Lindqvist (USA),  
Vitor Ling (Canada), Maciej Nulicz (Poland),  
Christiane Rauscher-Pollard (Germany),  
Yves Fassinou (France), Israel Pecht (Israel),  
Lorenzo A. Piro (Italy), George Bokla (UK),  
Joel L. Sussman (Israel), Vito Turk (Slovenia),  
Karel Wirtz (The Netherlands)

#### PLANNED SCIENTIFIC PROGRAM

- Functional Genomics, Proteomics, Bioinformatics
- Protein Structure and Interactions – Folding and Misfolding
  - Proteases
  - Signal Transduction
  - Peptide Organization and Peptides in Drug Development
  - Membrane Proteins and their Interactions
  - Molecular Motors
  - Protein Biotechnology
  - Proteins in Development and Disease
- Protein Modifications in Health and Disease
  - Plant Proteins
- Proteins of the Transcription Machinery

#### SATELLITE MEETINGS:

Glycosylation: Protein Modifications for Cellular Functions  
June 28-30, 2005, Dubrovnik, Croatia (Gordana Lasi, [glasopharma.hr](mailto:glasopharma.hr))

Biological Electron Transport in Respiration and Photosynthesis: Structure and Function of Biologically Relevant Proteins  
June 28-July 2, 2005, Schlosshotel Wilhelmsberg, Vienna, Austria (Günter A. Frey, [gunter.frey@univie.ac.at](mailto:gunter.frey@univie.ac.at))

Protein Folding and Transport in Health and in Disease, June 28-July 2, 2005, Bucharest, Romania (Cristina Petrescu, [cpetrescu@chim.ro](mailto:cpetrescu@chim.ro))

9th International Symposium on Proteases: Inhibitors and Biological Control, June 28-June 29, 2005, Brno (Zuzana Kraljic, [zuzana.kraljic@brno.cz](mailto:zuzana.kraljic@brno.cz))

#### PLANNED SPECIAL EVENTS:

- Youth Program
- Meet the Emcee – Meet the Expert
- Youth Excellence Awards
- Science Education
- Teaching of Biochemistry
- Media Relations
- Public Awareness Program
- Women in Science
- Intellectual Property Rights
- When your Proteins get Stressed: a Mixed Lecture Session
- The Best Protein Cook Contest "The Most Beautiful Protein"
- Sculpture and 3-D Modelling Contest
- The Sound of Proteins: Concert
- Lift your Proteins to the Air: FEBS-IUBMB Balloon
- Hungarian Protein Products – Fair



#### SECRETARIAT:

2005 FEBS Congress and IUBMB Conference  
Chemol Travel Congress Department  
MAILING ADDRESS: H-1366 Budapest, P.O. Box 28., Hungary  
STREET ADDRESS: H-1052 Budapest, Deák Ferenc str. 10., Hungary  
TEL: +36-1-266-7032, FAX: +36-1-266-7033  
E-MAIL: [incoming@chemoltravel.hu](mailto:incoming@chemoltravel.hu)

**Science is Fun:  
a Conference for your Creativity**





# 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 higiéniai vizsgálatokhoz

### ÁLTALÁNOS 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.

**FAX:**

Tel.: 47-00-125, 221-7865, 221-7866

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.

# A fehérjék újrafelfedezett térszerkezete: Kurt Wüthrich kémiai Nobel-díja

## Protein structure rediscovered: the chemical Nobel Prize of Kurt Wüthrich

Gáspári Zoltán és Perczel András

Eötvös Loránd Tudományegyetem,  
Szerves Kémiai Tanszék, 1518 Budapest 112, Pf. 32

### Összefoglalás

A 2002. évi kémiai Nobel-díj egyik kitüntetettje Kurt Wüthrich, a Zürichi Műszaki Egyetem tanára. Wüthrich munkásságának egyik legnagyobb eredménye, hogy megnyitotta az utat a fehérjék térszerkezetének NMR-spektroszkópiával, oldatfázisban történő vizsgálatához. Ma már az NMR a biomolekulák atomi szintű szerkezetfelderítésében a röntgenkristallográfia egyenrangú társa, számában és arányában is egyre több az oldatfázisban meghatározott fehérjeszerkezet. A fehérje NMR-spektroszkópia széles körű elterjedése számos olyan vizsgálati módszer megjelenését hozta magával, amelyek segítségével a fehérjék szerkezetének és hatásmechanizmusának új aspektusai tanulmányozhatók. A feltároló „képben” a természet eddig rejtett, másként ismert arcára, a fehérjék működésének dinamikus jellegére csodálkozhatunk rá.

Gáspári, Z. and Perczel, A.

Eötvös Loránd University, Department of Organic Chemistry, H-1518 Budapest 112, POB 32, Hungary.

### Summary

The 2002 Nobel Prize in chemistry was awarded partly to Kurt Wüthrich, professor of ETH Zürich. One of the main achievements of his research was to open the way for protein structure determination by NMR spectroscopy in solution. Nowadays, NMR is as potent as crystallography in atomic level biomolecular structure determination, as shown by the increasing number of protein NMR structures. The widespread application of protein NMR led to the invention of many new techniques to study new aspects of protein structure and function. The emerging picture allows us to get insight into the dynamical features of protein mechanisms.

A biokémikusok számára ma már természetes, hogy egyes fehérjék háromdimenziós térszerkezete adatbázisból hozzáférhető, onnan letölthető és felhasználható a kísérleti eredmények értékeléséhez, illetve új kutatási irányok kijelöléséhez. Köztudott, hogy az ismert térszerkezetek száma évről évre egyre gyorsabban növekszik. E hatalmas iramú fejlődés alapjait még az ötvenes években rakta le többek között Max Perutz és John Kendrew [1], akiknek egyben kiemelkedő szerepük volt a fehérjekristallográfia megszületésében. A ma ismert fehérje-térszerkezetek döntő többségét (~90%) röntgenkristallográfia segítségével határozták meg. A kilencvenes évektől azonban nemcsak abszolút értelemben, hanem arányaiban is egyre több az NMR-spektroszkópiai módszerekkel megoldott fehérjeszerkezetek száma. A nyolcvanas évek köze-

pén kidolgozott eljárás térhódítását jól jellemzi, hogy míg 1990-ben a *Protein Data Bank* (röviden PDB) adatbázisban elérhető szerkezetek mindössze 2%-a „készült” NMR-technikával, 2002-re ez az arány már közel 10%-ra emelkedett (2458 a 17736-ból). Az eljárás kidolgozásában döntő szerepet játszó Kurt Wüthrich 2002-es Nobel-díjához e meggyőző számok mellett döntően járult hozzá, hogy az NMR-spektroszkópiának egyre több olyan alkalmazása jelenik meg, amely új megvilágításba helyezi mindazt, amit a fehérjék szerkezetéről azelőtt gondoltunk.

### Egyről a kettőre

A hatvanas és hetvenes években egy fehérje NMR-spektroszkópiai vizsgálata azt jelentette, hogy a

megfelelő egydimenziós spektrumban a molekulát felépítő több száz vagy esetleg több ezer hidrogénhez tartozó jelhalmazból szerencsés esetben néhány különleges kémiai eltolódású proton jelét azonosították. A csúcsok többségének azonosítása azonban reménytelen és megoldhatatlan feladatnak látszott. Ugyanakkor egyre nyilvánvalóbbá váltak az NMR-spektroszkópia előnyei bizonyos esetekben (például a BPTI [*bovine pancreatic trypsin inhibitor*, PDB-kód: 1BPT] dinamikus viselkedésének jellemzése az oldószerrel lassan cserélődő protonok jeleinek segítségével), a néhány vizsgálható protonnal kapcsolatban egyre újabb és újabb kérdések megválaszolása vált lehetővé. A szóban forgó atomok térszerkezetbeli helyzetéről azonban csak röntgenkristallográfiai adatok álltak rendelkezésre, ha voltak egyáltalán ilyenek az adott fehérje vagy peptid esetében.

A hetvenes évektől kezdődött a többdimenziós méréstechnikák (pl. COSY, NOESY – lásd alább) megalkotása és elterjedése, melyben Wüthrich egyetemi kollégája, az 1991-ben kémiai Nobel-díjjal kitüntetett Richard Ernst munkássága meghatározó [2]. A kétdimenziós mérések alkalmazása volt az a technikai áttörés, amely végül lehetővé tette a fehérjék spektrumában a jelek maradéktalan azonosítását. A metodikai fejlődés azonban nem azonnal hozta magával a fehérje NMR-spektroszkópia forradalmát: a megfelelő mérések alkalmazásának és a spektrumok kiértékelésének új módszereit is ki kellett dolgozni.

A hetvenes évek második felében az akkor már régóta fehérje-NMR-technikával foglalkozó Kurt Wüthrich hirdette meg azt a célt, hogy a fehérjék atomi szintű szerkezete NMR-spektroszkópiai módszerekkel is meghatározható legyen. A rendel-

kezésre álló elméleti háttér eredményeit a gyakorlatba ültetve 1984-re megszületett az első oldatfázisú fehérjeszerkezet (BUSI), melyet még Wüthrich kollégái is kételkedéssel fogadtak. Azzal vádolták őt, hogy egy homológ fehérje röntgenszerkezetének ismeretében oldotta meg a problémát. A szakma előtt így bizonyítania kellett az eljárás autonóm voltát. Egy addig ismeretlen térszerkezetű fehérjén (Tendamistat, egy  $\alpha$ -amiláz-inhibitor) igazolta az eljárás kivitelezhetőségét – egy olyan fehérjén, amelyen az NMR-spektroszkópusokkal egy időben kezdtek fehérjekristallográfusok is dolgozni. Nem csak ez a „teszt”, de a későbbiekben a technika széles körű elterjedése is egybehangzóan Wüthrich elgondolását igazolta: az NMR-spektroszkópia a biomakromolekulák atomi szintű szerkezetmeghatározására alkalmas módszer [3]. Az elmúlt két évtizedben a fehérje-NMR az egyedi problémákra megoldást nyújtó egydimenziós mérések alkalmazásától a két- és többdimenziós spektrumok rutinszerű felvételét és értelmezését jelentő, számos szerkezeti kérdés megválaszolására használható, igen hatékony eljárássá fejlődött.

### Rezonanciáktól a rendezettségig

Lássuk tehát, miben is áll Wüthrich eljárásának lényege, melynek segítségével oldatfázisban, „majdnem élőben” vizsgálhatók a fehérjeszerkezetek! (Bár a szerkezetmeghatározáshoz szükséges fehérjekoncentráció (1–5 mg/ml) és sokszor az alkalmazott pH (~3) sem felel meg a fiziológiás körülményeknek, a kristályosítás során előálló és sokat vitatott „műtermékek” („befagyott” konformációk, csak a kristályban kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatások stb.) kiküszöbölése kétségkívül közelebb visz az „élő” fehérjék világához.) Először



**Gáspári Zoltán** 1999-ben végzett az ELTE biológus szakán. Szakdolgozatát az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén készítette. Doktori kutatási témája kisméretű szerinproteáz-inhibitorok szerkezetének és dinamikájának vizsgálata NMR-spektroszkópiai módszerekkel. 2003 óta tudományos segédmunkatárs a Szerves Kémiai Tanszéken.

**Perczel András** 1985-ben szerzett diplomát az ELTE vegyész szakán. Kandidátusi értekezését 1992-ben védte meg, akadémiai doktori címét 1999-ben szerezte meg. 1985 óta a Szerves Kémiai Tanszék munkatársa, jelenleg egyetemi tanár. Kutatási területe peptidok és fehérjék szerkezetkutatása *ab initio* módszerekkel és NMR-spektroszkópiával. Kutatási ösztöndíjjal Prof. G.D. Fasman (Brandeis, Boston, USA 1989-1992), Prof. H.H. Mantsch (NRC Ottawa, Canada 1991), Prof. I.G. Csizmadia (Univ. of Toronto, Canada 1991, 1992-1994) és Prof. I.D. Campbell (Univ. of Oxford, UK 1994, 1995-1997, 1998) munkatársaként dolgozott.



néhány alapvető spektrumtípust mutatunk be, aztán áttekintjük, hogyan rakhatók össze térszerkezetté az ezekből nyerhető különféle ismeretek. A teljes folyamatot először ún. homonukleáris kétdimenziós spektrumok segítségével szemléltetjük, majd említést teszünk a háromdimenziós technikák alkalmazásairól is.

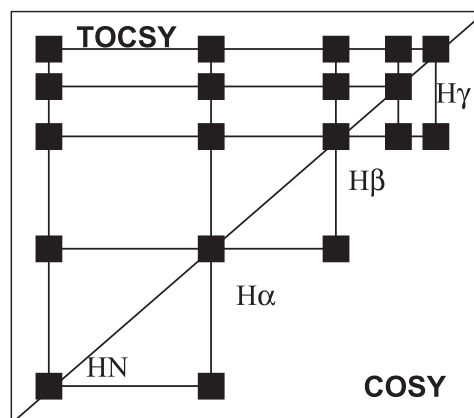
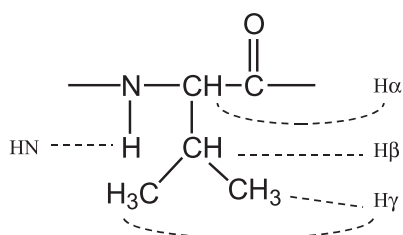
## A kétdimenziós NMR-spektrumok néhány típusa

Számos két- és többdimenziós NMR-technika létezik, ráadásul nem telik el év, hogy ne jelennének meg újabb és újabb mérési módszerek. Egy adott mérési technika (NMR-pulzusszekvencia) alkalmazása adott spektrumtípust eredményez, melyben a mérestől függően mást-mást tudhatunk meg a vizsgált molekulák szerkezetéről. A továbbiakban a mérés- és spektrumtípus kifejezéseket szinonimaként használjuk, és a bonyolult technikai részletek, a spektrumok fizikai magyarázatának mellőzésével (ezek számos szakkönyvben megtalálhatók, lásd a javasolt irodalomban) a spektrumok információtartalmának elemzésére szorítkozunk.

A kétdimenziós NMR-spektrumok közül néhány úgynevezett homonukleáris típust mutatunk be, ezek neve onnan ered, hogy ugyanolyan atommagok, leggyakrabban hidrogénmagok (protonok,  $^1\text{H}$ -magok) közötti kölcsönhatások vizsgálatára alkalmasak. A kétdimenziós spektrumot legegyszerűbben egy szintvonalas térképként képzelhetjük el (ilyen módon is ábrázoljuk azokat). Az észlelt

jelek egy-egy „hegycsúcsnak” felelnek meg, amelyeknek két koordinátája azon két proton kémiai eltolódása, amelyek között a – mérés típusának megfelelő – „kölcsönhatást” kimutattuk. A homonukleáris spektrumok az átlójukra szimmetrikusak, így elvileg minden olyan jelet, amely két, egymástól különböző magtól származik, a spektrum átlójának mindkét oldalán észlelünk, míg minden proton önmagával adott jele az átlóban található (az átló megfelel a „hagyományos” egyszimmetrikus spektrumnak).

Az egyik fő típusba soroljuk azokat a spektrumokat (méréseket), amelyek a kémiai kötések által közvetített kölcsönhatásokra érzékenyek. A COSY (*CORrelated Spectroscopy* – korrelált spektroszkópia) mérés során minden olyan protonpár ad jelet (az átlón kívüli, úgynevezett keresztcsúcsot), amelynek tagjait legfeljebb három kémiai kötés választja el egymástól. Az 1. ábra jobb alsó részében a valin aminosav sematikus COSY-spektrumában nyomon követhetők az HN–H $\alpha$  és H $\alpha$ –H $\beta$  korrelációk. A TOCSY (*TOTally CORrelated Spectroscopy* – teljesen korrelált spektroszkópia) eljárásban a keresztcsúcsok azoktól a protonoktól származnak, amelyek között (elvben) akárhány két-háromkötésenkénti „lépésben” – mindig protonokat érintve – „végigmehetünk”, azaz egy spinrendszerhez tartoznak. Az 1. ábra felső részében látható, hogy ilyen módon például az egymással közvetlenül nem csatoló HN és H $\beta$  protonok (és az esetleges távolabbi oldal-láncprotonok) is egymáshoz rendelhetők. A mérések másik fő típusába tartozik a NOESY



1. ábra A valin aminosav szerkezeti képlete és TOCSY-, illetve COSY-spektrumának sematikus rajza

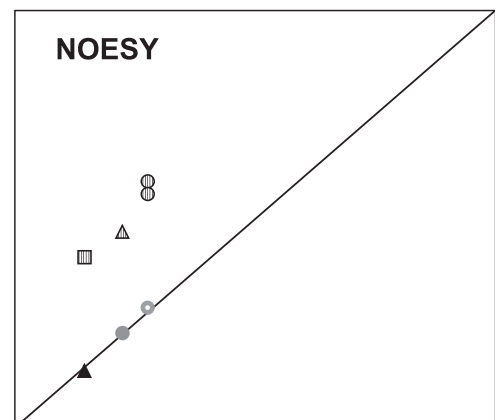
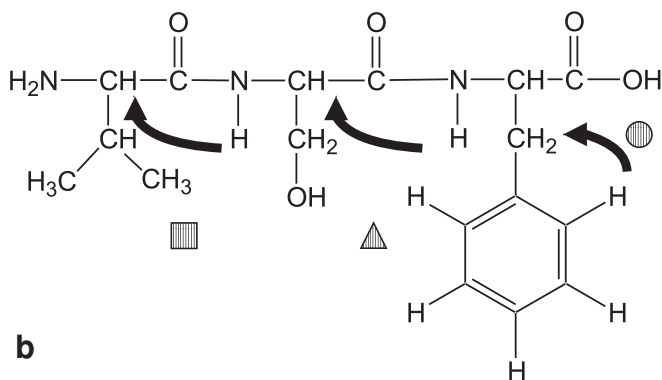
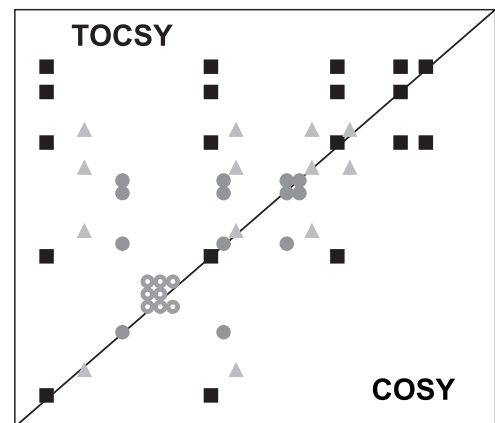
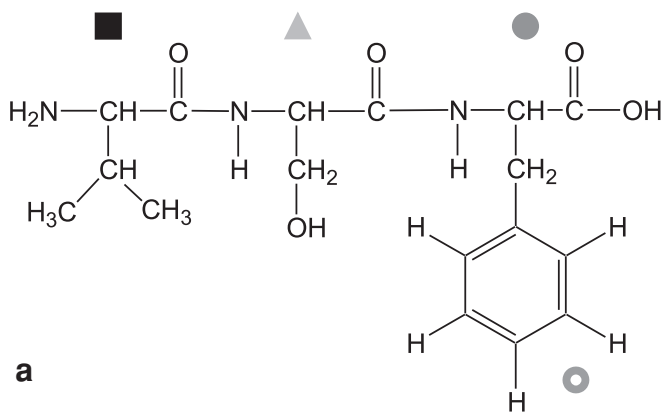
(*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* – nukleáris *Overhauser-effektus* spektroszkópia), mellyel a téren át ható kölcsönhatásokat „kérdézhajjuk le”. Egy ilyen mérés segítségével a térben egymáshoz közeli (6 Å-nél nem távolabbi) protonokról gyűjthetünk információt. A NOESY-spektrum tehát valódi tér szerkezeti információt hordoz.

### A mozaik összeáll

A kérdés az, hogyan következtetünk a spektrumokból térszerkezetre. A COSY- és a TOCSY-spektrumok alapján megállapíthatjuk, hogy mely kémiai eltolódással jellemezhető protonok tartoznak egy aminosavhoz. Egy fehérje TOCSY-spektrumában minden aminosavhoz külön jelrendszer rendelhető (az oldallánc és a molekulagerinc protonjain 2–3 kötésenként „végiglépegethetünk”, az aminosavak közötti amidkötés viszont – mivel a karobonil szén-

atomhoz nem kapcsolódik hidrogén – a spinrendszer határát jelenti). A spektrumban észlelt, egy aminosavhoz tartozó csúcsok számából az oldallánc hosszára, így típusára is tudunk következtetni. Az aromás aminosavaknál az oldalláncban is található olyan szénatom, melyhez nem kapcsolódik hidrogén, ilyenkor az oldalláncot két (pl. Phe, Tyr, His) vagy három (Trp) külön jelrendszer képviseli. A 2a. ábrán a tripeptidben lévő Phe aromás oldallánc külön jelrendszernek felel meg, amely csak a NOESY-spektrum (2b. ábra) segítségével rendelhető a megfelelő aminosav gerincatomjainak jeléhez: így válik azonosíthatóvá a fenil-alaninhoz tartozó összes proton kémiai eltolódása.

Tekintve, hogy az egyes aminosavak protonjai különféle spinrendszereket alkotnak, a COSY- és a TOCSY-spektrumban az észlelt jelrendszereket bizonyos aminosavtípusokhoz rendelhetjük hozzá.



2. ábra Valin–szerin–fenil-alanin tripeptid sematikus TOCSY-, illetve COSY-spektruma (a), valamint NOESY-spektruma (b) a szekvenciális asszignációt és az aromás rész hozzárendelését lehetővé tevő jelek feltűntetésével

Néhány jelmintázat annyira jellegzetes, hogy az esetek nagy részében viszonylag gyorsan és könnyen felismerhető, melyik aminosav tartozik hozzá, ilyen a Gly, illetve a metilcsoportot tartalmazók közül a Val, Leu, Ile, Ala, Thr. Nem tehetünk azonban egyszerűen különbséget a hasonló jelrendszerrel jellemezhető aminosavak között, így például durva felosztás szerint az oldalláncban csak két  $\beta$ -protonnal rendelkezőket (Ser, Cys, Asp, Asn és az aromás oldalláncúak) az úgynevezett J típusba, a  $\gamma$ -protont is tartalmazókat az U típusba (Glu, Gln, Lys, Arg, Pro, Met) soroljuk a jelfeldolgozás ezen szakaszában (I. táblázat).

**I. táblázat** Az egyes aminosavak oldalláncának spinrendszerei [3] és azoknak az asszignáció során alkalmazott csoportosítása

Aminosav	Spinrendszer	Típus
Ala	A <sub>3</sub> X	Ala
Arg	A <sub>2</sub> (T <sub>2</sub> )MPX	U
Asn	AMX	J
Asp	AMX	J
Cys	AMX	J
Gly	AX	Gly
Gln	AM(PT)X	U
Glu	AM(PT)X	U
His	AMX	J
Ile	A <sub>3</sub> MPT(B <sub>3</sub> )X	Ile
Leu	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> MPTX	Leu
Lys	A <sub>2</sub> (F <sub>2</sub> T <sub>2</sub> )MPX	U
Met	AM(PT)X	U
Phe	AMX	J
Pro	A <sub>2</sub> (T <sub>2</sub> )MPX	U
Ser	AMX	J
Thr	AMX	Thr
Trp	AMX	J
Tyr	AMX	J
Val	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> MX	Val

Következő lépésként a fehérje aminosavsorrendjének, szekvenciájának ismeretében a NOESY-mérést is felhasználva megállapíthatjuk, hogy az egyes jelcsoportok – így az egyes jelek – pontosan mely aminosavaktól származnak. Ehhez azt a tényt használjuk föl, hogy két szomszédos aminosav esetében mindig van egy jellegzetes magpár, nevezetesen a  $\text{HN}^i\text{-H}\alpha^{i+1}$ , melyek a NOESY-mérés karakterisztikus távolságán belül esnek, így a

spektrumban a megfelelő jelek a szekvenciára jellemző információt hordoznak. A 2b. ábrán a Val-Ser-Phe tripeptid sematikus NOESY-spektrumában ezeket a jeleket is föltüntettük. A jelcsoportok tehát „sorba rakhatók”, és az egyes jelmintázattípusok sorrendjét a fehérje ismert aminosavsorrendjével összevetve az összes aminosav (elméletileg) összes protonja kémiai eltolódását megkaphatjuk a spektrumokból. A jelek, jelcsoportok azonosítását, végső soron az egyes protonokhoz tartozó kémiai eltolódás meghatározását nevezzük jelhözrendelésnek, asszignációnak.

Ha a jelhözrendelés után rendelkezésünkre áll az egyes aminosavak hidrogénmagjainak kémiai eltolódása, a NOESY-spektrumban a nem szomszédos, azaz szekvenciálisan távoli aminosavak közötti kölcsönhatásoknak megfelelő jeleket is azonosítani tudjuk. Ezek a jelek pedig már a vizsgált fehérje térszerkezetére egyedi módon jellemzőek. Minden egyes jel egy atom–atom távolsáértéknek (szakszóval távolság jellegű kényszerfeltételnek) feleltethető meg, elegendő ilyen távolságadatból pedig visszakövetkeztethetünk a térszerkezetre. A feladatot ahhoz szokás hasonlítani, amikor például Magyarország térképét egy olyan táblázat alapján kellene felrajzolniunk, amely a városok egymástól mért távolságát tartalmazza. A szerkezet meghatározása tehát a távolsáértékek alapján igen bonyolult, ám nem megoldhatatlan feladat, ma már több ilyen számításra (is) alkalmas program rendelkezésünkre áll. A szerkezetszámolás részleteit itt nem tárgyaljuk, csupán annyit jegyzünk meg, hogy általában hosszadalmas, a távolságadatok többszöri javítását igénylő munka, ma is az NMR-technikával történő térszerkezet-meghatározás legidőigényesebb része. Ebben a fázisban nyílik lehetőség az asszignáció során nem teljes biztonsággal azonosított jelek pontosítására is. A röntgenkristallográfiai vizsgálatoknál az egyik első fázis, a jó kristály előállítása tart(hat) hosszabb ideig, viszont annak birtokában azután az atomi szintű szerkezet aránylag rövid időn belül megismerhető. Ugyanakkor az NMR-spektroszkópiával történő vizsgálatoknál épp az utolsó fázis, a megfelelő térszerkezet tényleges kiszámítása a legtovább elhúzódó lépés.

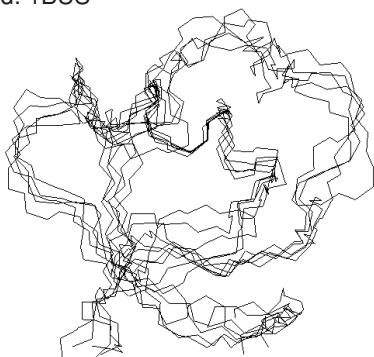
### Az alagút vége

Felvetődik a kérdés, ha a szerkezetszámolás során folyamatosan módosítjuk adatainkat, honnan tud-

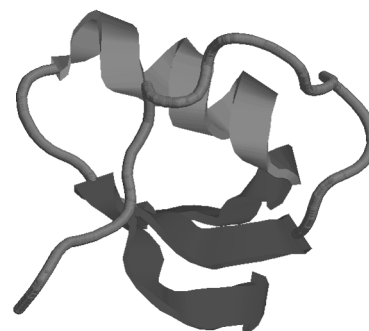
juk, hogy mikor érkeztünk el a megfelelő adatkészlethez és ezáltal a helyes térszerkezethez. A számolások eredménye nem egyetlen konformer, hanem minden esetben egy konformációcsalád, amelyből néhány reprezentatív szerkezetet választunk ki (3. és 4. ábrák). Itt lényeges szempont a kémiai paraméterek (kötéshosszak, kötésszögek) megfelelő értéke, ezeknek a konvenció szerint elfogadott tartományokba kell esniük. Fontos továbbá, hogy a kiválasztott konformációcsalád tagjai minél jobban hasonlítsanak egymáshoz, ennek mérőszáma az RMSD (*root mean square deviation*, az eltérések négyzetösszegének gyöke). A szerkezetszámolást addig érdemes folytatnunk, amikor ezek a paraméterek már nem javulnak érdemben. A fehérjék egyes szakaszai általában nem ugyanolyan jól meghatározottak, azaz nem egyforma pontossággal (más-más RMSD-értékkel) illeszthetők egymásra. Ez leg több-

ször összefüggésben van az egyes régiókban az egy aminosavra jutó távolság jellegű kényszerfeltételek számával. Sok esetben igaz az, hogy a fehérje szerkezeti „magját” alkotó „szabályos” (periodikus) másodlagos szerkezeti elemek (hélixek és  $\beta$ -redők) jobban definiáltak, mint a molekula többi része. Az ilyen eltérésekből a molekula egyes részleteinek mozgékonyására is következtethetünk, ám fontos szem előtt tartani, hogy a szerkezetszámolás alapján kapott szerkezetekben észlelt ilyen eltérések csak közvetett összefüggésben vannak a molekula tényleges mozgékonyásával, és a NOESY-spektrumban bizonyos jelek meglétét és hiányát (és így egy bizonyos szakaszra több vagy kevesebb távolságadat alkalmazhatóságát) számos más tényező is befolyásolja (pH, hőmérséklet, a spektrum jel/zaj viszonyai stb.).

a) PDB-kód: 1BUS



b) PDB-kód: 2BUS



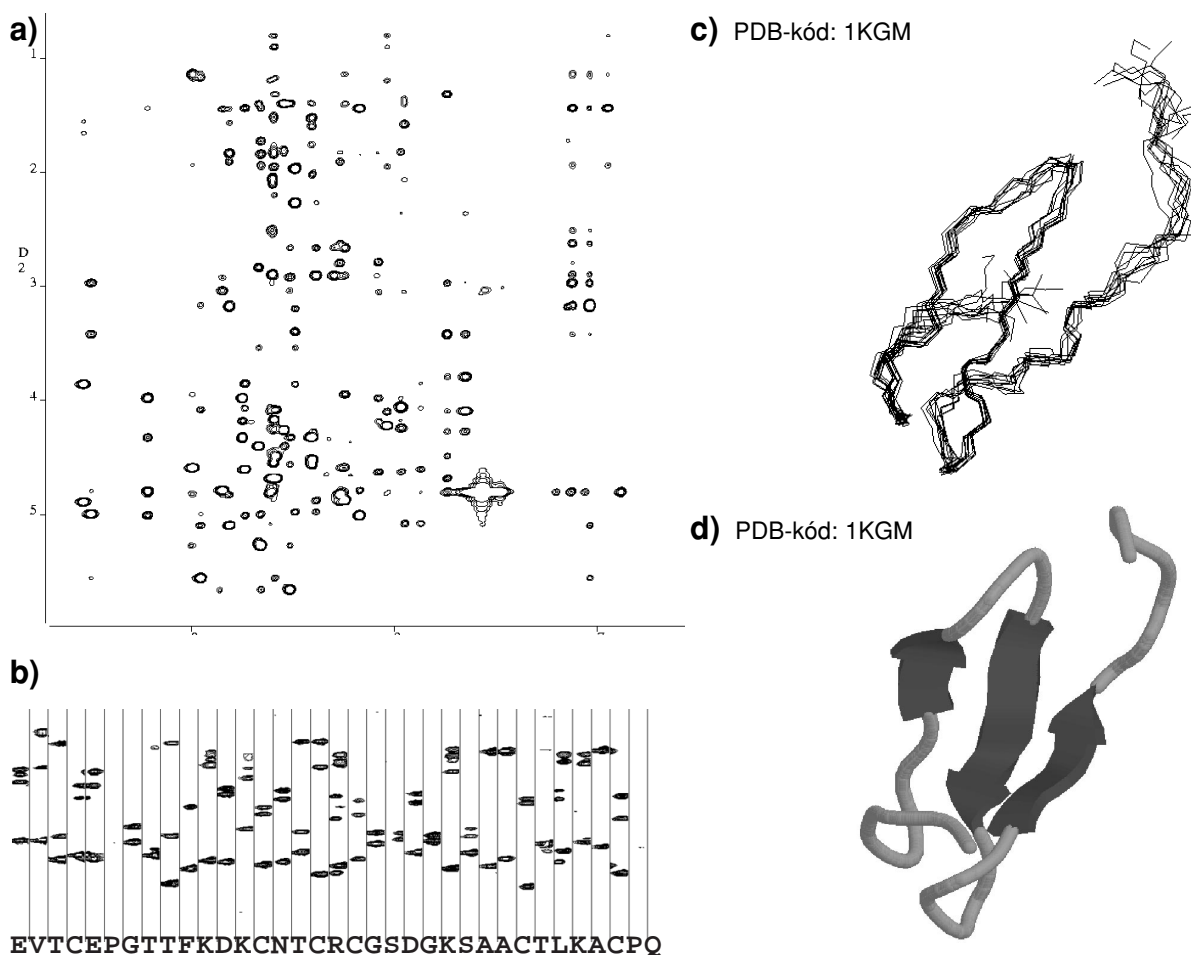
c) PDB-kód: 2AIT



d) PDB-kód: 3AIT



**3. ábra** A Wüthrich-csoport által meghatározott első fehérjeszerkezetek: a) BUSI (bull seminal inhibitor), 5 számolt szerkezet (molekulagerinc); b) BUSI, átlagszerkezet (szalagmodell); c) Tendamistat ( $\alpha$ -amiláz-inhibitor), 10 számolt szerkezet (molekulagerinc); d) Tendamistat, átlagszerkezet (szalagmodell)



4. ábra A kutatócsoportunkban vizsgált egyik fehérje (SGCI, *Schistocerca gregaria* chymotrypsin inhibitor) két NMR-spektruma és -térszerkezete: a) 2D NOESY spektrum részlete; b) 3D TOCSY spektrum ún. szalagos ábrázolása, az egyes aminosavakhoz tartozó jelrendszereket a szekvenciának megfelelően rendeztük; c) az SGCI 10 számolt szerkezete (molekulagerinc); d) az SGCI reprezentív konformere (szalagmodell)

## Újabb dimenziók

Ahogy a kétdimenziós módszerek alkalmazásának egyik hatalmas előnye, hogy az egydimenziós spektrumban már megkülönböztethetetlen jelek a második dimenzió mentén „szétválnak” és így azonosíthatók, az egyre nagyobb fehérjék szerkezetvizsgálatához már háromdimenziós technikákra van szükség. A harmadik dimenzió egy adott hidrogénhez kapcsolódó heteroatom, nitrogén vagy szén kémiai eltolódásának felel meg. Mivel a természetben ezen elemek NMR-inaktív izotópjai a leggyakoribbak, a technika alkalmazásához a molekulák  $^{15}\text{N}$ -, illetve  $^{13}\text{C}$ -dúsított formájára van szükség. A kapott spektrumban a jeleket a pluszdimenzió miatt a spektrum megfelelő metszeteinek segítségével ábrázoljuk, ettől eltekintve az asszignáció és a szerkezetmeghatározás többi lépése ha-

sonló stratégiával történik, mint a kétdimenziós esetben.

## Az „NMRzum” távlatai

A kutatási gyakorlatban a röntgenkristallográfia és az NMR-spektroszkópia egymás kiegészítői és nem riválisai: más és más esetekben, különböző szerkezeti kérdések hatékony megválaszolásához használhatók fel. Míg a kristallográfiai szerkezetfelderítés gyakran nem alkalmazható túlságosan kis molekulatömegű (< 10 kD) molekulák esetén, az NMR csak igen ritkán használható nagyobb (> 50 kD) fehérjék térszerkezet-vizsgálatára. A legfontosabb különbség azonban az, hogy NMR-spektroszkópiával oldatban tanulmányozhatjuk a molekulák és a molekulakomplexek konformációját és – nem mellékesen – azok dinamikus visel-



kedését. Az alábbiakban az NMR-spektroszkópia néhány biokémiai szempontból érdekes alkalmazásába nyújtunk rövid bepillantást.

Már az NMR-technikával végzett „rutin” szerkezetmeghatározás során is állandóan találkozunk a fehérjék, peptidek belső mozgásaiból, flexibilitásából adódó jelenségekkel. Bizonyos mérések – a molekula egyes atomjainak (N vagy C) relaxációs tulajdonságait (T1 és T2 relaxáció, heteronukleáris NOE) „lekérdező” technikák – segítségével pedig szinte atomi pontossággal fel is térképezhetjük a molekulák konformációs mozgásait. Mivel a szén és nitrogén leggyakoribb izotópjai nem NMR-aktívak, az ilyen mérésekhez leggyakrabban  $^{15}\text{N}$ -dúsított mintát alkalmaznak. A kapott adatokból fontos következtetéseket lehet levonni a vizsgált fehérje viselkedésére nézve: a prionfehérjék dinamikai vizsgálata például a Pr<sup>PC</sup> – Pr<sup>Sc</sup> (egészséges – fertőző forma) konverzió mechanizmusának mélyebb megértéséhez járulhat hozzá [4].

NMR-spektroszkópiával azonosíthatók a fehérje–ligandum és a fehérje–fehérje kölcsönhatásokban részt vevő aminosavak, tanulmányozhatók a kötődéssel együtt járó konformációs változások. Ezekhez a vizsgálatokhoz legtöbbször az egyik (és csak az egyik) partnermolekula izotóppal jelölt ( $^{15}\text{N}$ -dúsított) formáját használják, így a kapott heteronukleáris spektrumokban csak az ettől származó jelek jelennek meg, ami lehetővé teszi az adatok elemzését. A módszer akár közepes méretű szerinproteáz-inhibitorok enzimmel történő kölcsönhatásának jellemzésére is használható [5]. Laboratóriumunkban a kalmomodulin és a dUTPáz esetében végzünk egyes inhibitorok kötőhelyének meghatározását célzó vizsgálatokat. Az utóbbi kutatás érdekessége, hogy a hatalmas, NMR-módszerrel egyébként mérete miatt egészében nem vizsgálható (kb. 3x300 aminosavas trimer) enzim C-terminális része flexibilis, így az itt található aminosavak jele – a natív, teljes molekulát vizsgálva is – megjelenik a spektrumban, és az ide kötődő inhibitoroknak a fehérje térszerkezetére gyakorolt hatása feltérképezhető.

A fehérjék feltekeredése („folding”) szintén tanulmányozható NMR-spektroszkópiai módszerekkel. A fehérjét denaturáló közegből natív környezetbe helyezve a részlegesen feltekeredett szerkezetben azonosíthatók a natív kémiai eltolódással jellemezhető – így a natívnek megfelelő konformációit

felvevő aminosavakban lévő – amidprotonok, ezáltal a gyorsan és lassabban kialakuló térszerkezeti elemek. Így következtetéseket vonhatunk le a feltekeredés mechanizmusára vonatkozóan. A kimo-tripszin-inhibitor 2 (CI2, PDB-kód: 1CI2) feltekeredéséről ilyen kísérletekkel (is) sikerült bizonyítani, hogy kétállapotú, kooperatív viselkedést mutat [6].

A felsoroltakon kívül az NMR alkalmas még a molekula felszínén lévő csoportok feltérképezésére, a fehérjerszerkezet és az aktív centrum környezet-függésének (pl. pH), vagy enzimek katalitikus mechanizmusának vizsgálatára. Szelektív izotópjelölésű (adott aminosavakon, akár csak egyes atomokon jelölt) fehérjéket felhasználva pedig – régebben szinte elképzelhetetlen – atomi szintű felbontással vizsgálhatók specifikus kölcsönhatások és konformációs változások. Az új technikák száma évről évre növekedik, mindig újabb lehetőségeket feltárva a fehérjék szerkezetének mélyebb megismerésére.

## Távlatok

A biomolekuláris NMR fejlődésének lendülete napjainkban is töretlen. A ma már rutinszerűen használt három- és magasabb dimenziós mérések segítségével viszonylag nagy molekulatömegű fehérjék térszerkezete is tanulmányozhatóvá vált, sőt, az utóbbi évek újításai folyamatosan növelik a vizsgálható molekulák méretét. Nem mellékes, hogy az egyik ilyen technika kifejlesztése a ma is aktív Kurt Wüthrich csoportjának érdeme. A különféle új technikák lehetővé teszik a fehérjék dinamikus viselkedésének, feltekeredésének, más molekulákkal való kölcsönhatásainak vizsgálatát is.

## Irodalomjegyzék

- [1] Perutz, M. (1992) *Protein structure – new approaches to disease and therapy*, W. H. Freeman, New York
- [2] Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaun, A. (1987): *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Clarendon Press, Oxford
- [3] Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons, New York
- [4] Viles, J. H., Donne, D., Krron, G., Prusiner, S., Cohen, F. E., Dyson, H. J., Wright, P.E. (2001) Local plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. *Biochemistry*, **40**: 2743–2753.
- [5] Schlott, B., Wöhnert, J., Icke, C., Hartmann, M., Ramachandran, R., Gührs, K.-H., Glusa, E., Flemming, J., Görlach, M., Große, F., Ohlenschläger, O. (2002) Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. *J. Mol. Biol.* **318**: 533–546.
- [6] Killick, T. R., Freund, M. V., Fersht, A. R. (1998) Real-time NMR studies on folding mutants of barnase and chymotrypsin inhibitor 2. *FEBS Lett.* **423**: 110–112.

**Török Ferenc** 1969-ben született Székelyudvarhelyen. 2001-ben végzett a kolozsvári „Ioan Andreescu” Vizuális Képzőművészeti Akadémián, festészet szakon. 1994 óta állítja ki munkáit egyéni és csoportos kiállításokon Erdélyben és Magyarországon.

Festészete megközelítésében a szuprematista expresszionizmushoz áll legközelebb: erőteljesen érzelmkifejező, ugyanakkor absztrakt, néha testszerű formáiban analízáló képi megközelítésmód. A képsíkban megjelenő formák, alakok húsrá, biológiai szövetszerű textúrára emlékeztetnek, mintha felnyitott, s mégis nagyon is élő testek lennének. A képeket, a forma- és színkezelést ugyanakkor egyfajta romantikus attitűd is jellemzi, az egymásba kapcsolódó ívek, mozgó, dinamikus kompozíciót alakítanak ki, melyben a képsíkon belüli egyirányú gesztus lendületes mozgás lenyomata (mint a gesztikuláló ember érzelmkifejezése). A színek sem kevésbé dinamikusak, a képek erősen kontrasztosak: a nagyon sötétből (a képek alapdenzitása sötét) erősen ugranak ki a világos foltok, alakok. Ez is mozgás, ami a festményeknek fiatalos lendületet ad. Németh Júlia így méltatja a festőt: „A hatalmas műterem műtermése is hatalmas. Méreteiben, mennyiségében, de főként katartikus hatásában. Abban a mindent elárasztó szín- és formazuhatagban, amely erőteljes hirtelenséggel, szinte lavinaszerűen zúdul a belépőre. Aki első pillanatban csak azt látja-érzi:



Török Ferenc, Cím nélkül (2001), olaj, vászon



Török Ferenc, Cím nélkül (2001), olaj, vászon

egy egészen más világba bocsáttatott. Olyan sajátos univerzumba, amely nemcsak a közvetlen környezete egyhangúságával perlekedik, hanem erőteljes, kíméletlennek tűnt vitába szállt magával a festésszettel is. A látványteremtés eszköztárát egyedi kérdés-felelet stílusban gazdagító Török Ferenc mintegy önmagát faggatja, képességeinek határait próbálgatja-feszegeti, amikor visszatérő motívumként egyazon témát járja körül, ismétli újból és újból, teremt meg a kimeríthetetlennek, az emberi testnek megannyi variációját. ... Ez az olykor nonfiguratívnak tűnt, de valójában antropomorf, mélységesen emberközpontú festészet elsősorban a látványra épít. A mélybe hatoló, egyenesen veséző, az egészet ízeire szaggató festői kutakodás inkább a tudományos kíváncsisággal, mint a túlradó érzelmekkel határos. Érdekes módon azonban, mindezek dacára, egyfajta kerekded formákba fogalmazott líra is belengi ezeket a rendkívül komplex, rendkívül kifejező, tekintetcsalogató munkákat.”



# sartorius



Protein isolation,  
concentration and  
purification

Monoclonal antibody  
purification from  
tissue culture supernatant

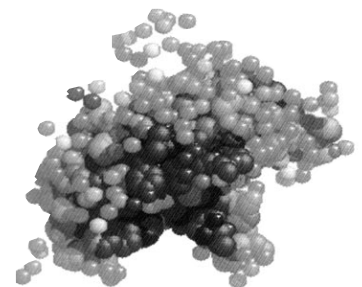
Endotoxin Removal

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](mailto:s-membran@s-membran.hu)  
web: [www.s-membran.hu](http://www.s-membran.hu)



# Sanofi-Synthelabo Magyar Kutatási Díj

A Magyarországon folytatott biológiai, orvosi és kémiai alap kutatásokban dolgozó fiatal kutatók kiemelkedő teljesítményének díjazására 2003-tól a Sanofi-Synthelabo vállalatcsoporthoz tartozó Chinoin Rt. Magyar Kutatási Díjat alapított. A kitüntetést a Magyar Tudományos Akadémia biológiai, kémiai és orvosi osztályainak képviselőiből kiválasztott bírálóbizottság ítélte oda. A díjat idén, első ízben, *Bakos Éva*, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóintézetének tudományos főmunkatársa kapta. A 35 éves kutató a kitüntetést az „MRP típusú multidrog transzporterek szerkezete, funkcionális doménjei és farmakológiai tulajdonságai” című tanulmányával érdemelte ki; munkáját a díjátadó ünnepségen az MTA épületében ismertette.

## sanofi~synthelabo

Az élettudományi kutatási eredmények elismerésére alapított Sanofi-Synthelabo Magyar Kutatási Díjat a Sanofi-Synthelabo vállalatcsoporthoz tartozó Chinoin Rt. kutatási-fejlesztési igazgatósága hozta létre. Amint a Chinoin Rt. K+F igazgatója dr. Arányi Péter bejelentette: „A magyarországi leányvállalat kutatási központja a Sanofi-Synthelabo csoporton belül számos új, tudományos eredményt ért el. A magas szakmai színvonal fenntartása és a kreativitás bátorítása érdekében döntöttek úgy, hogy 2003-tól azokat a Magyarországon folytatott kutatásokat ismerik el, amelyek fontos, az eredeti gyógyszerkutatásban felhasználható új ismeretekhez vezetnek.”

Bakos Éva 1995 óta foglalkozik az MRP típusú multidrog transzporter fehérjék vizsgálatával, amelyek a rákellenes kemoterápia esetenkénti sikertelenségéért felelősek. A pályamű a vizsgált transzporterek vonatkozásában olyan alap kutatási információkhoz segíti a gyógyszerkutatókat, amely új terápiás megközelítések kidolgozásához, esetleg új gyógyszerhatóanyagok felfedezéséhez vezethetnek. Amíg korábban a daganatos megbetegedések esetén a tumorok sebészeti eltávolítása volt az egyetlen eszköz, addig napjainkban a sugárterápia mellett már citosztatikumokat is alkalmaznak. Ez a kemoterápia az esetek egy részénél nem hatásos, ún. multidrog-rezisztencia alakul ki. Minthogy az ezen rezisztenciáért felelős multidrog transzporter fehérjék a citosztatikumokat aktív transzport segítségével távolítják el a sejtektől, akadályozzák a

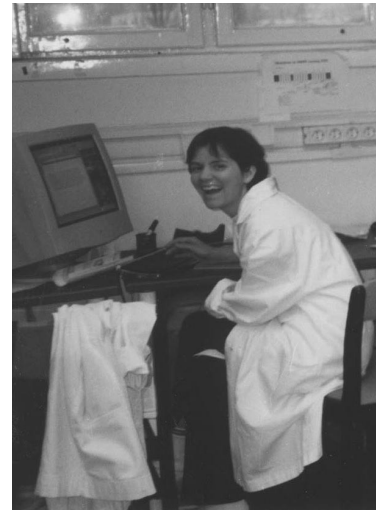
rákellenes kemoterápia hatékonyságát. Bakos Éva munkacsoportja jelentős sikereket ért el ezen fehérjék szerkezetvizsgálatában, működési mechanizmusuk feltárásában. „A fehérjék szerkezetvizsgálatával és működési mechanizmusuk feltárásával

mód nyílhat arra, hogy a folyamatot a sikeres terápia érdekében befolyásolni lehessen” – nyilatkozta a pályamunka szerzője.

Bakos Éva a Budapesti Műszaki Egyetemen szerezte meg diplomáját, ahol biológusmérnökként kitüntetéssel végzett. 1992-től az MTA SZBK Enzimológiai Intézet tudományos segédmunkatársa, 1993–1996 között elvégezte az ELTE TTK Doktori Iskoláját. 1996-tól tudományos munkatárs, majd 1999-ben „*summa cum laude*” minősítéssel megszerezte doktori címét. Kétszer járt külföldi tanulmányúton, (Svédországban és Franciaországban), valamint számos ösztöndíjat nyert el az elmúlt években. A Magyar Biokémiai Egyesület tagja, 2000-től az MTA SZBK Enzimológiai Intézetének tudományos főmunkatársa. 1995 és 2002 között 15 jelentős hatású publikációt közölt. A *Nature* folyóirat 1999-es összefoglaló cikke Bakos Éva egyik dolgozatát idézi mint a tudományterület úttörő munkáinak egyikét. 1997-ben és 1999-ben a *Young Investigator Award*, 1998-ban MTA Akadémiai Ifjúsági Díjat, 1999-ben pedig a legjobb doktori dolgozatért járó *Qualitas Biologica* Alapítvány Díjat nyerte el.

A pályaműveket elbíráló bizottság elnöke Medzihradzky Kálmán akadémikus, tagjai: Papp Gyula akadémikus, Falus András akadémikus, Arányi Péter, a biológiai tudomány doktora, a Chinoin K+F igazgatója és Orosz Jenő voltak. A díjazott pályaművet a zsűri minden szempont figyelembevételével kiemelkedő pályázatnak, kiemelkedő jelentőségű s egyben jól publikált munkának minősítette.

Orosz Jenő



# FluorChem 9900 – az Alpha Innotech új géldokumentációs rendszere

Már többször adtunk hírt a különböző fórumokon az Alpha Innotech géldokumentációs rendszereit érintő újdonságokról. A napokban került piacra a cég újabb csúcskészüléke a *FluorChem 9900*, melyet ezúton ismertetünk a *Biokémia* hasábjain.



A teljes rendszer alapvető újdonságait a kamera szolgáltatja. A 16 bites hűtött kamera 3,21 megapixeles felbontást tesz lehetővé. A nagy kapacitású 6,8 x 6,8 mikronos pixelekből kikerülő jel 78 dB jel/zaj viszonyt mutat. Ezen magas értéket az is elősegíti, hogy a kamera -10 °C-os abszolút értékre beállít-

tott és szabályozott hűtéssel rendelkezik. A kamerában lévő CCD szenzor magas minőségét és szenzitivitását mutatja a nagy QE (*quantum efficiency*) érték, ami 55% a kemilumineszcenciában leggyakrabban fellépő 425 nm hullámhosszú fénynél, valamint a fluoescenciás vizsgálatokhoz szükséges hullámhosszoknál a 80%-os értéket is felülmúlja. A szenzor dinamikus tartománya valamivel meghaladja az 5 OD értéket. A készülék többi része a korábbiakhoz képest változatlan: 21 x 26 cm-es, 302 és 365 nm-en működő transzilluminátor, ami egy kihúzható asztalon foglal helyet az egyszerűbb gélhelyezés érdekében egy tökéletesen sötét körülményeket biztosító kabinet, amiben helyet kapott a transzilluminátor mellett egy lehajtható asztalka is, mely utóbbi 21 x 31 cm-es nagyságban biztosítja az alsó fehér fényű átvilágítást. Ebben a kabinetben alapfelszereltség a felső fehér fényű megvilágítás és egy forgatható szűrőtartó. További opcióként felső UV fényű megvilágítás is rendelhető 254, 302 és 365 nm hullámhosszokon. Minden modellhez a jól ismert Dell cég biztosítja a számítógépet, aminek specifikációi a következők: Pentium 4 2,0 GHz, 40 Gb hard drive, 128 Mb RAM, CD-író, hálózati kártya,

17" SVGA monitor, Windows 2000. A kitűnő hardvert egyszerűen kezelhető szoftver egészíti ki. A kép elkészítéséhez és feldolgozásához szükséges minden művelet ikonja megtalálható a képernyőn, így néhány egérekattintással a kép el is készíthető. Mindegyik típushoz az AlphaEase®FC szoftver tartozik, amely moltömeg-meghatározás mellett egy- és kétdimenziós denzitometrálásra, kvantitatív gélek kiértékelésére, detekciós sor (*array chip*) leolvasására, valamint kolóniaszámlálásra is alkalmas. Az expozíciós idő (jelen esetben integrációs idő) optimalizálását segíti elő a szoftverben lévő ún. *Movie Mode* (film üzemmód), ami több felvételt készít előre rögzített paraméterekkel. Ez az üzemmód elsősorban kemilumineszcenciás kiértékelés esetén előnyös.

Ha kemilumineszcenciás detektálást is szeretnének végezni, de a kvantitatív kiértékelés nem szerepel a tervezett feladatok között, akkor a 8 bites, mintegy 400 ezer pixel felbontású, -60 °C-ra hűtött, 2/3" méretű detektorral rendelkező CCD kamerás *ChemiImager™4400* rendszert ajánljuk. Ha a kvantitatív kiértékelés fontosabb, mint a kemilumineszcenciás detektálás, akkor a 12 bites, nem hűtött, 1,44 megapixeles CCD kamerás *AlphaImager™3400* a jó választás. Ha mindkettő fontos, de a rendelkezésre álló pénzügyi keret nem teszi lehetővé a csúcsmo-dell megvásárlását, akkor a *ChemiImager™5500* a megfelelő rendszer. A -40 °C-ra hűtött, 12 bites kamera mintegy 1 millió pixellel rendelkezik és rendkívül magas jel/zaj viszonyt mutat, dinamikus tartomány 3,5 OD. A *FluorChem™8900* rendszer kamerája -30°C-ra hűtött, 1,34 megapixeles felbontású. Az Alpha Innotech által jogvédett Super-OD™ technika segítségével a rendszer dinamikus tartománya 3,5 és 5,0 OD között változtatható. Mindegyik rendszerhez hozzátartozik a fent ismertetett maximális fénymentes környezetet biztosító fotodoboz (*photobox*). Opcióként motoros képszűkítő (*zoom*) is rendelhető, így most már minden, a kép készítését befolyásoló tényező a számítógépről állítható be. Kisebb pénzügyi keret esetén egyszerűbb kabinet is kérhető (DE-400) a 2200, 3400 és 4400 modellek esetén.

A legolcsóbb digitális géldokumentációs rendszer az *AlphaDigiDoc™1200*, amelynek lelke egy 3,87 megapixel felbontóképességű digitális fényképezőgép, s emellett egy sötétítő ernyőt (*hood*) tartalmaz. A számítógépigény nem túl magas: Pentium 166 MHz processzor, 32 Mb RAM, VGA (1024 x 768 24/32-bit *true color*). Új laborok számára transzilluminátoros rendszert is tudunk kínálni (expozíciós idő: 1/30–15 sec). A rendszert a fent leírt AlphaEase™ FC szoftver teszi teljessé.

Holló Róbert



**BIO-SCIENCE**

Bio-Science Kft.

1119 Budapest, Andor u. 47–49.

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

E-mail: [bio-sci@bio-science.hu](mailto:bio-sci@bio-science.hu)

Internet: [www.bio-science.hu](http://www.bio-science.hu)

## BIOTECHNOLÓGIA 2003 Magyarország



Sikeres rendezvényt szervezett az Oktatási Minisztérium 2003.

április 30-ára: egynapos konferencián vonultatta fel a Biotechnológia 2000 kutatás-fejlesztési keretből támogatott projekteket. Az eseményt gondos kiértékelési munkálatok előzték meg: valamennyi témakörben felmérték az összes futó és lezáruló projektet (mintegy 140 kutatási programot), a legkiemelkedőbbeket szóbeli előadásra kérték fel, s a többieket arra, hogy a projekt futamideje alatt elért eredményekből poszter formájában számoljanak be. Nem volt könnyű dolga a szervezőknek, hiszen a nyolc fő témakörben a Biotechnológiai Bizottság aktuális képviselőinek tematikus bevezető előadásai mellett, legfeljebb 2-4 kiválasztott projekt előadására adódott mód, így szekciónként igen nehéz volt megválasztani, melyik projektet kérjék fel előadásra. Ki kell emelni a szervezők formai igényességét is: a rendezvényhez profi „arculatterv” készült, a résztvevők jól szerkesztett konferenci anyagot kaptak kézbe (CD hordozón is), és mind a szakmai kiállítások, mind a kísérő protokollesemények elsőrangúak voltak.

A plenáris előadások programját Hiller István politikai államtitkár nyitotta meg, majd Fésüs László, a Biotechnológiai Bizottság elnöke tartotta meg megnyitóbeszédét. Ezután kerültek sorra az egyes szekciók, melyekben felkért bizottsági tagok ismertették a szakterületen támogatott projekteket, a résztematika költségvetését s a projektek legfőbb ese-

ményeit. Fésüs László (Debreceni Egyetem) bevezető előadása áttekintést adott a Biotechnológia 2000 kutatási program prioritásairól, a támogatott projektek köréről, egyben kiemelte a támogatási rendszer újszerű vonásait, melyek mind abban az irányban hivatottak hatni, hogy felgyorsítsák a hazai biotechnológiai ipar fejlődését. Kiemelte, hogy a pályázati rendszer kompatibilis az EU kutatási keretprogramjaival, s egyben azok párhuzamos hazai pénzügyi eszközének is tekinthető; hogy a pályázatok kiírását és értékelését igen jól sikerült előkészíteni; s hogy a folyamatba a hazai szakma legkiválóbb képviselőit sikerült bevonni. A három év alatt a pályázók összesen 4, 5 milliárd forint támogatást nyertek el, s az EU FP6 Keretprogram Életminőség szegmensében nyertes magyar pályázók több mint fele a hazai Biotechnológia pályázati rendszerben támogatott projekttel rendelkezik.

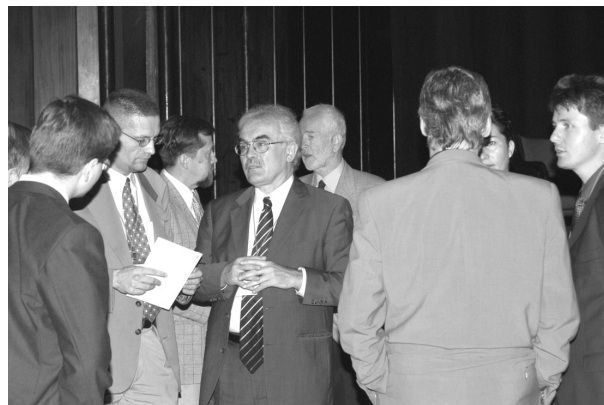
A *Fitotechnológia, növényvédelmi biotechnológiai alkalmazások* témakörben a bevezetőt Heszky László (SZIE Genetikai Tanszék) tartotta, kifejtve, hogy a növényi biotechnológia és a molekuláris biológiai növénynevelés terén századunkra paradigmaváltás következett be, amikor a nemesítő immár – a mendeli elveken alapuló konvencionális növényneveléshez képest fordítva – a genotípusból kiindulva juthat el a kívánt fenotípushoz. A bevezetőt két előadás követte, Galiba Gábor (MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete) ismertetője molekuláris PCR markereken alapuló szelekciós rendszer létre-

hozásáról a fagyűrő gabonanövények (búza) kiválogatására, a hagyományos növénynevelési technológiához képest lényegesen gyorsabb metodikát (2 hónap helyett 2 nap) jelentve. Ezután Süle Sándor (MTA Növényvédelmi Kutatóintézete) számolt be almafajtáknak a tűzelhalás mezőgazdasági baktériumbetegséggel szembeni ellenállóságára való génmódosításáról, nevezetesen, hogy a patogén (*Erwinia amylovora*) ellen hatásos fág által termelt depolimeráz enzimet kódoló gént visznek be – *Agrobacterium* vektor segítségével – a növénybe, majd az így transzformált almafajtákat törpe alanyokra oltják.

Az *Élelmiszerbiztonság, élelmiszeripari biotechnológiai alkalmazások* szekcióban a tematikus bevezető Hegyesné Vecseri Beáta (SZIE Sör- és Szeszipari Tanszék) tartotta, majd Pauk János számolt be a glufozinát-ammónium totális gyomirtó szerrel szemben rezisztens transzgenikus búza biológiai hatásának és táplálkozásbiztonságának vizsgálatáról, mely munka kiterjedt a tápérték és az  $\alpha$ -amiláz-aktivitás vizsgálatára, valamint emlőstoxikológiai (patkány-) tesztekre. Ezt követően Bánáti Diána (Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet) beszélt a fogyasztók, forgalmazók és szakértők körében végzett – jelentős részben a genetikailag módosított szervezetekkel (GMO) előállított élelmiszerekre vonatkozó élelmiszer-biztonsági ismeretek és attitűd vizsgálatára irányuló – kockázatelemzési vizsgálataikról.

A *Biotechnológia alkalmazása az állattenyésztésben és az állategészségügyben* témakörben Mucsi Imre (SZIE Mezőgazdasági Főiskolai Kar) tartotta a bevezető előadást, majd Rusvai Miklós (SZIE Állatorvos-tudományi Kar) ismertette az Országos Állategészségügyi Intézetben, az Állattenyésztési Kutatóintézetben, valamint a SZIE Állatorvos-tudományi Karán folyó molekuláris biológiai diagnosztikai módszerfejlesztéseket a szivacsos agyvélő betegség (TSE/BSE) és a surlókór prionbetegségek, a kecske arthritis encephalitis (CAE) vírusbetegség, valamint a fertőző rhinotracheitis (IBR) és a vírusos hasmenés (BVD) szarvasmarha-betegségek azonosítására. Kacs Kovics Imre (SZIE Állatorvos-tudományi Kar) beszélt eredményeiről a tehéntej immunterápiás fejlesztésében: tetszetős biotechnológiai módszertár alkalmazásával az epithelsejtekben az IgG-transzporter FcRn-receptor (MHC I típusú Fc-receptor) módosított expressziója révén fokozzák a tőgy IgG-szekréciónak a tejebe.

A *Biomedicina, biofarmakológia, humán terápiai és diagnosztikai alkalmazások* szakterület áttekintését Gergely Pál (Debreceni Egyetem) adta, aki a vonatkozó kutatásokat tematikusan csoportosítva ismertette az új diagnosztikai módszerek és az allergénvizsgálatok fejlesztése, a zsíryanycsere zavarainak populációs szűrése, egyes preventív és terápiai biotechnológiai betegségek kezelési módok kidolgozása, valamint a génterápia hazai elindítása terén.



*Kötetlen beszélgetés a konferencia szünetében: Somogyi Zoltán, Heszky László, Fésüs László és mások*

Fotó: Gacsádi Albert

A továbbiakban Szabó Gábor (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet) ismertette neuropszichiátriai betegségek biokémiai mechanizmusának vizsgálatára genetikailag módosított modellállatok előállítása terén elért eredményeiket. Transzgenikus egérmódellekben az agy meghatározott idegsejtcsoportjainak működését tanulmányozhatják (pl. a kannabinoid jelátvitelt a  $G_1$ -fehérjékhez kapcsolt CB1-receptoron, valamint a GABAerg idegsejteket a  $\gamma$ -amino-vajsavat szintetizáló glutaminsav dekarboxiláz enzimet kódoló génen [GAD65] keresztül). Muszbek László (Reanal Rt.) trombolitikus betegségek diagnosztikai módszereinek fejlesztési eredményeiről, főként a plazma XIII-as faktor analitikai meghatározására kidolgozott immunanalitikai (ELISA), valamint az FXIII-aktivitás mérésére kifejlesztett spektrofotometriás (REACHROM) módszerükről adott számot. Falus András (Simmelweis Egyetem) kiterjedt nemzetközi projekt eredményeiről adott ismertetést olyan molekuláris biológiai és immunológiai eljárások fejlesztésében, amelyben a csontritkulás hisztaminfüggő patomechanizmusát vizsgálják a hisztidin dekarboxiláz enzimet kódoló gént nézve, génkiütött egér alkalmazásával. Ezen egérklón előállításáról a

közelmúltban számoltak be a *PNAS* folyóirat hasábjain [Fitzpatrick, L. A., Buzas, E., Gagne, T. J., Nagy, A., Horvath, C., Ferencz, V., Mester, A., Kari, B., Ruan, M. Falus, A., Barsony, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**: 6027–6032.], s az modell-állatként kiválóan alkalmazható – egyebek között – allergiás megbetegedésekben a hisztaminszint és egyes tünetcsoportok közötti korrelációk vizsgálatában. Hadlaczkzy Gyula (MTA SZBK Genetikai Intézete) szatellit DNS-alapú mesterséges kromoszómák (SATAC) és az ezekkel létrehozott transzgenikus egerek előállításáról számolt be. Szabó Gyula (Szegei Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum, Kórélettani Intézet) összefoglalót adott a biomedicinális kutatásokról (12 projekt), különös tekintettel az idegrendszeri, valamint kardiovaszkuláris betegségek vizsgálatára.

A *Bioremediáció, a biotechnológia környezetvédelmi alkalmazásai* szegmens bevezető előadását Kiss Beatrix (Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium) tartotta, ismertette a szakterületen elfogadott 17 projekt tematikus és pénzügyi hátterét (három év alatt 43 elbíralt pályázat közül). A projektek a környezetvédelem számos területét ölelik fel, a biokémiai, mikrobiális és biológiai technológiák környezetanalitikai, valamint szennyezésmen-tesztési alkalmazásaiban. E fejlesztések közül ismertette Kőmíves Tamás (MTA Növényvédelmi Kutatóintézete) a Balaton térségében (Balatonfűzfő) nyárfanövény (*Populus* spp.) felhasználásával szerves talajszennyezések eltávolítására alkalmazott fitoremediációs módszerüket, valamint Edward Somnéus (Terra Humana) különféle talajszennyezők (szénhidrogén-szennyezések, klórozott szénhidrogének) együttes eltávolítására természetes és mesterséges adalékanyagok felhasználásával kidolgozott, kombinált eljárásukat.

A *Biokonverzió, a biotechnológia alkalmazása ipari gyártástechnológiákban* szekcióban Vonderviszt Ferenc (Veszprémi Egyetem) az ipari biotechnológiai alkalmazásokat tekintette át, kitérve a biomassza-hasznosításra, biokonverziós eljárásokra, biopolimerekre, valamint a nanobiotechnológiai alkalmazásokra. Kamondi Szilárd (MTA SZBK Enzimológiai Intézet) extrémofil mikroorganizmusokból izolált xilanáz enzimet kódoló génszakaszok inzertálását, hőtűrő xilanáz termeltetését és cellulózfehérítési eljárásban való alkalmazását ismer-

tette. Kovács Kornél (Szegei Egyetem, Biotechnológiai Tanszék) szintén extrémofil szervezetekből származó hidrogenáz enzimek alkalmazásait mutatta be, membránreaktor és hidrogéntároló nanocsövek felhasználásával.

A *Bioinformatika-genomika* témakörben Rákhely Gábor (Szegei Egyetem, Biotechnológiai Tanszék) összefoglalót adott a bioinformatika országosan összehangolt felsőoktatására alakult konzorcium eddigi eredményeiről, a klasszikus bioinformatikától a funkcionális genomikáig kiterjedő széles tudományterületen. Móra Veronika (Ökotárs Alapítvány) a Biotechnológia 2000 program keretében a társadami népszerűsítés terén végzett programokról (televíziós műsorok, internetportál) szólt, és kiemelte, hogy hiba lenne a társadalom idegenkedését a genetikailag módosított szervezetekkel szemben pusztán tudatlanságnak, az újjal szembeni ellenállásnak betudni. Palugyai István (Népszabadság) tudományos rovatszerkesztő újságírói szemmel elemezte, miért tájékozatlan a magyar közvélemény a biotechnológiai alkalmazások (és egyéb területek) tudományos kérdéseiben, nemzetközi példák alapján bemutatta, hogy szórakoztató formában is lehet igényes ismeretterjesztést végezni, s e tekintetben hevesen ostromozta a tudományos társadalmat, hogy saját, szűkebb kutatásainak jelentőségét sem tudja a közvélemény számára érthetően, figyelemfelkeltően és meggyőzően kommunikálni. A konferencia összefoglalóját Nyíri Lajos (Zinnia Group) fogalmazta meg, aki – hangsúlyozva, hogy nem biotechnológus – mint a műszaki fejlesztés szakértője, mind a Biotechnológia 2000 programot, mind a konferenciát igen sikeresnek ítélte. A konferencia során elhangzott gondolatok megbeszélésére az egyes szekciókat, majd az összefoglalót követő panelviták, a poszterszekció, a szünetek és az ebéd, valamint a rendezvényt záró koktél teremtettek lehetőséget. Összességében elmondható, hogy sikeres rendezvénynek adott ott-hont április 30-án a Budapest Kongresszusi Központ: a mind szakmai színvonalában, mind szervezésében, mind pedig technikai megvalósításában igényes konferencia impozáns képet nyújtott az OM-finanszírozta hazai biotechnológiai kutatásokról. Az elkövetkezőkben a biokémikus olvasók minden bizonnyal részletesebben is megismerkedhetnek számos, a konferencián ismertett projektrel a *Biokémia* folyóirat hasábjairól is.

Székács András



# Kispál Gyula professzor (1957–2003)



A Pécsi Tudományegyetem, az Általános Orvostudományi Kar, a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet megrendüléssel és mérhetetlen szomorúsággal tudatja Kispál Gyula professzor halálát, aki 2003. március 20-án tragikus körülmények között elhunyt. Váratlanul, életének 46. évében hagyott itt örökre bennünket. Egy szeretett kollégánkat, barátunkat veszítettük el. Fényes csillag volt, a szó szakmai és emberi értelmében.

1981-ben szerzett diplomát a Pécsi Orvostudományi Egyetemen. Első és utolsó munkahelye a POTE Biokémiai Intézete, (ma PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézete) volt. Egyetemi évei első pillanatától kezdve soha nem akart más lenni, mint kutató. Mára egyetemünk legfiatalabb professzora, képességeinek, munkabírásnak köszönhetően gyorsan haladt felfelé, nemcsak az egyetemi, a hazai, hanem a nemzetközi elismertség ranglétráján is. 2001-ben

nyerte el a Magyar Tudományos Akadémia Doktori fokozatát. Fiatal korához képest rendkívüli tudományos teljesítményét mutatja 51 angol nyelvű közleménye, amelyeknek színvonalat jelző impakt faktor értéke 233, és amelyekre 816 esetben hivatkoztak más kutatók világszerte. Pályájának mérföldkövei voltak rangos külföldi ösztöndíjai (Humboldt, EMBO) és tanulmányútjai, amelyeket Dallasban, Münchenben, Marburgban töltött és amely kutatóhelyekről eredményekben gazdagon, s állíthatjuk, győztesként tért haza. Tudományos munkaterületei voltak a zsírsavanyagcsere, a mitokondrium transzportfolyamatai és a vas-kén-komplexek szerepe. Pályája második felében fő módszere, korunk kutatásának úttörő metodikája, a molekuláris biológia volt, amelynek egyetemünkön Ő volt fő meghonosítója és országosan ismert szakértője. Nem zárkózott be az elmélet falai közé, kereste a kapcsolatot tudománya és a beteg ember között, amit számos, klinikus kollégákkal együtt végzett munkája bizonyít. Emberi nagyságát jelzi, ahogyan munkaerejét nem kímélve segítette az egyetemi hallgatókat és fiatal kutató tanítvány-kollégáit, tanácsaival látta el az egyetem más intézeteiből hozzá fordulókat. Szinte hihetetlen, hogy mindemellett maradt energiája az egyetemi és országos tudományos közéletre, ahol egyre magasabb tisztségeket kapott, egyre több munkát vállalva magára.

Egy felfelé ívelő pályát tört ketté a véletlen, amely oly kegyetlenül vak tud lenni. Egyetemünknek egy tartóoszlopa dőlt ki. Gyula elment úgy, hogy kollégáiban, barátaiban a pótolhatatlanság érzését hagyta maga után. Neve nem semmisült meg, bizton mondhatjuk, hozzáadott valamit az életről való jelenlegi tudásunkhoz. Gyula nem ír több tudományos munkát:

*Megnémultam... elszakadt a húr,  
Nem szólal lantom többé senkinek,  
Hanem ott bent lelkem szikláit közt  
Halkan zúgnak tovább a vadvizek*

Milyen fényes út állt volna még előtte?! De fékevesztett lován nyargal a Halál! A Halál és Gyula neve együtt! Mi, kik ismertük, el kell hogy fogadjuk az elfogadhatatlant! De felfogni nem tudjuk, mert ez felfoghatatlan.

Gyula, nyugodjál békében!

Sándor Attila

## Compact Priorclaves

40 l-es asztali autokláv  
60 l-es mobilis autokláv



## Top Loading Priorclaves

Felültöltős autoklávok  
100-150 l térfogatig



## Rectangular Section Priorclaves

Szögletes munkaterű autoklávok  
230-700 l térfogatig



Prior  
clave

## Front Loading Priorclaves

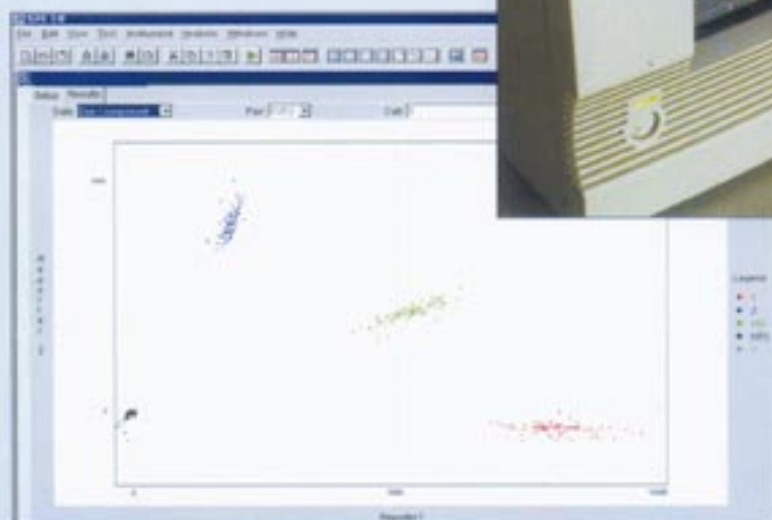
Elöltöltős autoklávok  
100-200 l térfogatig



**Minden nov. 30-ig megrendelt  
készülékre 10 % árengedményt adunk!**

# 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. Decoded. Discovery.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists. Applied Biosystems Corporation consists of the Applied Biosystems and Celeris Genomics businesses. The PCR process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and 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 út 17.  
T (1) 471 8989 F (1) 471 8980