

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. 4. SZÁM

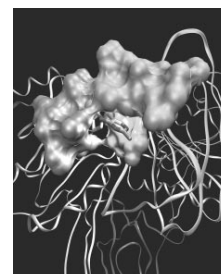
2003. DECEMBER

A tartalomról:

- ◇ Az oldottoxigén-koncentrációval történő szubsztrátáplálás lehetőségének vizsgálata rekombináns *Pichia pastoris* Mut⁺ esetén – Kupcsulik Bálint, Bécsi János, Párta László és Sevelle Béla
- ◇ Szerin-proteáz-inhibitorok: modellek szintézisétől az *ab initio* számításokig – Mucsi Zoltán, Orosz György és Perczel András
- ◇ Humán placenta protein 20 (PP20) / tiamin-pirofoszfokináz (hTPK): szerkezettől a funkcióig – Barna László, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Szabó Zoltán, Ohmacht Róbert, Janáky Tamás, Than Nándor Gábor, Szilágyi András, Závodszy Péter és Sümegei Balázs
- ◇ Az Európai Biotechnológiai Szövetség regionális irodája Szegeden – Kovács Kornél

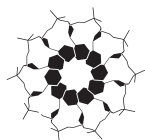
Címlapkép:

A hTPK homológiamodellezéssel nyert térszerkezetének háromdimenziós ábrázolása. A tiamin az aktív helyen pálcika ábrázolásban látszik. Az aktív helyet alkotó láncszakaszok (AI, AII, AIII) oldószerhozzáférési felszín ábrázolásban (zöld: A lánc, világoskék: B lánc), míg a fehérje gerince szalagábrázolásban látható. A kép VMD programmal készült, a hozzárendelések POV-Ray módszerrel készültek. (ld. a vonatkozó közleményt az 88–95. oldalakon.)



Contents:

- ◇ Analysis of the application possibilities of the dissolved oxygen spike method in case of recombinant *Pichia pastoris* – Bálint Kupcsulik, János Bécsi, László Párta and Béla Sevelle
- ◇ Serine protease inhibitor models: from engineering and synthesis to *ab initio* calculations – Zoltán Mucsi, György Orosz and András Perczel
- ◇ Human placental protein 20 (PP20) / thiamin pyrophosphokinase: from structure to function – László Barna, Szabolcs Bellyei, András Szigeti, Árpád Boronkai, Zoltán Szabó, Róbert Ohmacht, Tamás Janáky, Gábor N. Than, András Szilágyi, Péter Závodszy and Balázs Sümegei
- ◇ The regional office of the European Federation of Biotechnology – Kornél Kovács



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

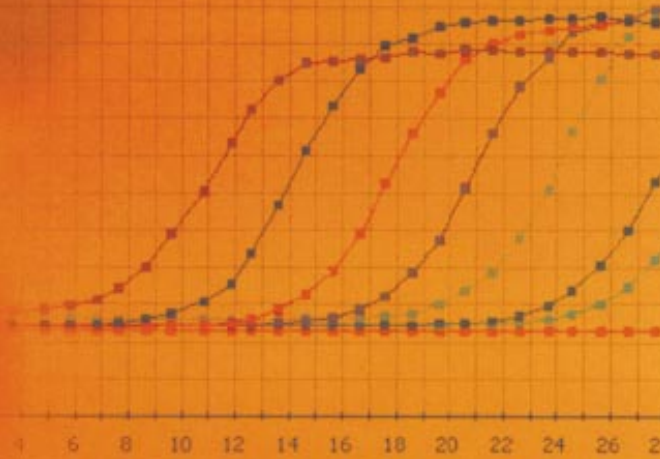
Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455

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

WEBio
BioScience Portal

Now available for
Capillary-Based PCR
Thermal Cyclers



FailSafe PCR Results in Real-Time!

FailSafe™ Real-Time PCR System

- Extends the unsurpassed **specificity, sensitivity, and consistency** of the FailSafe™ PCR System to quantitative PCR applications with a **broader dynamic range**.
- Like our standard FailSafe™ PCR System, this new real-time PCR kit ensures successful quantitative PCR the **first time and every time**.

What makes the FailSafe™ Real-Time PCR System "fail-safe"?

- **FailSafe PCR Enzyme Mix:** A unique blend of thermostable enzymes that is capable of amplifying the most difficult DNA templates with extremely high sensitivity and fidelity, with no extra "hot start" step.
- **A set of FailSafe PreMixes:** Include SYBR® Green I dye, dNTPs, buffer, and varying amounts of MgCl₂ and the FailSafe PCR Enhancer (with betaine).*



EPICENTRE®
www.epicentre.com
888-824-8794

Circle 26 on Reader Service Card

* The use of betaine in DNA or RNA polymerase reactions is covered by patent rights exclusively licensed to EPICENTRE Technologies.

EPICENTRE is a registered trademark, FailSafe is a trademark of EPICENTRE Technologies. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. SYBR® Green I Dye is covered by patents.

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

Az oldottoxigén-koncentrációval történő szubsztrát-rátáplálás lehetőségének vizsgálata rekombináns *Pichia pastoris* Mut⁺ esetén

Analysis of the application possibilities of the dissolved oxygen spike method in case of recombinant *Pichia pastoris*

Kupcsulik Bálint, Bécsi János, Párta László 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., Bécsi, J., Párta, L. 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 dissolved oxygen spike (DO-spike) method is a generally accepted way of substrate feed control of recombinant methanogen *Pichia pastoris* fermentations. The method supposes a direct connection between the methanol level in the fermentation broth and the drop of dissolved oxygen concentration for periodic substrate addition. We completed the dynamic model of Zhang with

a theoretical oxygen balance based on metabolic consideration, and fitted the model parameters to empirical data. The results revealed that beside the known parameters, other considerations should be involved in the model. The statistical analysis of experimental data also supports the complexity of the effects on the dissolved oxygen drop, denying the application of the DO-spike method in case of *Pichia pastoris*.

A metanogén *Pichia pastoris* fajon alapuló expresziós rendszert elterjedten alkalmazzák világszerte, mind laboratóriumi, mind ipari léptékben [1,2]. A rendszer alapját az élesztő alkohol-oxidáz promóterei jelentik, melyek erős kifejeződésűek, metanollal indukálhatók és katabolitrepesszió alatt állnak (glicerin, glükóz) [3]. A termékképzési szakaszban szintetikus tápoldatot használva a metanol szolgál egyedüli szén- és energiaforrásként, valamint az felelős a heterológ fehérje képződésének indukálásáért is, ezért a metanolkoncentráció megfelelő értéken történő szabályozása a rekombináns termék képzésének alapfeltétele [4]. A termékképzéshez használt metanolkoncentráció optimuma több hatás együttes eredménye: a promóterindukció, az enzim-szubsztrát kölcsönhatás, valamint a metanol oxidációja során képződő hidrogén-peroxid, formaldehid és hangyasav akkumuláció miatti toxicitása összetett rendszert hoznak létre. A kísérletes vizs-

gálatok a kívánatos metanolkoncentrációt a termékképzési szakasz során 0,5–1 g/l értékben határozták meg [5]. A metanolkoncentráció tartására a szakirodalom három lehetséges módszert sorol fel: az előre meghatározott program szerinti metanol-adagolást, a metanolnak a kimenő gáz elemzésével történő direkt mérésén vagy szubmerz detektorokkal történő meghatározásán alapuló, illetve az oldott oxigén koncentrációjának csökkentésével (koncentrációeséssel) történő szubsztrátadagolási szabályozást [6–8]. Annak ellenére, hogy ez utóbbi módszer elfogadottsága általánosnak tűnik, alkalmazására csak egy példa ismert [9].

Az oldottoxigén-koncentrációesési módszer egyértelmű kapcsolatot feltételez a metanolkoncentráció és az oldott oxigén koncentrációesésének (mely a szakaszosan adagolt metanol hatására következik be) mértéke között. Mivel a metanol felhasználása oxigénfogyasztással jár, a fajlagos szubsztrátfo-

gyasztási sebesség megváltozása állandó levegőztetés mellett az oldott oxigén koncentrációváltozását vonja maga után. Általánosan elfogadott hipotézis szerint az oldott oxigén koncentrációjelének változása fölhasználható a metanolkoncentráció becslésére, és így a szubsztrátadagolás szabályzására. Vizsgálataink célja annak modell alapú és kísérletes felmérése volt, hogy az oldottoxigén-koncentrációesési módszer valóban felhasználható-e a metanoladagolás szabályzására.

Elsőként Zhang és mtsai, a metanol által kifejtett nem versengő gátláson alapuló, kísérleti adatokkal alátámasztott modelljét egészítettük ki egy, az oldott oxigén koncentrációváltozását leíró differenciálegyenlettel (I. és II. táblázatok) [10]. Az egyenletben az „a” paraméter segítségével az oxigénfogyasztást a metanolfogyasztási sebességhez kapcsoltuk. A „a” paraméter az egy mol metanol elfogyasztásakor felhasznált oxigén moláris mennyiségét jelzi. A paraméter értéke a hidrogén-peroxidból kataláz hatására felszabaduló oxigén felhasználása nélkül a metabolikus egyenlet szerint maximum 2 lehet, ha a teljes felhasznált metanol kizárólag energiaképződésre fordítódik. Ha viszont a hidrogén-peroxidból felszabaduló oxigén teljes új-

rahasznosulását feltételezzük, az „a” paraméter értéke 1,5. Amennyiben figyelembe vesszük, hogy optimális fermentációs körülmények között a metanolból képződő formaldehid maximum 20%-a a xilulóz-5-foszfát útján beépül az új sejtömegbe és a képződő termékbe, „a” paraméter minimális értéke 1,2 lehet. Az egyenletben a másik két paraméter közül a folyadékoldali anyagátadási együttható ($K_L a$) lehetséges értékeit az ún. dinamikus módszerrel [11] határoztuk meg, míg az oldott-oxigén-koncentráció telítési értékét adatbázis alapján becsültük [12].

1,5 literes hasznos térfogatú Biostat M fermentorban (B. Braun) a *P. pastoris* β -gal Mut⁺ törzsével indítottunk fermentációkat [3]. A glicerinen történő sejtömegképző szakasz, majd egy adaptációs periódus után a kívánt metanolkoncentrációt – beépített (*on-line*) metanolszenzor segítségével – 24 órán keresztül állandó szinten tartottuk. A tartási szakasz az alkohol-oxidáz rendszer teljes, a beállított metanolkoncentrációra jellemző indukálására szolgált. A fermentlevet végül aszeptikusan 3 x 0,5 literes térfogatban Biostat Q fermentorokba (B. Braun) osztottuk szét. Az oxigénelektrod jelstabilizálódása után a három fermentorba eltérő



Kupcsulik Bálint 1999-ben végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki Karán mint biomérnök, 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. 2003-tól tanszéki mérnök. Főbb kutatási területei: fermentációs kinetikai vizsgálatok rekombináns *Pichia pastoris*-, *Aspergillus terreus*-, *Acetobacter*- és *Enterobacter*-törzsekkel.

Bécsi János biomérnök-hallgató a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki Karán. Munkája a „Rekombináns *Pichia pastoris* fermentációja” projektben a kinetikai modellezésre, fermentációs optimalizálásra, valamint a biológiai alapú termékképzési (*upstream*) és -tisztítási (*downstream*) műveletekre terjed ki.



Párta László biomérnök-hallgató a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki Karán. Munkája a „Rekombináns *Pichia pastoris* fermentációja” projektben a kinetikai modellezésre, fermentációs optimalizálásra, valamint az 1,3-propándiol-oxidoreduktáz enzimmel kapcsolatos, biológiai alapú terméktisztítási (*downstream*) műveletekre terjed ki.

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.



I. táblázat Az illesztett dinamikus modell

Fajlagos növekedési sebesség	$\mu = \frac{\mu_m \cdot M}{K_S + M + \frac{M^2}{K_i}}$
Mélegegyenlet a nedvesanyag-tartalomra	$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x$
Fajlagos metanolfelhasználási sebesség	$v_M = \frac{1}{Y_m} \cdot \mu + m$
A metanolfogyasztás sebessége	$\left(\frac{dM}{dt}\right)_x = v_M \cdot \frac{dx}{dt}$
Anyagmérleg-egyenlet metanolra (az adagolt metanol térfogata elhanyagolható)	$\frac{dM}{dt} = F - v_M \cdot \frac{dx}{dt} + M_{\text{addition}}$
Metanolbetáplálás	$F = \left(\frac{dM}{dt}\right)_x \quad \text{ha } t < t_{\text{addition}} ;$ $F = 0 \quad \text{ha } t \geq t_{\text{addition}}$
Anyagmérleg-egyenlet oldott oxigénre	$\frac{dO}{dt} = K_L a \cdot (O_S - O) - 1.5 \cdot \left(\frac{dM}{dt}\right)_x \cdot \frac{32}{32}$

II. táblázat Az illesztett modell paramétereit (x , $K_L a$, O_S és a illesztett és mért értéke, a többi paraméter Zhang szerint [10])

μ	Fajlagos növekedési sebesség [h^{-1}]	
μ_m	Maximális fajlagos növekedési sebesség [h^{-1}]	0,146
M	Metanolkoncentráció [g/l]	
K_S	Az unkompetitív növekedési modell paramétere [g/l]	1,5
K_i	Az unkompetitív növekedési modell paramétere [g/l]	8,86
v_M	Fajlagos metanolfelhasználási sebesség [g/g/h]	
Y_m	Metanolra vonatkoztatott hozam [g/g]	1,19
m	Fenntartási koefficiens [g/g/h]	0,071
x	Nedvesanyag-tartalom [g]	33,3
t	Idő [h]	
F	Metanolbetáplálás [g/h]	
M_{added}	Metanolkoncentráció-ugrás [g/l]	0,731
t_{addition}	Koncentrációugrás ideje [h]	
O	Oxigénkoncentráció [g/l]	
$K_L a$	Folyadékoldali oxigénátadási sebességi együttható [h^{-1}]	9,92
O_S	Telítési oxigénkoncentráció [g/l]	0,012
a	Felhasznált oxigén/metanol mólarány [mol/mol]	1,21
32/32	Az oxigén és a metanol molekulatömegének aránya	1,00

mennyiségű metanolt fecskendeztünk. A központi adatgyűjtő programmal (MFCS II.) rögzített oldottoxigén-koncentráció jeleit utólagosan értékeltük. A kinetikai paraméterek illesztéséhez Madonna, a statisztikai értékeléshez Statistica for Windows programot használtunk.

A kinetikai modell illesztése a kísérleti adatokhoz, amelynek során az „a” paraméter mellett a folyadékoldali anyagátadási együttható és a telítési oldottoxigén-koncentráció értékét vál-

toztattuk, nem adott kielégítő eredményt. Ennek oka valamely olyan hatás, amit a modell nem ír le: vélhetően a metanoltelésnek az oldott oxigén koncentrációjára gyakorolt hatása, illetve a fajlagos metanolfogyasztási sebességnek Zhang modelljénél radikálisabb – a metanolkoncentráció változása okozta – növekedése. Az illesztési eredmények az „a” paraméter alacsony (1,2–1,5) értékét sugallták, azaz a hidrogén-peroxidból felszabaduló oxigén újrahasznosulását feltételezik. A mérési adatokat statisztikai módszerekkel vizsgálva kiderült, hogy a sejtkoncentrációnak, a beadagolt metanol mennyiségének és a metanolkoncentrációnak az oldott oxigén koncentrációesésének mértékére gyakorolt hatása nem választható szét, tehát statisztikai modell sem állítható fel az oldottoxigén-koncentráció esésével történő szabályozásra. Megállapítható tehát, hogy eredményeink nem igazolják azt az általánosan elfogadott nézetet, mely szerint a rekombináns *Pichia pastoris* Mut⁺ fajjal végzett fermentáció esetén az oldott oxigén koncentrációesési módszere alkalmas a szubsztrátbetáplálás szabályozására.

Irodalomjegyzék

- [1] Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 45–66.
- [2] Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**: 329–332.
- [3] Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M. (1998) *In: Methods in molecular biology*, Vol. 103 (Higgins, D. R., Cregg, J. M., Eds.) (Humana Press, Totowa, NJ) pp. 107–120.
- [4] Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P. G., Henke, M., Van der Logt, P., Fischer, R. (2000) *Biotechnol. Bioeng.*, **74**: 344–352.
- [5] Minning, S., Serrano, A., Pau Ferrer, P., Solá, C., Schmid, R. D., Valero, F. (2001) *J. Biotechnol.*, **86**: 59–70.
- [6] Guarna, M. M., Lesnicki, G. J., Tam, B. M., Robinson, J., Radziminski, C. Z., Hasenwinkle, D., Boratson, A., Jervis, E., MacGillivray, R. T. A., Turner, R. F. B., Kilburn, D. G. (1997) *Bioeng.*, **56**: 279–286.
- [7] Buckholz, R. G., Gleeson, M. A. G. (1991) *Biotechnology*, **9**: 1067–1072.
- [8] Kupcsulik, B., Sevela, B., Ballagi, A., Kozma, J. (2001) *Acta Alim. Hung.*, **30**: 99–111.
- [9] Rodríguez Jiménez, E., Sanchez, K., Roca, H., Delgado, J. M. (1997) *Biotechnol. Tech.*, **11**: 461–466.
- [10] Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., Meagher, M. M. (2000) *Biotechnol. Bioeng.*, **70**: 1–8.
- [11] Szűcs N., Szigeti L., Sevela B. (1996) *Hung J. Ind. Chem.*, **24**: 229–234.
- [12] Atkinson, B., Mavituna, F. (1983) *In: Biochemical engineering and biotechnology handbook*. (The Nature Press, New York, NY) pp. 727–801.



sartorius



Protein isolation,
concentration and
purification

Monoclonal antibody
purification from
tissue culture supernatant

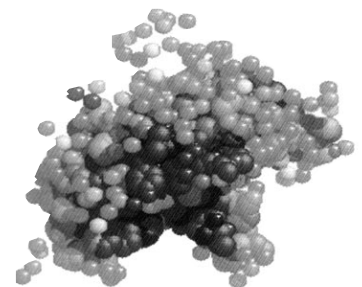
Endotoxin Removal

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



ÁLTALÁNOS LABORTECHNIKA

SZÜRŐPAPIROK MEMBRÁNSZÜRÖK

100 FALTENFILTER
MACHEREY-NAGEL
MN 615A 18,5 cm Ø

MN 640 d
100 µm porózus membrán
MACHEREY-NAGEL

MN 640 w
100 µm porózus membrán
MACHEREY-NAGEL

AKTIVIT Kft.
MACHEREY-NAGEL

NITROGEN / PROTEIN tartalom mérése

Dumas módszer szerinti eggyéssel,
automata analízátorokkal

Rapid N
Vario MAX

A Dumas módszer előnyei:

- * Igen kis helyen kis mennyiség
- * Gyors (6 perc)
- * Teljesítés égés
- * Abszolút pontosság
- * Pontos ismételtetés
- * Nagy mintabemérés: 1...3 g
- * Robosztus
- * Felügyelet mentes

AKTIVIT Kft.
H-1581-Budapest, Pf.: 104.
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866

IKA CATALOG

SEIT/SINCE 1844
KERN
WAAGEN - GEWICHTE - BALANCES - WEIGHTS

Chromatography

Bioanalysis

Liquid Chromatography
Sample Preparation
TLC / HPTLC
Gas Chromatography

MACHEREY-NAGEL

AKTIVIT Kft.
H-1581-Budapest, Pf.: 104.
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866 Fax: 252-9940

KVALITATIV TESZTPAPIROK PH - PAPIROK Kvantitatív Tesztpapírok

MACHEREY-NAGEL · DÜREN

fast
• 24 hours delivery service
• order today, on its way tomorrow
• Sales & service hotline
from 8 a.m. - 6 p.m.

competent
• DKG accreditation for
balances and weights
• Accredited to
ISO 9001:2000

reliable
• 3 years guarantee for
balances over 4.500,-
• Precision in weighing tech-
nology for almost 100 years

AKTIVIT Kft.

☒ H - 1581 - Budapest, Pf.: 104.
H - 1145 - Budapest, Pétervárad u. 14.
☎ (36-1) 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA ELÉRHETŐ ÁRON

Nuclear Instruments for Radiation
Protection and Monitoring

VÍZANALITIKA WTW

* mobil,
* laboratóriumi és
* on-line
kivitelben

PARAMÉTEREK:
pH
*redox potenciál
*ionoszekvív mV
*oldott oxigén
*vezetőképesség
*hőmérséklet
*zavarosság
DO
*NO₂, NO₃, PO₄
*TOC, SAC...
*automata vízmintavétel

WTW

MEGBÍZHATÓ EREDMÉNYEK A TEREPEEN CSÚCSMINŐSÉGŰ ESZKÖZKEL

AKTIVIT Kft.
H-1581-Budapest, Pf.: 104.
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866 Fax: 252-9940

behr
Labor-Technik
Düsseldorf

High Temperature TOC and TN_x Magas hőmérsékletű TOC és TN_x highTOC II - all in one -

nagytisztaságú vizek,
szennyvizek,
iszapok és szilárd minták
vizsgálatához egyaránt

automes

PRODUCT INFORMATION

Sampler stationary • portable

automata vízmintavetők

CI 10 AOX, EOX, POX és AOS coulometriás meghatározása automatikusan

Desztilláció, extrakció, termoreakció behrotes® univerzális analitikai rendszer "NEHÉZ" MÉRÉSEK KÖNNYEDÉN

AKTIVIT KFT. Budapest
Tel: 221-7866, 470-0125. Fax: 252-9940.

behr
Labor-Technik
Düsseldorf

GYORSTESZTEK Universal Nanocolor

INDIKÁTOR- ÉS TESZTPAPIROK VIZUÁLIS TESZTKÉSZLETEK
1 - 1000 mg/l 0,01 - 100 mg/l

Nanocolor

AKTIVIT Kft.
H-1581-Budapest, Pf.: 104.
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866 Fax: 252-9940

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA

FOTOMETRIÁS REAGENSZESZLETEK: 0,001 - 1000 mg/l

KÖRNYEZETVÉDELEM - VÍZANALITIKA

Szerin-proteáz-inhibitorok: modellek szintézisétől az *ab initio* számításokig

Serine protease inhibitor models: from engineering and synthesis to *ab initio* calculations

Mucsi Zoltán¹, Orosz György²,
Perczel András³

ELTE Szerves Kémiai Tanszék
és MTA Peptidkémiai Kutatócsoport,
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A

¹ Jelenlegi cím: Chinoin Rt.,
1045 Budapest, Tó u. 1–5.
E-mail: zoltan.mucsi@sanofi-synthelabo.com

² Jelenlegi cím: CF Pharma Kft.,
1097 Budapest, Kén u. 5.
E-mail: orosz.gyorgy@cfpharma.hu

³ E-mail: perczel@para.chem.elte.hu

Összefoglalás

A 35 aminosavból felépülő SGCI (*Schistocerca gregaria* kimotripszin inhibitor) szerin-proteáz-inhibitor működésével kapcsolatos szerkezeti feltételek megismerése céljából konvergens szintézissel előállítottunk három, tervszerűen egyszerűsített szerkezetű (17, illetve 24 aminosavból álló) modellpeptidet, majd összehasonlító biológiai, NMR-spektroszkópiai és molekuladinamikai (MD) vizsgálatokat végeztünk a konstitúció, a térszerkezet és a biológiai hatás összefüggéseinek felderítésére. Kedvezőbb modellek kialakítása érdekében sor került további három, a számítógépen némileg módosított modellpeptid MD szimulációjára is. Az eredmények arra utalnak, hogy szoros összefüggés áll fenn az inhibitorsajátság és a kötőzseb, illetve az aktív centrum konformációjának merevsége között, amit egy stabilizáló régió biztosít. *Ab initio* kvantumkémiai számításokkal bizonyítható, hogy az inhibítormolekulák kimotripszin által kiváltott hasítását a tetraéderes intermedier kialakulásának magas energiagátja akadályozza az enzimhez tartozó szerin-oxigénatom aktív centrumra való támadása során, ami az inhibitor aktív centrumának konformációs merevségével áll összefüggésben.

Mucsi Z.¹, Orosz Gy.², Perczel A.³

Department of Organic Chemistry, Eötvös L. University, Research Group of Peptide Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A

¹ Present address: Chinoin Rt.,
1045 Budapest, Tó u. 1–5.
E-mail: zoltan.mucsi@sanofi-synthelabo.com

² Present address: CF Pharma Ltd.,
H-1097 Budapest, Kén u. 5.
E-mail: orosz.gyorgy@cfpharma.hu

³ E-mail: perczel@para.chem.elte.hu

Summary

Three model peptides of different sizes (17–24 amino acid residues) mimicking the chymotrypsin inhibitor isolated from *Schistocerca gregaria* (SGCI, a peptide of 35 amino acid residues) were designed and prepared by convergent peptide synthesis. In order to clarify relationships between structure, stereochemistry and biological activity, the model compounds were investigated by their inhibitory activity, NMR spectroscopy and MD simulations, and data were compared with those obtained for SGCI. MD calculations of three slightly modified models were also performed. From results obtained we concluded a definite correlation between the inhibitory activity and the rigidity of the binding loop, which is established by an appropriate stabilizing region in the inhibitor molecule. *Ab initio* calculations indicated that the scission of the inhibitor molecules by chymotrypsin is hindered by a relatively high activation energy required for the formation of a tetrahedral intermediate when the rigid active centre in the inhibitor is attacked by the serine O atom of the enzyme.

A bioorganikus kémia egyik fontos területe az enzimek működésének megismerése, ideértve az enzimműködés gátlását és aktiválását is. Ezzel összefüggésben a peptidkémia egyik legdinamikusabban fejlődő ága a biológiailag aktív peptidok izolálása, szintézise és szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítése. Manapság a számítógépek teljesítménye már megengedi, hogy komplex biológiai rendszerek működését ezek egyszerűsített modelljein tanulmányozzuk és értelmezzük, bár attól még távol vagyunk, hogy a logikusan tervezett kísérleteket és a modellvegyületek szintézisét mellőzni tudjuk. A tudomány e három részterületének összekapcsolása útján, egy kimotripszininhibitor modellezését és a modellek vizsgálatát tűzte ki célul az ELTE Szerves Kémiai Tanszéke és az ott működő MTA Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai. A modellezés tárgyául választott peptidinhibitor a sivatagi sáskából (*Schistocerca gregaria*) származó, viszonylag kis molekulájú (mindössze 35 aminosavból felépülő ugyanakkor rendkívül hatékony (inhibíciós állandó $K_i = 6 \times 10^{-12}$) kimotripszininhibitor (SGCI) [1]. A molekula háromdimenziós (3D) térszerkezetének középső részén található, feltehetően kulcsszerepet játszó három antiparallel β -redőnek (1. ábra) köszönhetően a szerkezet kompakt, és várhatóan szinte bármilyen környezetben stabil marad [2].

Az SGCI a kanonikus inhibitorok családjába tartozik: a peptid aktív centrumát alkotó aminosavak minősége és sorrendje – azaz a P1-P1' pozíció

(Leu³⁰-Lys³¹), amely része az ún. kötőhuroknak – tökéletesen megegyezik egy közöséges kimotripszinszubsztrát P1-P1' pozíciójával. Amíg szubsztrátját a kimotripszin pillanatok alatt elhasítja, addig az inhibitor többnyire csak napok alatt hasad el. A kanonikus inhibitor hatásvizsgálatában kutatási stratégiánk egyik oldalát az jelenti, hogy értelmezzük az inhibitor molekula kísérletileg meghatározott 3D szerkezetét [2], továbbá mért és számolt dinamikáját. Másik aspektust jelent, hogy az inhibitoroként vagy szubsztrátként szereplő peptid és az enzim közötti kölcsönhatást próbáljuk biológiai kísérleti módszerekkel vizsgálni, ideértve az inhibíciós állandó meghatározását [1]. Projektünk és az arra épülő doktori munka [3] egy harmadik oldalról kívánta megközelíteni a problémát: kiindulva az SGCI korábban megismert konstitúciójából és 3D szerkezetéből, kevesebb aminosavból felépülő modellpeptideket terveztünk és állítottunk elő szintetikus úton [4], és az SGCI molekulához hasonlóan meghatároztuk térszerkezetüket [5] és biológiai aktivitásukat [6,7], annak eldöntésére, hogy képesek-e imitálni az eredeti inhibitorot. A tervezés [4] sarkalatos pontja az volt, hogy az etalonnak tekintett SGCI szerkezetet oly módon egyszerűsítsük, hogy a kialakítandó modell tartalmazza az SGCI összes fontosnak tekintett szerkezeti részletét. Ilyen feltétel mellett nyilvánvalóan meg kellett tartanunk az enzim aktív centrumához kötődő részt, azaz a P1-P1' pozíciót, valamint annak kémiai környezetét, ideértve nemcsak a kötőhuroknak neve-

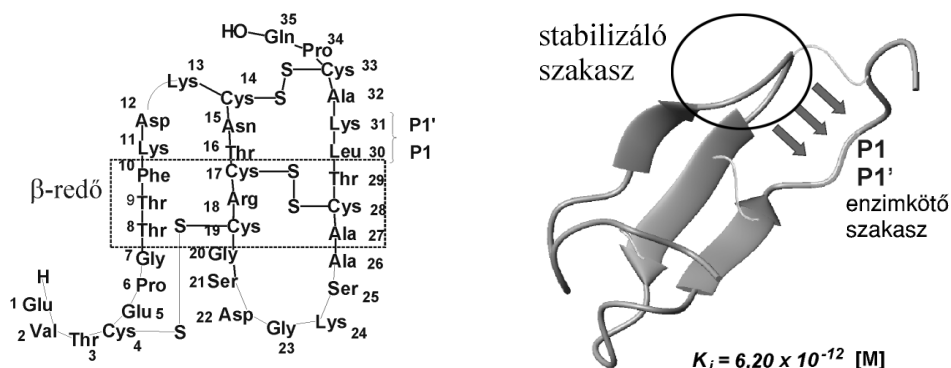


Mucsi Zoltán 1999-ben szerzett vegyész oklevelet az Eötvös Loránd Tudományegyetem vegyész szakán. 1999–2002 között az ELTE-TTK Kémia Doktori Iskola hallgatója volt. „Proteáz-inhibitorok modellezése, szintézise és szerkezetvizsgálata” című doktori értekezését 2003-ban védte meg. Jelenleg posztdoktori állást tölt be a Chinoïn Rt-nél. E cikk rövid áttekintést ad Mucsi Zoltán doktori munkájáról, amely az ELTE-TTK Kémiai Doktori Iskolájában készült Orosz György és Perczel András irányításával.

Orosz György 1982-ben szerzett vegyész oklevelet az Eötvös Loránd Tudományegyetem vegyész szakán. 1992–2001 között az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén működő MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban dolgozott, tud. főmunkatársként. Kandidátusi értekezését 1993-ban védte meg. Jelenleg a CF Pharma Kft. szintetikus laboratóriumának vezetője.



Perczel András 1985-ben szerzett diplomát az Eötvös Loránd Tudományegyetem vegyész szakán. 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.



1. ábra Az SGCI-inhibitor aminosavszekvenciája, térszerkezetének vázlatos ábrázolása és inhibíciós hatékonysága (K_i). A körrel az ún. stabilizáló szakaszt, a nyílakkal annak hatását jelöltük a P1-P1' pozícióra.

zett szakasz szekvenciális azonosságát, hanem térszerkezeti meghatározottságát is (1. ábra). A szerkezet alapján a P1-P1' pozíció környezetében kijelölhető egy olyan stabilizáló szakasz, amely látszólag nem vesz részt az enzimmel való kölcsönhatásban, de meghatározza az aktív centrumhoz kötődő részlet térszerkezetét.

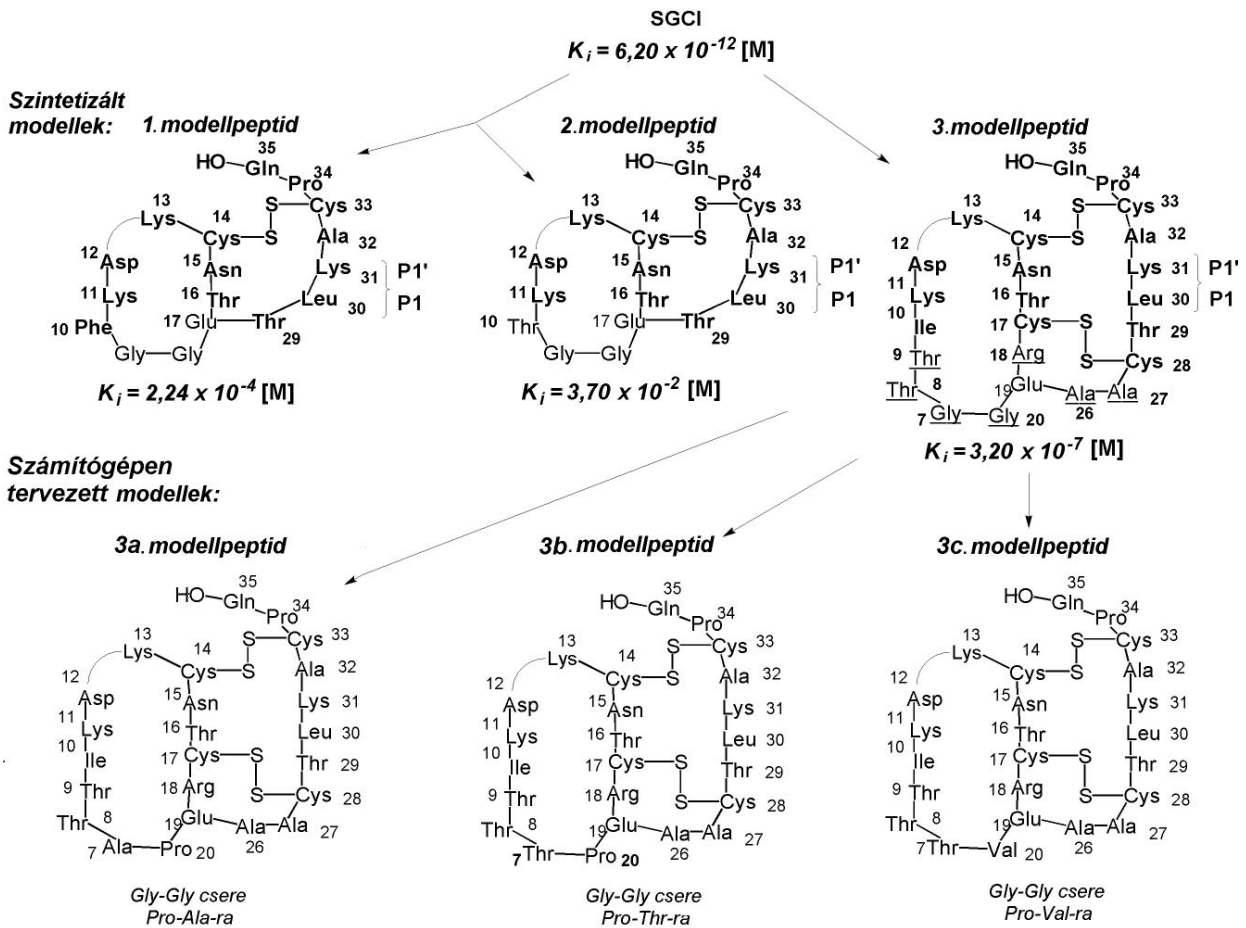
A modellpeptidek

Az első modellpeptid tervezése során – megtartva a fontosnak vélt szakaszokat – elhagytuk az SGCI 1–9 és 18–28 szakaszait. A Cys¹⁷ aminosavrésszt egy Glu¹⁷ résszel helyettesítettük, és ezt amidkötéssel a Thr²⁹ részhez kapcsoltuk, amivel pótolni kívántuk az SGCI ily módon elhagyott, Cys¹⁷ és Cys²⁸ részek közötti diszulfidhídját. Az SGCI-peptidben levő két β -redőt egy Gly-Gly híddal kívántuk együtt tartani, amely a Phe¹⁰ és Glu¹⁷ részeket kötötte össze. E módosításokat követően modellpeptidünk egy olyan tíztagú ciklopeptid és egy héttagú peptid-oldallánc kombinációja lett, amelyben a két szerkezeti részletet egy diszulfidhíd köti össze (2. ábra).

A fentiek szerint tervezett 1 modellpeptidet szintézissel előállítottuk [4], ám a biológiai vizsgálatok [6] alacsony inhibíciós hatást jeleztek ($K_i = 10^{-4}$), így az 1 modellpeptid inkább szubsztrátnak, semmint inhibitornak tekinthető. Ráadásul kimutattuk, hogy a peptid két helyen hasad: az egyik a már említett P1-P1' pozíció, míg a másik a Phe¹⁰ és a Lys¹¹ közötti kötés. A váratlan hasadás okát abban véltük megtalálni, hogy a Phe¹⁰ az eredeti SGCI molekulában is megtalálható ugyan, de el van rejtve az enzim elől. Egyszerűbb szerkezetű modell-

peptidünk esetében viszont a Phe¹⁰ szabadon áll, és így jó szubsztrátja a kimotripszinnek.

A tapasztalatokat felhasználva előállítottuk a második modellpeptidet [4], amelyben a Phe¹⁰ helyére Thr¹⁰ részletet építettünk be (2. ábra). Az így szintetizált molekula váratlan hasadást nem mutatott, azonban a gátló hatás elmaradását jelző $K_i = 10^{-2}$ érték még az előző modellpeptidénél is kedvezőtlenebb volt [6], vagyis az SGCI molekula szerkezetének felére csökkentése túlságosan radikális változást jelent, és a kezdeti feltevések ellenére sem biztosítja a konformációnak az inhibitorhatáshoz szükséges merevségét. Ezt az elgondolást az 1 és 2 modellpeptidek térszerkezetének NMR-spektroszkópiai vizsgálatával [5] kívántuk igazolni, az SGCI-vel történő összehasonlítás alapján. Az oldatfázisban történő NMR-vizsgálat előnye, hogy a meghatározott szerkezet nem egy statikus, merev struktúra, mint amelyet a röntgendiffrakciós módszer szolgáltat, hanem a viszonylag stabil konformerek egy csoportja, amiből indirekt módon az oldatban megvalósuló konformációváltozásokra, dinamikus mozgásokra is következtethetünk, és így felismerhetjük a molekula mozgékony és merev részeit. Az NMR-vizsgálat során a peptidről vizes oldatban többféle módszerrel kétdimenziós spektrumokat veszünk fel. A COSY (*Correlated Spectroscopy* – korrelált spektroszkópia) és TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy* – teljesen korrelált spektroszkópia) típusú spektrummal az aminosavakat, illetve azok H-atomjait asszignáljuk, míg a NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* – nukleáris Overhauser-effektus spektroszkópia) típu-

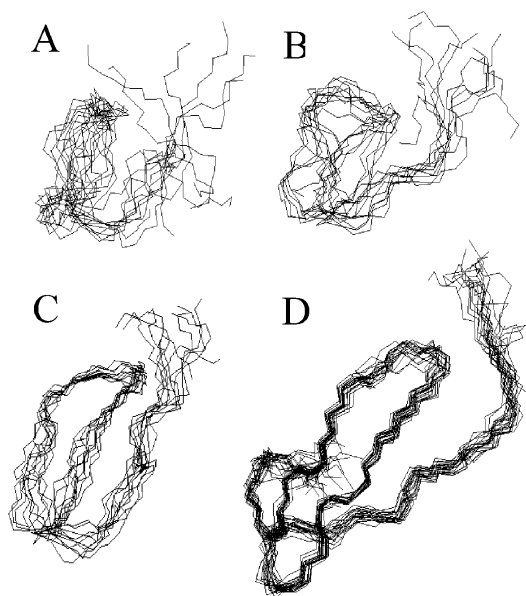


2. ábra A szintetizált 1–3 modellpeptidok szerkezete és inhibíciós hatása (K_i) és a további, számítógéppel tervezett 3a–3c modellpeptidok szerkezete.

sú spektrummal a H-atomok közötti távolságokat tudjuk meghatározni, azaz kényszerfeltételeket kapunk. Ezekkel a kényszerfeltételekkel molekuladinamikai (MD) számolásokat végzünk, amelyek eredménye a peptid 3D szerkezete. Végül a szerkezetet finomítjuk úgy, hogy a rossz kényszerfeltételeket elvetjük, illetve új kényszerfeltételeket találunk. A vázolt módszer alkalmazásával meghatároztuk az 1 és 2 modellpeptid 3D szerkezetét és azt az SGCI alapszerkezetéhez hasonlítottuk (3. ábra). A várakozásnak megfelelően az 1 és 2 modellpeptid térszerkezete rendezetlenné bizonyult az SGCI szerkezetéhez képest.

Egy harmadik, 24 aminosavból álló modellpeptidben [4] nagyobb darabot hagytunk meg az eredeti SGCI-ből, és a Thr¹⁰ részt Ile¹⁰ aminosavra cseréltük, abban bízva, hogy itt jobban megőrződik a Phe apoláros környezete. A 3 modellpeptidben meg-

találhatók az SGCI eredeti Cys¹⁴–Cys³³ és Cys¹⁷–Cys²⁸ diszulfidhídjai, és a peptidoldallanc Ala²⁶ része amidkötéssel csatlakozik a ciklopeptidrészen levő Glu¹⁹ γ -aminocsoportjához (2. ábra). E modellpeptid inhibíciós aktivitása már $K_i = 2 \times 10^{-7}$ [7], ami nemcsak szignifikáns növekedést jelent a korábbi modellekhez képest, hanem azt is, hogy átléptük azt a határt, amely fölött már valóban inhibitorhatásról beszélhetünk. (Itt jegyezzük meg, hogy az SGCI peptiddel homológ, inhibitorként számon tartott SGTI K_i értéke hasonló nagyságrendű: $2,21 \times 10^{-7}$ marha tripszinnel szemben). Kétségtelen azonban, hogy a 3 modellpeptid az SGCI molekulánál még mindig öt nagyságrenddel kevésbé hatékony. A 3 modellpeptid NMR-módszerrel meghatározott 3D szerkezete [5] a várakozásnak megfelelően jelentős javulást mutatott a merevség terén, így ezzel a modellel már közelebb

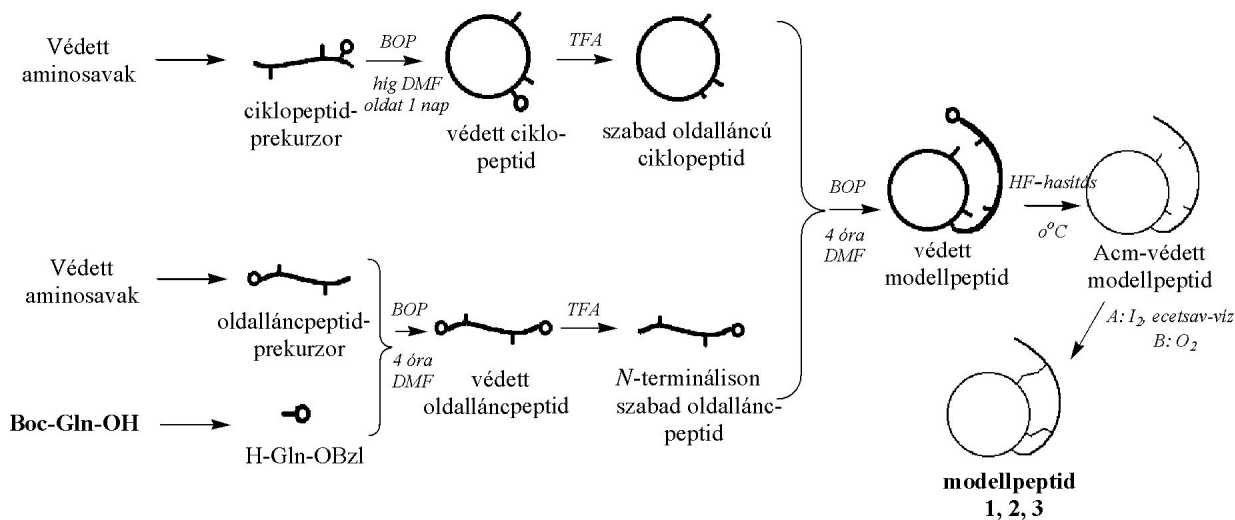


3. ábra Az 1–3 modellpeptidek NMR-spektroszkópiai úton meghatározott térszerkezetének összehasonlítása az SGCI térszerkezetével.

jutottunk az SGCI kedvező konformációjához és dinamikai tulajdonságaihoz (3. ábra).

A projekt kivitelezésének leginkább időigényes részét a három modellpeptid szintézise jelentette, amire hatékony, konvergens peptidszintézist dolgoztunk ki [4]. A kiindulási peptidfragmenseket *o*-klór-tritil-gyantán [8] szintetizáltuk Fmoc technikával, ortogonális oldalláncvédelem és HBTU kapcsolószer alkalmazásával. A lehasított, védett peptidszarmazékokat oldatfázisban alakítottuk to-

vább, majd tisztítottuk. A szilárd fázison szintetizált ciklopeptid-prekuzort híg oldatban ciklizáltuk BOP reagens segítségével, majd a Glu oldalláncának γ -aminocsoportját – ahova az oldalláncpeptidet kapcsolni kívántuk – TFA-hasítással tettük szabaddá. A szintén szilárd fázison szintetizált oldalláncpeptid-prekuzort egy C-terminálison védett Gln résszel kapcsoltuk BOP reagens segítségével, végül az *N*-terminális Boc védőcsoportot TFA reagenssel hasítottuk. Az oldalláncra szabad ciklopeptidet és az *N*-terminálison szabad oldalláncpeptidet ugyancsak BOP reagenssel kapcsoltuk, majd HF reagenssel az összes védőcsoportot lehasítottuk a Cys aminosavat védő acetamidometil védőcsoport kivételével, és végül kialakítottuk a diszulfidhidakat. Az 1 és 2 modellpeptid esetében ezt jódreagens felhasználásával értük el, míg a 3 modellpeptidnél – a védőcsoport eltávolítása után – a levegő oxigénje bizonyult alkalmasnak a diszulfidhíd létesítésére. A szintézis talán legnehezebb része éppen a diszulfidhidak kialakítása volt. Mivel a 3 modellpeptid esetében nem szelektív módszer alkalmazására került sor, ezért elvileg többféle, más-más Cys-részeket összekötő diszulfidhíd is kialakulhatott. NMR-spektroszkópiai úton igazoltuk, hogy a diszulfidhidak az SGCI szerkezetére is jellemző módon jöttek létre. A modellpeptidek szintézisének menetét vázlatosan a 4. ábra foglalja össze. A közti és végtermékek vizsgálatában analitikai módszerként a HPLC, MS, aminosav-analízis és NMR-spektroszkópia került felhasználásra.

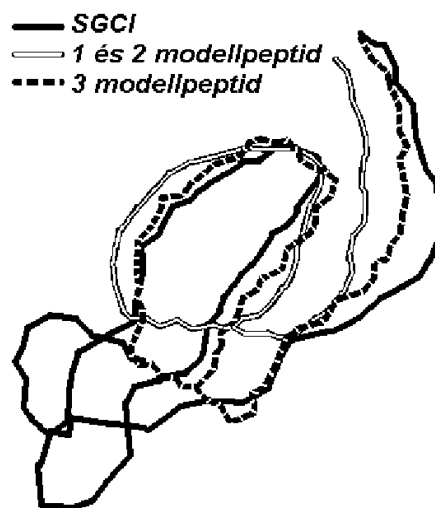


4. ábra A modellpeptidek szintézisének vázlata

A biológiai és sztereokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a 3 modellpeptid térszerkezete és inhibíciós hatása már összemérhető az SGCI peptidével, így elsősorban e két molekulát volt érdemes további összehasonlító vizsgálatoknak alávetni, hogy közelebb juthassunk a hatékony gátlást kiváltó okok megismeréséhez. Már az előzőek során is felvetődött viszont, hogy az 1 és 2 modellpeptid esetében a határozott szerkezet hiánya okozza, hogy a gátlás elmarad. Ha e kisebb modellpeptidek NMR-szerkezetét rávetítjük az SGCI kétdimenziós vetületére, akkor láthatjuk, hogy a ciklopeptidgyűrű nagy részét kitevő régió, az ún. stabilizáló szakasz szerkezete szétesett és nem képes a megfelelő térállásban tartani az aktív centrumot (5. ábra). A nagyobb molekulájú 3 modellpeptid esetében azonban a „javulás” egyértelműen látható, a stabilizáló szakaszt már az SGCI-hez hasonló, határozott szerkezet jellemzi, és az aktív centrumba kötődő peptidszakasz térbeli helyzete is kezd hasonlóná válni. A modellek NMR-szerkezetei [5] azt sugallják, hogy adott esetben ez a stabilizáló szakasz képes biztosítani a molekula számára az inhibíciós aktivitáshoz szükséges konformáció kialakítását és fenntartását, ideértve a hatásért felelős P1-P1' pozíciónak, tágabb értelemben a kötőhuroknak megfelelő szerkezeti részletet is. Az eddigi eredmények közelebről tehát arra utalnak, hogy a gátlás annál hatékonyabb, minél merevebb az inhibitor aktív centrumát magában foglaló kötőhurok. Ezt a következtetést támasztja alá az összehasonlítás is, amelyben a modellek biológiai aktivitására vonatkozó adatokat összevetjük a modellekben lévő kötőhurok mozgékonyosságának Å egységben kifejezett szórási adataival, melyeket az NMR-spektroszkópia módszerével határoztunk meg.

Molekuladinamikai számítások

További szerkezeti információk szerzése érdekében molekuladinamikai (MD) számításokat végeztünk [3,9] az 1–3 modellpeptidekre és az SGCI molekulára vonatkozóan, amivel meghatároztuk a molekulákban a mozgékony és kevésbé mozgékony régiókat. Az MD szimuláció alkalmazása során a molekulákat vákuumban, továbbá a valóságot jobban megközelítő explicit víz oldószer jelenlétében is vizsgáltuk. A számítások feldolgozásakor az egyes atomok mozgását felbontottuk egy gyors (>1000 m/s) és egy – a mozgékonyt másfélszer



5. ábra A modellpeptidek és az SGCI stabilizáló szakaszának összehasonlítása NMR-szerkezetük alapján.

jellemző – lassabb (néhány 10 m/s) mozgásra. Vizsgált molekuláink dinamikáját elsősorban az egyes aminosavrészek α -szénatomjainak Å egységben kifejezett mozgékonyosságával jellemeztük. Egyértelműen megállapítható, hogy inhibitoroként az SGCI peptidnél kevésbé hatékony 3 modellpeptidben mind a 6–19 stabilizáló szakasz, mind pedig a P1-P1' pozíciót (30–31) magában foglaló kötőhurok (28–32) mozgékonyága nagyobb, mint az eredeti inhibitoré. Különösen feltűnő, hogy a 3 modellpeptid stabilizáló szakasza mennyire mozgékony az SGCI molekulához képest. A várakozásnak megfelelően ugyanakkor az 1 és 2 modellpeptidek mozgékonyága az említett molekulákhoz képest szignifikánsan nagyobb.

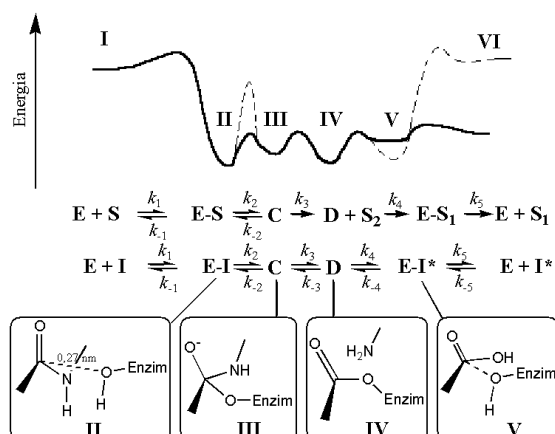
Felmerült az igénye annak, hogy a 3 modellpeptid szerkezetét úgy kellene „átszabni”, hogy stabilizáló szakasza merevebb szerkezetű legyen. Az eredeti elképzelés szerint az 1–3 modellpeptidek ciklopeptidrésszében a beiktatott és a gyűrűt összefogó Gly-Gly részletnek kellett volna biztosítani az eredeti SGCI molekula β -redőjének és hidrogénkötéseinek kialakulását, de ez az NMR és MD szerkezetvizsgálatok szerint nem sikerült kellő mértékben. Ezért ezt a mesterségesen beiktatott Gly-Glyhidat megpróbáltuk korrigálni. Az elgondolás az volt, ha egy β -csavart képző részt illesztünk a Gly-Gly helyére, akkor ez kialakítja a szétesett β -redőt, és a stabilizáló szakasz már merevebb lesz, ezért jobban fog működni. Mivel β -csavart képző dipeptidként a Pro-Ala, Pro-Thr és Val-Thr ismeretes,

a 3 modellpeptidnek mindhárom származékát megalkottuk számítógépen a Gly-Gly részletek helyettesítése útján, és az így nyert új modellpeptidekkel (3a–3c) ugyancsak MD számításokat végeztünk [9]. Mindhárom esetben mind a ciklopeptidrés, mind a kötőhurok merevsége nőtt, és a Val-Thr egységet tartalmazó 3c modellpeptid esetén tapasztaltuk a legkedvezőbb változást. Itt a β -redő távolsága enyhén növekedett ugyan, de az aminosavak mozgékonyásával kapcsolatos szórás erősen csökkent, és szinte teljesen megegyezett az SGCI-analóg szórásadataival. Ez az eredmény a jövőre nézve újrainvitalást jelent a laboratóriumba.

Az MD számítások felvilágosítást adnak az egyes molekulaszakaszok egymáshoz viszonyított elmozdulásairól is. Így pl. az SGCI és a 3 modellpeptid kötőhurka a várakozásnak megfelelően nem ír le külön trajektóriát. Ugyanakkor az 1 és 2 modellpeptid viszonylag merevnek talált részei láthatóan egymástól függetlenül mozognak, tehát nincs közöttük kölcsönhatás, ami további magyarázatot ad a gátló hatás elmaradására. A mozgékonyagra nézve fontos információ nyerhető a kötőhurkot alkotó Thr²⁹–Ala³² aminosavak Φ és Ψ torziószögeinek változékonyságából is, amely jól jellemzi a konformációs stabilitást. Figyelmünket az enzim aktív centrumába kötődő P1 és P1' aminosavakra fordítva, MD számítások útján megállapítottuk, hogy az SGCI peptidnél a torziószögeket illetően nincs konformációs változás. Ez azt jelzi, hogy az aktív centrum torziószögeinek változásához nagy energiagát tartozik, ami feltehetően a vele szemben álló stabilizáló szakasszal áll összefüggésben. A szubsztrátként viselkedő 1 és 2 modellpeptid esetében a P1 és P1' aminosavak konformációja jelentősen változik a szimuláció alatt. A 3 modellpeptidben a torziószögek szórása jelentősen csökken ugyan, de az SGCI adataihoz képest azért szignifikánsan nagyobb.

Ab initio kvantumkémiai számítások

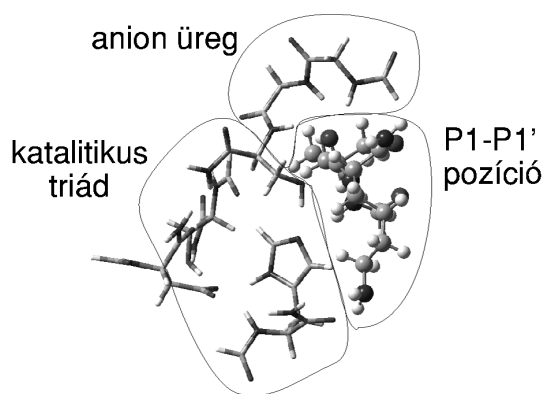
A kötőhurok merevsége és az inhibíciós aktivitás közti összefüggést a továbbiakban *ab initio* kvantumkémiai számításokkal [3,10] vizsgáltuk. Érdemes összehasonlítani a szerin-proteázok működését egy inhibitor és egy szubsztrát alkalmazása esetében. A 6. ábra egy inhibitor és egy szubsztrát enzimkatalizált hasítási reakciójának jól ismert mechanizmusát mutatja vázlatosan. Irodalmi ada-



6. ábra Egy inhibitor és egy szubsztrát enzimkatalizált hasítási reakciójának vázlatos mechanizmusa. Felül látható a reakció potenciálisenergia-diagramja (a vastag vonal a szubsztrát, a szaggatott vékony vonal az inhibitor reakcióútjára vonatkozik). **I:** kimotripszin és szubsztrát/inhibitor külön-külön; **II:** enzim–szubsztrát/inhibitor komplex; **III:** tetraédes intermedier; **IV:** acil-enzim komplex; **V:** enzim és elhasadt szubsztrát/inhibitor komplexe; **VI:** enzim és elhasadt szubsztrát/inhibitor külön-külön. Középen szerepel a reakció vázlatos menete. E = enzim, S = szubsztrát, C = tetraédes intermedier, D = acil-enzim komplex, S₁, S₂ = az elhasadt szubsztrát fragmentjei, I = inhibitor, I* = elhasadt inhibitor; k = sebességi együttható. Alul tüntettük fel egyes intermedierek (II–V) vázlatos szerkezetét.

tok [10,11] szerint az inhibitor és az enzim kölcsönhatása a II komplex kialakulásához vezet, azaz további reakció el sem kezdődik. Ehhez sebességmeghatározó lépésként a II→III reakciónak, azaz a tetraédes komplex kialakulásának kellene bekövetkeznie. Ha az ehhez tartozó energiagát viszonylag magas egy szubsztrátum reakciójához képest, akkor a hasadás nem vagy csak igen lassan megy végbe.

A fentiekből kiindulva *ab initio* kvantumkémiai számításokkal kívántuk ellenőrizni, hogy a tetraédes komplex kialakulásához vezető sebességmeghatározó lépésnek valóban döntő jelentősége van-e a gátló hatás kialakulásában [12]. A PDB adatbázisban található PMP-C–kimotripszin enzim–inhibitor komplex röntgenszerkezete [10], valamint korábbi elemzések [11] alapján egy modellt készítettünk, amely megjeleníti mind az enzim aktív centrumát, mind az inhibitor P1-P1' pozícióját (7. ábra). Számításaink első részében a P1-P1' aminosavak ϕ és ψ torziószögei szabadon változhattak (így modelleztük a szubsztrát viselkedését), míg a második esetben ezeket mereven tar-



7. ábra Inhibitorok P1-P1' pozíciójának illeszkedése a kimo-tripszin aktív centrumába.

tottuk (így modelleztük a merev konformációjú inhibitor viselkedését). Mindkét esetben ugyanazt a kísérletet végeztük el, azaz a Ser O-atomját közelítettük a P1 aminosav karbonil-szénatomjához, a tetraédes komplex kialakítása érdekében. A számítások eredménye szerint az ugyanolyan körülmények között lejátszódó két reakció aktiválási energiája között 25 kJ/mol energiakülönbség van, a rögzített torziószögű modellből tehát ennyivel nehezebben képződik tetraédes intermedier. Mindez meggyőzően bizonyítja, hogy a rögzített konformációjú inhibitoroknál azért nem kerül sor a viszonylag merev konformációjú P1-P1' részleg hasadására, mert a tetraédes intermedier sebességmeghatározó lépést jelentő kialakulása fokozottan energiaigényes.

Érdeemes végezetül egy irodalmi példa elemzésével az elmondottakat más oldalról is megvilágítani. Laskowski és munkatársai az általunk vizsgált SGCI gátlószerek egyik szerkezeti rokonának, a pulyka ovomucid doménjének a hasadási reakcióját az idő függvényében követték [12]. Ha feltételezzük, hogy itt az inhibitor–enzim komplex unimolekulás átalakulása tetraédes intemedierré a sebességmeghatározó lépés, akkor e rendkívül lassú, több napig követett reakció kinetikai görbéjéből a $k_1 = 0,001326$ 1/s sebességi együtthatót határozhatjuk meg. Ha elfogadjuk továbbá *ab initio* számításaink eredményét, nevezetesen azt, hogy a reakciók aktiválási energiája között 25 kJ/mol különbség van attól függően, hogy modellünk P1-P1' részlegének konformációja rögzített-e avagy sem, akkor ebből ki lehet számítani, hogy a szabad és a rögzített torziószögekkel rendelkező modellek hasadási sebessége között elvileg 27550-szeres kü-

lönbségnek kell lennie. Ha az ovomucid domén inhibitor hasadását jellemző $k_1 = 0,001326$ 1/s sebességi együtthatót megszorozzuk 27550-nel, akkor egy feltételezett, szabad torziószögű (tehát szubsztrátként viselkedő) modell sebességi együtthatójára a $k_1 = 35,53$ 1/s érték adódik. Ha ezt az adatot összevetjük azokkal az irodalomból jól ismert $k_1 = 10$ – 100 1/s közötti értékekkel, amelyek az aktív helyen Leu aminosavat tartalmazó szubsztrátok hasadási sebességét jellemzik, akkor megállapíthatjuk, hogy az egyezés nagyságrendileg helyes, ami igen jó eredmény. Az *ab initio* kvantumkémiai számításaink eredményességét bizonyítja, hogy az enzim és az inhibitor szerkezetének kb. 98%-át elhagyva is képesek voltunk modellezni és értelmezni az inhibitor és a szubsztrát viselkedése közötti különbséget.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Gráf László egyetemi tanárnak az SGCI peptiddel kapcsolatos hasznos konzultációkért, Patthy András tud. főmunkatársnak a biológiai vizsgálatok elvégzéséért, Gáspári Zoltán tud. segédmunkatársnak az NMR szerkezetvizsgálatokban való közreműködésért és a kézirat áttanulmányozásával kapcsolatos észrevételeiért, valamint Hudáky Péter doktorjelöltnek a közösen végzett kvantumkémiai számításokért. Köszönet illeti az MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Bizottágát és az MKE Szerves és Gyógyszerkémiai Szakosztályát azért a lehetőségért, hogy e dolgozat anyagát Mucsi Zoltán 2003. febr. 28-án Bruckner-termi előadás keretében ismertethette.

Irodalomjegyzék

- [1] Malik, Z., Amir, S., Pál, G., Buzás, Zs., Várallyay, É., Antal, J., Szilágyi, Z., Vékey, K., Asbóth, B., Patthy, A., Gráf L. (1999) *Biochem. Biophys. Acta*, **1434**: 143–150.
- [2] Gáspári, Z., Patthy, A., Gráf, L., Perczel, A. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**: 527–537.
- [3] Mucsi, Z. (2002) Proteáz inhibitorok modellezése, szintézise és szerkezetvizsgálata. Doktori értekezés, Budapest, ELTE-TTK Kémiai Doktori Iskola, pp. 1–101.
- [4] Mucsi, Z., Perczel, A., Orosz, G. (2002) *J. Pept. Sci.* **8**: 643–655.
- [5] Mucsi, Z., Gáspári, Z., Perczel, A. (2003) *Protein Engineering*, közlésre beküldve.
- [6] Mucsi, Z., Bódi, Á., Gráf, L., Perczel, A., Patthy, A., Orosz, G. (2001) In: *Peptides 2000* (Martinez, J., Fehrentz, J.-A. Eds) (EDK, Paris, France) pp. 433–434.
- [7] Mucsi, Z., Bódi, Á., Gráf, L., Patthy, A., Perczel, A., Orosz, G. (2001) *Amino Acids*, **21**: 29–30.
- [8] Orosz, G., Kiss, P.L. (1998) *Tetrahedron Letters*, **39**: 3241–3242.
- [9] Mucsi, Z., Gáspári, Z., Perczel, A. (2003) *J. Mol. Struct. Theochem*, közlésre beküldve.
- [10] Roussel, A., Mathieu, Z., Dobbhs, A., Luu, B., Carnbillau, C., Kellenberger, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 38893–38898.
- [11] Laskowski, M., Qasim, M.A. (2000) *Biochem. Biophys. Acta* **1477**: 324–337.
- [12] Hudáky, P., Mucsi, Z., Gáspári, Z., Perczel, A. (2003), előkészületben.

Ultraszenzitív nukleinsav-detektálás gélben és oldatban

A *Molecular Probes* cég kiváló festékeit már évek óta forgalmazza a Bio-Science Kft. Talán a legszélesebb körben alkalmazottak ezek közül a különböző nukleinsavfestékek. A SYBR® *Gold* a legérzékenyebb fluoreszcenciás festék *dsDNS*, *ssDNS* és RNS detektálására natív és denaturáló gélben egyaránt: 300 nm hullámhosszú transzilluminátort használva csíkonként már 25 pg DNS is kimutatható. Az etidium-bromidét meghaladó érzékenysége még szembeötlőbb denaturáló karbamid-, glioxal- és formaldehid-alapú gélben. A festék nem zavarja a restriktív endonukleáz hasítást sem, illetve etanolos kicsapás során jól elkülöníthető a DNS-től.

A SYBR® *Green I* nagyobb affinitással rendelkezik a *dsDNS*-, mint az *ssDNS*- és az RNS-molekulákhoz. Maga a festék kisebb háttér-fluoreszcenciát okoz a gélben, mint a SYBR® *Gold*. A minden molekuláris biológiai laboratóriumban megtalálható 300 nm hullámhosszú UV-transzilluminátorral csíkonként már 60 pg *dsDNS* is detektálható. A reagens gyorsan penetrál a gélbe, és nem igényel festékmentesítést. A DNS-molekulákhoz mutatott nagy affinitása miatt már az elektroforézis előtt hozzáadható a mintához. Abszorpciós tulajdonságai miatt argonionlézer-alapú detektálásokra is jól alkalmazható. Előnyös tulajdonságai miatt a QPCR egyik detektálási módszere is ezt a festéket használja. Végül, de nem utolsósorban további előnyeként említhető, hogy az Ames-teszt alapján jóval kevésbé mutagén, mint az etidium-bromid. A SYBR® *Green II* – viszont legnagyobb affinitást az RNS iránt mutat, így ezt RNS-gélek festésére használják.

A SYBR Green festék további alkalmazását láthatjuk a cég Electrophoretic Mobility Shift Assay kitjében, ahol az akrilamid gélt először SYBR Green EMSA reagenssel festjük, majd a fehérje komponenst SYPRO Ruby segítségével tesszük láthatóvá. Az eddigi EMSA jelölési technikákhoz képest előny, hogy a nukleinsavat futtatás után festjük és nem előzetesen, ahol a nukleinsavhoz kötött festék molekula esetleg zavarhatja a fehérje megkötését.

A cég új fejlesztése a SYBR *Safe*™, ami az etidium-bromidnál kétszer intenzívebb festést tesz lehetővé. A használatra kész oldat 0,5x TBE-pufferrel készült, így az agarózgél rögtön ezzel a reagensoldattal

készíthető el. A hőkezelés nem csökkenti a festék hatékonyságát. Természetesen futtatás utáni festésre is alkalmas. A festékoldat 6 hónapig tárolható szobahőmérsékleten, sötétített üvegben. Mutagenitása három emlős-sejtvonalon, illetve baktériumtörzsekkel végzett Ames-tesztben alacsony értékeket mutatott. Remélhető, hogy ez az új termék sok labor számára helyettesíteni tudja az etidium-bromidos festést.

Gyakorta szükséges feladat, hogy különböző nukleinsavoldatok koncentrációját megállapítsuk, amire általában az UV-abszorpciós módszert használják. Amint köztudott azonban, e módszerrel nem tudunk különbséget tenni az egyes nukleinsavtípusok között. A fenti, gélben használható festékeknek megfelelő, de csak oldatban használható megfelelőik a *PicoGreen*®, a *RiboGreen*™ és az *OliGreen*® reagenssek. Közülük a legtöbbet használt a *PicoGreen*® ami *dsDNS* mérésére alkalmas. A szabad festék szinte nem is fluoreszcens, viszont *dsDNS*-hez kötődve mintegy ezerszeresre nő a fluoreszcenciás intenzitás. A lineáris tartomány 25 pg/ml koncentrációtól 1 µg/ml koncentrációig terjed. A *RiboGreen*™ RNS, míg az *OliGreen*® *ssDNS* mennyiségi meghatározására (kvantifikálására) alkalmas. Ez utóbbi lehet szekvenálási és amplifikációs primer, hibridizációs próba, antiszenz oligonukleotid, fág *ssDNS*. Mindhárom festéket csupán össze kell keverni a mintával, és 2–5 perc inkubálás után már elvégezhető a mérés. A cég palettáján további termékek találhatók a különféle fehérjégek és -blotok nagy érzékenységgű festésére.

Holló Róbert



BIO-SCIENCE

1119 Budapest, Andor u. 47-49.
Tel.: 463-5077, Fax: 463-5261
E-mail: bio-sci@bio-science.hu
www.bio-science.hu

Humán placenta protein 20 (PP20) / tiamin-pirofoszfokináz (hTPK): szerkezettől a funkcióig

Human placental protein 20 (PP20) / thiamin pyrophosphokinase: from structure to function

Barna László¹, Bellyei Szabolcs², Szigeti András², Boronkai Árpád², Szabó Zoltán², Ohmacht Róbert², Janáky Tamás³, Than Nándor Gábor^{2,4}, Szilágyi András¹, Závodszy Péter¹, Sümegi Balázs^{2,5}

¹ Magyar Tudományos Akadémia, Biológiai Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest

² Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Pécs

³ Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet, Szeged

⁴ Semmelweis Egyetem, ÁOK, I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

⁵ Magyar Tudományos Akadémia, Akadémiai Munkacsoport a Mitokondriális Funkciók és Betegségek Kutatására, Pécs

Összefoglalás

A humán placenta protein 20 (PP20) méhlepényből izolált, két azonos alegységből álló, 52 kD molekulatömegű fehérje, melyből a placenta terminusban mintegy 0,5 mg mennyiséget tartalmaz. Kiegészítő DNS-molekuláit humán lepényi cDNS-könyvtárból izoláltuk. A kódolt 27 kD molekulatömegű fehérje 243 aminosavból áll, szekvenciája azonos a humán tiamin-pirofoszfokináz (hTPK) alegységével, legközelebbi homológja az egér TPK. A PP20/hTPK gén a 7. kromoszómán (7q34-7q36) helyezkedik el. Western-blot módszerrel humán magzati és felnőtt-szövetekben detektáltuk a hTPK enzimet, amely kimutatható volt tumorsejtekben és -szövetekben egyaránt. Mikroszkópiás technikával a sincytiotrofoblasztok citoplazmájának diffúz, a citotrofoblasztok gyenge jelölődését láthattuk. A hTPK szerkezetét homológiamodellezéssel határoztuk meg, a hTPK tiaminkötőhelye egyezett az egér TPK tiaminkötőhelyével, de nagy különbségeket mutatott a bakteriális és fungális enzimekével. A hTPK funkcionális analizisét elektropray ionizációs tömegspektrográfias módszerrel végeztük, amely igazolta a tisztított és a rekombináns fehérje tiamin-pirofoszfokináz enzimaktivitását.

Barna, L.¹, Bellyei, Sz.², Szigeti, A.², Boronkai, Á.², Szabó, Z.², Ohmacht, R.², Janáky, T.³, Than, N.G.^{2,4}, Szilágyi, A.¹, Závodszy, P.¹, Sümegi, B.^{2,5}

¹ Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Budapest

² Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Pécs

³ Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Szeged

⁴ First Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Budapest

⁵ Research Group for Mitochondrial Function and Diseases, Hungarian Academy of Sciences, Pécs

Summary

The 52 kD human placental protein 20 (PP20) composed of two identical subunits was isolated from term placenta, which contains 0.5 mg of this protein. Its cDNA was isolated from a human placental cDNA library, which encode a 243 amino acid, 27 kD protein identical with the human thiamin pyrophosphokinase (hTPK) subunit. The murine hTPK was found to be its closest homolog. The PP20/hTPK gene was localized on the chromosome 7 (7q34-7q36). The presence of the protein in human fetal and adult tissues, tumors and tumor cell lines was proved by Western-blot. By imaging methods, diffuse labeling in the cytoplasm of the syncytiotrophoblasts and weak staining of the cytotrophoblasts were seen. The homology based model of the enzyme was constructed using the X-ray structure of the highly homologous murine TPK. The thiamin binding site of the human enzyme was identical with that of the murine protein, while significantly different to the bacterial or fungal ones. Functional analysis of hTPK by mass spectrometry with electro-spray ionization proved the TPK activity of both the purified and recombinant protein.

Bevezetés

A lepényi fehérjék növekedett mennyiségben szintetizálódnak terhesség alatt, és fontos szerepet játszanak a magzat és a méhlepény kialakulásában, fejlődésében, valamint a terhesség fenntartásában. Szülés után géneik represszálódnak, de újból kifejeződhetnek különböző kóros állapotokban [1]. A pécsi kutatócsoport számos lepényi fehérjét izolált, szekvenált és molekuláris biológiai módszerekkel jellemzett az elmúlt évek során [2–5]. A placenta protein 20 (PP20) fehérjét 1985-ben izolálták és jellemezték fizikokémiai tulajdonságait. Két 27 kD molekulatömegű alegységből áll, szénhidrátartalma 3%, átlagosan 0,5 mg van az érett méhlepényben [6]. Korábbi immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a PP20 főleg a szincitiotrofoblasztok, citotrofoblasztok, illetve a chorionális trofoblasztok citoplazmájában található korai méhlepényben. Érett placentában a fehérje a villózus tér Hofbauer-szerű sejteinek citoplazmájában és a chorionális trofoblasztokban helyezkedik el [7]. Mivel a komplex proteomikai vizsgálatokhoz nemcsak a fehérjék pontos funkcionális tulajdonságait, hanem térszer-

kezeti tulajdonságait is elengedhetetlen ismerni, és a pécsi, valamint budapesti munkacsoportok korábban már folytattak ez irányú vizsgálatokat [8–11], a PP20 / humán tiamin-pirofoszfokináz (hTPK) térszerkezeti vizsgálatait együttműködésben végeztük. A hTPK térszerkezetét homológia-modellezéssel, az egér TPK – mint az ismert legközelebbi homológ fehérje – atomi koordinátáinak felhasználásával határoztuk meg. Különböző fajokból származó TPK-fehérjék szekvenációsszerendezésének analízise alapján megállapítható volt, hogy a humán TPK enzim aktív helye szignifikánsan különbözik több alacsonyabb rendű faj enzimének aktív helyétől, mely tény felvetette szelektív inhibitorok (gyógyszerek) tervezésének lehetőségét.

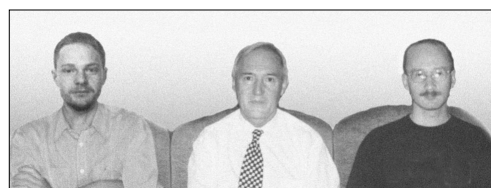
Anyagok és módszerek

Immunológiai vizsgálatainkhoz méhlepény mellett egészséges magzati és felnőtt-, illetve tumoros szöveteket, citológiai vizsgálatainkhoz onkogén (HeLa), hepatoblasztóma (HepG2), hasnyálmirigy-karcinóma (Panc1) és nem malignus embriohepatikus epithelialis (WRL-68) sejtvonalakat használtunk.



A Pécsi Tudományegyetem ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében, a Női Klinikával karöltve, három évtizede kezdődtek a nemzetközi együttműködésben végzett terhességi, méhlepényi, valamint endometriális eredetű fehérjék alap- és alkalmazott kutatásai. Munkacsoportunk az elmúlt öt évben 7 szolubilis lepényi fehérje (PP13/galectin-13, PP17a és PP17b/sandrin A és B, PP18a és PP18b/elágazó láncú aminosztransferáz, PP20/hTPK, PP25) cDNS-ét izolálta, illetve a fehérjék és géneik komplex genomikai és proteomikai analízisét végezte. A cikk szerzői (balról jobbra): **Szigeti András** PhD-hallgató, orvos; **Bellyei Szabolcs** PhD-hallgató, orvos; **Than Nándor Gábor** PhD, orvos, a placenta protein munkacsoport vezetője; **Sümegei Balázs** az MTA doktora, biokémikus, tanszékvezető professzor, a molekuláris biológiai munkacsoport vezetője; **Ohmacht Róbert** az MTA doktora, vegyész, a folyadékromatográfiás kutatások vezetője, egyetemi docens; **Szabó Zoltán** PhD-hallgató, vegyész; **Boronkai Árpád** PhD-hallgató, orvos.

Az MTA Enzimológiai Intézetében működik a Szerkezeti Biokémia Csoport Závodszy Péter vezetésével. Munkájuk során a génszabályozás, a fehérjeexpresszió, a számítógépes modellezés és a szerkezetvizsgáló módszerek együttes alkalmazásával keresik az összefüggéseket a fehérjék szerkezete, konformációs stabilitása és az enzimműködés szabályozása között. A jelen munkában **Barna László**, **Závodszy Péter** és **Szilágyi András** (a képen balról jobbra) végezték a tiamin- pirofoszfokináz-szekvenciák (TPK) összehasonlító analízisét, valamint a humán TPK homológia-modellezését és vizsgálatát.



A Szegedi Tudományegyetem ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében **Janáky Tamás** PhD, vegyész, egyetemi docens végezte kollaborációban a PP20/hTPK tömegspektrometriás fehérjeazonosítását.

PP20 cDNS-klónozás és szekvenanciaanalízis

A PP20 cDNS-t lepényi expressziós cDNS-könyvtárból izoláltuk monospecifikus anti-PP20 antitest [6] segítségével. A pozitív plakkokat izoláltuk, majd a λ -fágokat *pBluescript SK*-plazmidba konvertáltuk. A cDNS *sense* és *antisense* láncát ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) automata szekvenálóval analizáltuk.

A PP20 cDNS-szekvenciáját a BLAST [12] és az UCSC Genome Browser adatbázisban különböző kifejeződő szekvenciacímkekhez (EST, *expressed sequence tag*), a LocusLink adatbázisban [13] pedig a humán genomhoz hasonlítottuk. A gén promóter régiójában feltételezett átírásfaktor-kötőhelyeket a *Transfac* Adatbázisban [14] *Patch* algoritmussal elemeztük. A PP20/hTPK és homológjai közötti többszörös aminosavszekvencia-egyeztetést CLUSTALW módszerrel [15] végeztük.

A PP20/hTPK kifejeződése

A PP20 cDNS olvasási keretet (*open reading frame*) PCR eljárással erősítettük ki, a terméket pGEX-4T-1 kifejeződési vektorba klónoztuk és DH5 α -kompetens sejtbe transzformáltuk. A kifejeződést izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk, a fehérjét *Glutathione Sepharose 4B* oszlopon (Amersham Biosciences) tisztítottuk.

Tömegspektrometriás fehérjeazonosítás

A tisztított és rekombináns PP20/hTPK fehérjét gélelektroforetikusan (12%-os SDS-PAGE) különítettük el és Coomassie-reagenssel festettük. A fehérjecsíkokat a gélből kivágtuk, redukáltuk, alkiláltuk, a gélen belül tripszinnel emésztettük [16]. A fehérjéket MALDI-TOF MS peptidterképező és MALDI-PSD tömegspektrometriás szekvenáló segítségével azonosítottuk. A fehérje-tömegterképezést Bruker Reflex IV MALDI-TOF tömegspektrométerrel végeztük. Az adott spektrumban létrejövő monoizotópos tömegek peptidionjelét MS Fit programmal azonosítottuk [17]. A tripszinemésztett peptidionok elsődleges szerkezetét PSD (*post source decay*) módszerű szekvenálással ellenőriztük.

SDS-PAGE / Western-blot, enzimaktivitás / HPLC

10 ng tisztított PP20/hTPK fehérjét, valamint 10-10 μ g lepényi, szövet- és sejtextraktumot gélelektroforetikus (12%-os SDS-PAGE) eljárással különítettük el. Az elválasztott fehérjecsíkokat anti-PP20

antitesttel (*immunoblot*) és ECL kemilumineszcens rendszerrel tettük láthatóvá, a kvantitatív denzitometriás meghatározást Scion Image for Windows szoftver segítségével végeztük.

A tiamin-pirofoszfát elválasztására és tömegspektrometriás detektálására folyadékkromatográfiás módszert dolgoztunk ki. Az elválasztás 5 μ m szemcseátmérőjű, utánszilánizált C₁₈ oszlopon történt, eluensként 0,1 M ammónium-acetát puffer és metanol (95:5) elegyét használtuk a pozitív ion módban alkalmazott elektropray ionizációhoz.

Immunhisztokémia, konfokális immunfluoreszcens mikroszkópia

A formalinnal rögzített, paraffinba ágyazott szövettani metszeteket és sejtenyészetmintákat anti-PP20 antitesttel inkubáltuk, az immunfestést Universal Kit festékreagenssel [18] végeztük. A metszeteket Olympus BX50 fénymikroszkóppal analizáltuk és archiváltuk.

Deparaffinálás után a metszeteket tripszinnel emésztettük, anti-PP20 antitesttel kezeltük, ezután párhuzamosan FITC festékkel jelölt IgG immunreagenssel, valamint DRAQ5 magfestékkel festettük. A sejtfluoreszcenciát Bio-Rad MRC-1024ES konfokális illesztéssel ellátott Nikon Eclipse TE-300 invert-mikroszkóppal vizsgáltuk.

A PP20/hTPK térszerkezetének meghatározása homológiamodellezéssel

Több eljárás között választhatunk, ha egy fehérje térszerkezetét a szekvenciája alapján kívánjuk modellezni. Ha nincs ismert szerkezetű homológ fehérje, akkor az *ab initio* predikciónak nevezett, alapvető fizikai elvekre és adatokra (kötésszögek, kötéshosszak) alapozott eljárást választhatjuk. A *fehérjefeltekeredés* (fold) *felismerési* módszert akkor alkalmazzuk, ha a célfehérjénk szekvenciaazonossága nagyon alacsony (<20%) az ismert szerkezetű fehérjék szekvenciájával. Ilyen esetben a szekvenciánk vizsgálata alapján el kell döntenünk, hogy léteznek-e olyan feltekeredési típusok, amelyek megfelelnek a szekvenciánknak, és ha igen, melyek ezek. Szerencsés esetben, van egy vagy több megfelelő szekvenciaazonosságú (>20%) ismert térszerkezetű rokon (homológ) fehérje, ilyenkor a *homológiamodellezés* gyakorlatához nyúlhatunk. Homológiamodellezés esetén, ha a szekvenciaazonosság >30%, a szerkezetek általában igen nagy hasonlósá-

got mutatnak, 20% és 30% szekvenciaazonosság között a hasonlóság már kérdésessé válik, de előfordul 10% alatti azonosság esetén is jó térszerkezeti hasonlóság. A homológiamodellezés alapvető eljárása a lánctöredékek összeillesztésének módszere, újabban viszont inkább a térbeli kényszerek kielégítésén alapuló eljárásokat alkalmazunk [19]. Az utóbbi algoritmus a referenciaszerkezetek alapján térbeli kényszereket vezet le (pl. atompárok távolsága, atomhármassok szöge stb.), majd a kényszereket egy célfüggvénybe egyesíti. A modellezés során a célfehérjénk véletlenszerű kezdeti konformációjából kiindulva szimulált hőkezeléssel optimalizálja a célfüggvényt.

A hTPK térszerkezetének meghatározására a térbeli kényszerek kielégítésén alapuló homológiamodellezési eljárást használtuk, melyet Modeller [20] programmal Linux munkaállomáson végeztünk. A referenciafehérje kereséséhez BLAST programot [12] használtunk, az egér TPK-tiamin komplex térszerkezetét (1IG3) [21] a *Protein Data Bank* adatbázisból [22] töltöttük le. Mind a PP20/hTPK, mind az egér TPK 243 aminosavból áll, és a legjobb összerendezést hézag beszúrása nélkül kaptuk CLUSTALW módszerrel [15]. Mivel a két fehérje azonossága 89%-nak adódott, és az egér TPK röntgenkristallográfiás térszerkezete 1,9 Å felbontású volt, a homológiamodellezés kritériumai minden vonatkozásban teljesültek. A képek VMD [23] és POV-Ray programokkal készültek.

Eredmények

A PP20 cDNS klónozása és szekvenciaanalízise

Humán lepényi cDNS-könyvtárból négy klónt izoláltunk, amelyek közül a leghosszabb (*GenBank*: AY206415) 2431 bázispárt tartalmazott, az olvasási keretben egy 243 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek molekulatömege 27,265 kD (1. ábra). A PP20 azonosnak bizonyult a hTPK-val (*GenBank*: AAK01351), [24, 25] és nagyfokú homológiát mutatott (89% azonosság, 95% hasonlóság) az egér TPK enzimmel [26].

PP20/hTPK gén lokalizációja, szerkezete és szabályozása

A *GenBank* adatai alapján a humán EST-szekvenciák számos felnőtt- és magzati humánszövetben megtalálhatók voltak, valamint lepényben nagy

```

cggagcagagacacagggcgccgtcccacttgcctccggctcccgggaagcgggggggc
|gacctccgctccggggggc|laaaacctggagggagggagcggcgccgaagctccctc|AGC
CGAGCGCCGAGCGGTGCATCGCCGTAGCTCCCGCAGCTCGCATCTCCAGTCTGTGGCTC
CTACCGCCATTGTgtaatg...0.3kb Intron 1...aatgcagggcCAATATCCGT
ATGGAGCATGCCCTTACCCTGGAGCCCTGCTTCCACTGtactgtatt...5.9kb
M E H A F T P L E P L L S T
Intron 2...tttctctagGGAATTTGAAGTACTGCTTGTAAATCTTAATCAGCCCTTTG
G N L K Y C L V I L N Q P L
GACAACCTTTTCGT CATCTTTGGAACAAAGgtaac...8.2kb Intron 3. tgaagCT
D N Y F R H L W N K
CTTTTAAGGCTGTGCCGATGGAGGTGCCAACCGCTTATGATATCACCGAAGGAGAG
L L R A C A D G G A N R L Y D I T E G E
AGAGAAAGgtatgc...3.4kb Intron 4. tcttccagCTTTTGGCTGAATTCATCAAT
R E S F L P E F I N
GGAGACTTTGATTCTATTAGGCTGAGTCAGAGAAATATGCTACTAAGgt...3.3kb
G D F V D S I R P E V R E Y A T K
aa...2.5kb Intron 5. aatacatagGGATGTGAGCTCATTTCACCTCCTGATCAAGC
G T G T E F R G A T F D G E F D
CACACTGACTTTACTAAGTGCCTTAAATGCTCCAAAGGAAGATCAAGAAAGCTTA
H T D P F T K C L K H L C L K L E E K D L
AAGgtaatat...2.5kb Intron 6. tctgttagCTTGTATGTGATCCTGACATGGAGGC
K V D V I V T L G G
CTTGTGGGCTTTGACAGATTAAGCATCTGTGAATCCTTGTCCAGGCTACTAC
L A G R F D Q I M A S V N T L F Q A T H
ATCACTCCTTTCAAATTAATAATCCAGAGGAATGCTGATCTACCTGCTCAACCA
I T P F P I I I I Q E E S L I Y L L Q P
gtgagt...4.3kb Intron 7. tctcctcagGAAAGCACAGGTTGCATGTAGCACT
G K H R L H V D T
GAAATGGAGGTTGATGGTGTGGCTTATTCTCTGGAACAGCTTGTATCAGGTTACA
G M E G D W C G L I P V G Q P C M Q V T
ACCAAGGCTCAAGTGAACCTCAgtaat...9.5kb Intron 8. atttctctcAG
T T G L K W N L
CAATGATGTGCTTGTGGAACTTGGTCACTCTCCAATACTACGAGGGGTCTG
T N D V L A F G T L V S T S N T Y D G S
GTGTGTGCACTGTGGAACTGACCACTCCTCTGGAACAGCTGACCAATCAAAAGTAAAC
G V V T V E T D H P L L M T H A I K S *
CTGTGACTGGCATCCATAAGTGTGCCTGCTATCTCATTTCTCAACAGTTCATTTG
TCAAAGAAAGCATCACCTGGGTTTGCAAGAACTTAAACCTCTAGGGGAGCCGCACT
CATCAACACCAAATGGAGAAAGCTGTGAGAGGAACTTAAACATAAAATTTGATTCG
TTTCTGACATACCTTGAAGTAAAGTGTGGTTCATCCAGAAAGTATGATATATAC
AGAAAATGAGTTTCTTATGGGATACATGATCTCATATACAGAGGCTAACTCBA
AGCTGGCTTCTCATCCCACTGTGATTTACCAAGTTCGGACCTTTCTCTAGCT
GTAAAATGGAGCGTGGACTGATGGTCTGAGGTTCTTCCACACTGAAATCTTAA
ATATGACACTTAGCACTATAGGGCTGATTAACACACAGTATCTGACTGCTTAAAC
AACCTGGTGCATGAAATGATTCACCTTCTTTGAAAGAACCATCTCTATCTTCT
TTCACCTTCTCTGTTTTATGAAACCAACTGTGACATACAAACATGATGAAAGGTA
ACCTGTCCAACTGTTTTATGACAACTCCCTATGTTGCTATAAGAAAAGTGAAGTA
ACTGTTTCTTCTGGTGTATGACAGTGTGAGACTCAGGTTGTCTGTAGAGATGAAAG
GAGCAGTGGCCGCGTGTATGTGGCATTAAAGAGCAGTGGCCCATGTGACTGTGGCAT
TTCGCACTTTCTTACTTTCTGCTTGAACGGAGTGGGCTTAGCTATGTTCTCATC
TCACTTCTGAGACTAGTATATATCTTACTAGAAATATATCAATATATATAAAA
GAAATATATCTGTGATTTAAAATTTGGTACCAAGAAAGTGCATGTTCTGTGGCTGA
AAATGTACAGCTGTAAATAATGGATACTTATCAAAAAGGaatatagtttccgta
    
```

1. ábra A PP20/hTPK gén és fehérje szekvenciái. A PP20/hTPK gén 9 exonja fékövér betűvel, a 8 intron és az 5' illetve 3' át nem íródó régiók kis dőlt betűvel, a konszenzus GT/AG hasítóhelyek aláhúzottan láthatók. A 9-es és a 3-as exonban a start (AUG) és stop (TAA) kodonok inverzen, szürke háttérrel vannak feltüntetve. A kétszeresen aláhúzott TATA-box-szerű szekvencia (-38), az iniciáló és a szabályozó (downstream promoter) elemek (DPE, +38) szerepet játszhatnak a transzkripció iniciációjában. A képen az SP-1 (árnyékolva) és a GCF (keretezett) átírási faktorok GC-gazdag köthelyeit, illetve a poliadenilációs szignált (keretezett) is jelöltük. A PP20/hTPK aminosavszekvenciája fekete háttérrel látható.

menyiségben expresszáldottak. A 384 kb hosszú PP20/hTPK gén a 7. kromoszóma q34-q36 részére lokalizálódott, 9 exont tartalmazott [10,11] (ellentétben a korábban publikált 8 exonos értékkel [24,25]). A promóter TATA-box-szerű szekvenciát és iniciáló elemet (Inr) tartalmazott, a transzkripció iniciálásában pedig szerepet játszhat még a szabályozó (downstream promoter) elem (DPE; +38), valamint GC-ben gazdag SP-1 és GCF köthelyek is (1. ábra). A promóter régió 1 kb méretű darabjának analízise

során számos átírástörötör-kötőhelyet (AP-1, AP-2, SP-1, C-Myb, ISGF-3, STAT-1 és SAT-3) találtunk, melyek a fehérje ubiquiter expresszióját biztosíthatják (AP-1, AP-2, SP-1), valamint szerepük lehet a sejtosztódás és -differenciálódás szabályozásában is.

A PP20 és a hTPK azonosítása, a PP20/hTPK kifejeződése és lokalizációja

A tisztított és a rekombináns PP20 gélektroforetikus (SDS-PAGE) futtatása során Coomassie-festéssel két fehérjét (27 és 54 kD) detektáltunk, mint azt korábban már Bohn és Winckler is leírta [6]. A gélből mindkét csíkot kivágva MALDI-TOF MS peptidterképezést és MALDI-PSD MS szekvenálást végeztünk. Az adatok alapján a két protein egyaránt hTPK fehérjének bizonyult, melyből igazolódott, hogy az 54 kD tömegű fehérje az alegység dimerje.

A PP20/hTPK Western-blot eljárásban is két csíkban vándorolt. Immunológiai azonos fehérjéket mutattunk ki nagy mennyiségben humán lepényben, valamint kisebb mennyiségben különböző magzati és felnőtt szövetekben egyaránt, illetve számos tumorszövetben és sejtvonalban is. Érett méhlepényben immunhisztokémiai módszerrel a szincitiotrofoblasztok citoplazmájának diffúz jelölődése és a trofoblasztok, valamint Hofbauer-sejtek gyenge jelölődése volt látható. Az érzékenyebb konfokális mikroszkópiával azonos, de intenzívebb PP20/hTPK jelölődést láttunk (2. ábra).

2. ábra (lásd a színes ábrát a 93. oldalon) *A PP20/hTPK expressziója érett méhlepényben. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket monospecifikus anti-PP20 antitesttel festettük. (A) Az immunhisztokémiai metszeteken (400x) közepes PP20/hTPK expressziót láttunk szincitiotrofoblasztokban (nyilak), gyenge jelölődést pedig a citotrofoblasztokban és a Hofbauer-sejtekben. (B) A konfokális metszeteket párhuzamosan DRAQ5 (piros) magfestékkel is festettük (1000x). Számottevő PP20/hTPK festődés (zöld) figyelhető meg a szincitiotrofoblasztokban, és gyenge festődés a citotrofoblasztokban.*

Korábbi [24] és saját eredményeink szerint is a hTPK egészséges és tumoros szövetekben közel azonos mennyiségben termelődik, így nem osztjuk azon munkacsoportok véleményét, melyek a hTPK kifejeződésének mértékében különbségeket találtak Northern-blot módszerrel, elsősorban here-, vékonybél-, vese-, illetve májszövetekben [25,26]. Saját megfigyeléseink alapján megerősíthetjük,

hogy a hTPK az anyagcsere-folyamatokban jelentős szereppel bír, belső szabályozó ("housekeeping") génként tartható számon.

Korábbi immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy korai humán méhlepényben a PP20 főleg a szincitiotrofoblasztok és citotrofoblasztok citoplazmájába lokalizálódott, majd érett placentában elsősorban a villosus stromában elhelyezkedő Hofbauer-szerű sejtek citoplazmájában, valamint bazális choriontrofoblasztban volt azonosítható. Ezen eredmények alapján feltételezték, hogy a placentában az idő előrehaladtával a villosus szincitiotrofoblasztok elveszthetik a képességüket a PP20 fehérje szintézisére [7]. A pécsi munkacsoport érett lepényben diffúz hTPK jelölődést talált a szincitiotrofoblasztok citoplazmájában, míg az érzékenyebb immunfluoreszcens konfokális ábrázolás hasonló, de intenzívebb hTPK jelölődést mutatott a szincitiotrofoblasztokban. Ez ellentmond az idézett adatoknak [7], de összhangban van a fehérjétől általánosságban megállapított tényekkel.

A PP20/hTPK térszerkezeti modellezése

A hTPK cDNS-szakaszát bakteriális pGEX-4T-1 plazmidba inzertálva a fehérjét jelentős mennyiségben expresszáltuk, de mivel a fehérje térszerkezetének kísérleti meghatározására nem volt mód, jól megalapozott modellező eljáráshoz folyamodhattunk. A homológiamodellezést Modeller [20] programmal végeztük, referenciafehérjeként az egér TPK térszerkezetét használtuk. Összesen 50 modellváltozat készült, melyekhez tartozó célfüggvényértékeket vizsgálva határoztuk meg a végleges modellt. Az 50 modell mindegyike különböző véletlenszerű térszerkezeti elrendeződésből indult ki, de hasonló végeredményt adott, így nem volt szükséges további modellszerkezeteket előállítani. Minthogy az egér TPK-szerkezet (PDB: 1IG3) alapján épített homológiamodell kielégítette a térbeli kényszereket, és szekvenciaazonossága igen magas fokú (89%) volt, a hTPK térszerkezetének gerinclefutása megfelelt az egér TPK-fehérjegerinc térbeli elrendeződésének. A hTPK térszerkezeti modell 1OLY kóddal a PDB adatbázisba került elhelyezésre. A hTPK homodimer, egy alegysége 56 Å hosszú és 31 Å széles hasámban helyezhető el. A szerkezet egy N-terminális α/β -domént és egy C-terminális β -szendvicsdomént tartalmaz. A tiamin-kötőhelyet három láncszakasz alkotja: AI: β -dudor

a Ser216B-Asn219B aminosavak között, AII: egy hurok a Gly 199B-Asn 203B aminosavak között, AIII: az Asp 95A-Asp 100A aminosavak közötti szakasz (3. ábra). A referenciafehérje és a hTPK térszerkezeteinek egymásra illesztett ábráján (4. ábra) jól látszik a két szerkezet nagymértékű hasonlósága és a kötőhelyek egyezése. A hasonlóság mennyiségileg is kifejezhető az egyes atomok helyzetének négyzetes közepes eltéréseivel (*root mean square deviation*, RMSD), mely esetünkben 0,17 Å, ami nagyon hasonló térszerkezetre utal. A feltételezett ATP-kötőhely környezete is megegyezett a két fehérjében, kivéve a 129-es alanin-glicin cserét.

3. ábra (lásd a címlapon) A hTPK homológiamodellezéssel nyert térszerkezetének háromdimenziós ábrázolása. A tiamin az aktív helyen pálcika ábrázolásban látszik. Az aktív helyet alkotó láncszakaszok (AI, AII, AIII) oldószer-hozzáférsi felszín ábrázolásban (zöld: A lánc, világoskék: B lánc), míg a fehérje gerince szalagábrázolásban látható. A kép VMD programmal készült, a hozzárendelések POV-Ray módszerrel készülték.

4. ábra (lásd a színes ábrát a 93. oldalon) A hTPK és az egér TPK szerkezetének összeillesztése az aktív helyre fókuszálva. Az aktív hely oldalláncjai gömb-pálcika ábrázolásban láthatók, pirossal a hTPK, narancsszínrel az egér TPK szerkezete, középen a tiamin pálcika ábrázolásban. Az aktív hely nagyfokú hasonlósága a két szerkezetben jól látszik.

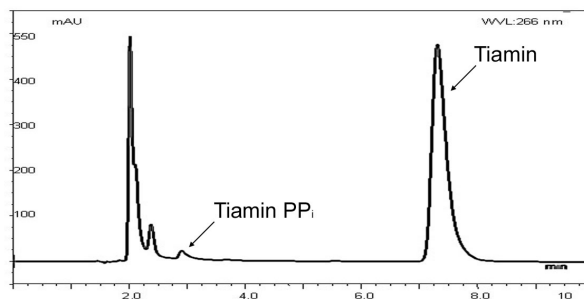
A különböző fajokból izolált TPK enzimek aktív centrumaihoz tartozó szekvenciák összehasonlítása (5. ábra) rávilágított az enzimfehérje egyes szakaszainak törzsfajlódásbeli alakulására. A hTPK enzimhez képest a fungális TPK enzimek mindössze 30%-os, a bakteriális TPK enzimek pedig 25%-os azonosságot mutattak. A fungális TPK enzimek esetében az aktív centrum első régiójában (AIII) két negatív töltésű aszpartátcsoportot helyettesít egy semleges töltésű cisztein és aszparagin aminosav. A második régióban (AII) egy pozitív töltésű lizint egy negatív töltésű glutamát cserél fel, ezáltal jelentős strukturális és töltésbeli különbségeket képezve az aktív centrumban. Bakteriális enzimek esetében az első régióban (AIII) a hisztidin, amely neutrális pH-értéken pozitív töltést vehet fel, neutrális vagy negatív töltésű aminosavval helyettesített. A második régióban (AII) GL- és WN-párokat cserél fel esetenként a részleges negatív töltéssel bíró tirozincsoport. Ezen adatok igazolják a különböző fajokban található enzimek aktív centrumának eltéréseit. Még jelentősebb különbségek voltak láthatók a kitöltendő tér töltésében és méretében.

	A III	A II	A I
Humán PP20/hTPK	95 DQDHTD 100 ... 199	GLKKN 203 ... 216	STSN 219
Egér TPK	95 DQDHTD 100 ... 199	GLKKN 203 ... 216	STSN 219
Schizosaccharomyces pombe	427 CQNTTD 432 ... 526	GLKKN 530 ... 543	STSN 546
Giardia lamblia	137 EQDSTD 142 ... 260	GLKKN 264 ... 277	GCN 280
Bacillus cereus	50 EQDSTD 55 ... 145	GRFYP 149 ... 164	CISN 168
Bacillus anthracis Ames	95 EQDSTD 100 ... 170	GRFYP 174 ... 187	CISN 190
Fusobacterium vincentii	78 EQDSTD 83 ... 166	GRFYN 170 ... 185	CISN 189
Enterococcus faecalis	74 EQDSTD 79 ... 171	RSWYL 175 ... 190	YASN 194
Clostridium tetani	75 EQDSTD 80 ... 168	GRFYP 172 ... 189	GVSN 193
Brucella melitensis	73 AKDSTD 78 ... 167	NAWNP 171 ... 186	TVSN 190

5. ábra Orthológ TPK enzimek aktív centrum szekvenciájának összehasonlítása. Az első régióban az aszpartátok és a treonin nagymértékben konzervált a baktériumoktól az emlősökig, de több változás is megfigyelhető gombákban. A második régióban csak a lizin konzervált a baktériumoktól az emlősökig, szemben a gombákkal, ahol a másik négy aminosav egyezett meg az emlősökével. A harmadik régióban a szerin és az aszparagin nagymértékben konzervált.

Elektrospray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS)

Az ESI-MS eljárás lehetővé tette mind a tiamin, mind pedig a tiamin-pirofoszfát kémleteres, fragmentálódás nélküli ionizációját, ezáltal intenzív molekulacsúcsok megjelenését (6. ábra). Az inkubációs elegyben megjelenő tiamin-pirofoszfát jól mutatta a PP20/hTPK tiamin-pirofoszfokináz aktivitását. A kromatográfiásan jól elkülönülő tiamin-pirofoszfát- és tiaminsúcsok ($t_R=2,91$ min és $7,34$ min) tömegspektrumán a tiamin-pirofoszfátra jellemző molekulai nagy relatív intenzitással $424,7$ m/z értéknél jelent meg.



6. ábra A hTPK tiamin-pirofoszfokináz aktivitásának analízise ESI-MS módszerrel. A PP20/hTPK- és tiaminoldat kromatogramján megjelenő tiamin PPi csúcs igazolta a fehérje tiamin-pirofoszfokináz aktivitását.

A hTPK hatásmechanizmusa

A hTPK valamennyi humán sejttypusban kimutatható, szerepe a tiamin (B1-vitamin) pirofoszforilálásának katalizálása ATP és magnéziumion jelenlétében. Nélkülözhetetlen a szénhidrát-anyagcsere és a mitokondriális energiatermelő folyamatok számos lépésében. Minthogy a tiamin elengedhetetlen fontossággal bír a gerincesek anyagcseréjében [27],

így jelenléte és pirofoszforilációja lényeges a gerincesek sejtjeinek életképességét és funkcióját illetően. Proteomikai vizsgálataink nemcsak a hTPK szerkezetét és funkcióját tisztázták, de felvetették a lehetőségét olyan gyógyszerek tervezésének is, amelyek specifikusan gátolják a baktériumok és gombák TPK enzimét anélkül, hogy hatással lennének a humán variánsra. Ezek a teresség során is biztonsággal alkalmazható antimikrobiális terápiás eszközzé válhatnak, mivel éppenséggel a koraterességben mellőzött metronidazol anyagcsere-termékéről nyert bizonyítást, hogy szoros szerkezeti analógja a tiaminnak, és *in vitro* hatékony gátlást fejt ki a hTPK enzimre [28].

Köszönetnyilvánítás

A pécsi munkacsoport a kutatást Prof. dr. Than Gábor, az MTA doktora vezetésével és gondos felügyeletével kezdte. Than professzor 2002. március 31-én váratlanul elhunyt, a szerzők és kollégái e munkát az Ő emlékének ajánlják. Köszönettel tartozunk dr. Hans Bohnnak, hogy a PP20 antigént és a monospecifikus anti-PP20 antitestet rendelkezésünkre bocsátotta, Prof. dr. Melegh Bélának a cDNS-szekvenálásért és dr. Szekeres Györgynek az immunhisztokémiai vizsgálatokért. A projekt az alábbi kutatási támogatások segítségével valósult meg: ETT T-09 163/01; ETT 557/2003; FKFP 0166/2001, 0298/2000, 0053/2001; OMFB-BIO 00201/2002; és OTKA T/020622, T/023076, T/029824, T/032657, T/032726, M/36996.

Irodalomjegyzék

- Than, N. G., Bohn, H., Szabó, G. D. (1993) In: Advances in Pregnancy-Related Protein Research (CRC Press, Boca Raton, FL, USA), pp. 1–333.
- Than, N. G., Sumegi B., Than G. N., Kispal G., Bohn H. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **258**: 752–757.
- Than, N. G., Sumegi, B., Than, G. N., Berente, Z., Bohn, H. (1999) *Placenta*, **20**: 703–710.
- Than, N. G., Sumegi, B., Than, G. N., Bellyei, Sz., Bohn, H. (2001) *Placenta*, **22**: 235–243.
- Bellyei, Sz., Szigeti, A., Boronkai, Á., Szabó, Z., Bene J., Melegh, B., Ohmacht, R., Janaky, T., Barna, L., Sipos, K., Zavodszky, P., Than, G. N., Sumegi, B., Bohn, H., Than N. G. (2004) *Placenta*, in press.
- Bohn, H., Winckler, W. (1985) *Arch. Gynecol.*, **236**: 235–242.
- Inaba, N., Sato, N., Fukazawa, I., Ota, Y., Shirotake, S., Takamizawa, H., Nozawa, S., Bohn, H. (1987) *Arch. Gynecol.*, **240**: 13–19.
- Than, N. G., Visegrády, B., Berente, Z., Than, G. N., Sümegei, B. (2000) *Biokémia*, **14**: 1–6.
- Visegrády, B., Than, N. G., Kilar, F., Sumegi, B., Than, G. N., Bohn, H. (2001) *Protein Eng.*, **14**: 875–880.
- Szilágyi, A., Závodszky, P. (1995) *Protein Eng.*, **8**: 779–789.
- Wallon, G., Lovett, S. T., Magyar, Cs., Svingor, Á., Szilágyi, A., Závodszky, P., Ringe, D., Petsko, G. A., (1997) *Protein Eng.*, **10**: 665–672.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389–3402.
- Pruitt, K. D., Maglott, D. R. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**: 137–140.
- Heinemeyer T., Wingender E., Reuter I., Hermjakob H., Kel A.E., Kel, O. V., Ignatieva E. V., Ananko E. A., Podkolodnaya O. A., Kolpakov F. A., Podkolodny N. L., Kolchanov N. A. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**: 362–367.
- Thompson, J. D., Higgins, J. D., Gibbons, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673–4680.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) *Anal. Chem.*, **68**: 850–858.
- Clauser, K. R., Baker, P. R., Burlingame, A. L. (1999) *Anal. Chem.*, **71**: 2871–2882.
- Bratthauer, G. L., Adams, L. R. (1994) *Immunohistochemistry: antigen detection in tissue*. In: Advanced laboratory methods in histology and pathology. (Mikel, U., Ed.) (Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.) pp 1–40.
- Sali A., Blundell T. L. (1993) *J. Mol. Biol.*, **234**: 779–815.
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**: 291–325.
- Timm, D. E., Liu, J., Baker, L. J., Harris R. (2001) *J. Mol. Biol.*, **29**: 195–204.
- Berman, H. M., Westbrook J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**: 235–242.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) *J. Molec. Graphics*, **14**: 33–38.
- Nosaka, K., Onozuka, M., Kakazu, N., Hibi, S., Nishimura, H., Nishino, H., Abe, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1517**: 293–297.
- Zhao, R., Gao, F., Goldman, I. D. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **26**: 320–322.
- Nosaka K., Onozuka M., Nishino H., Nishimura H., Kawasaki Y., Ueyama H. (1999) *J. Biol. Chem.*, **26**: 34129–34133.
- Fridrich, W. (1988) *Vitamines* (Walter de Gruyter, Berlin) pp. 339–401.
- Alston, T. A., Abeles, R. H. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**: 357–362.



A Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE) és a Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) szakosztályai az **Analitikai Vegyészkonferencia (Balatonföldvár, 2004. június 30–július 2.)** keretén belül közös szervezésben rendezik meg a

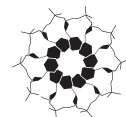
Bioanalitika 2004

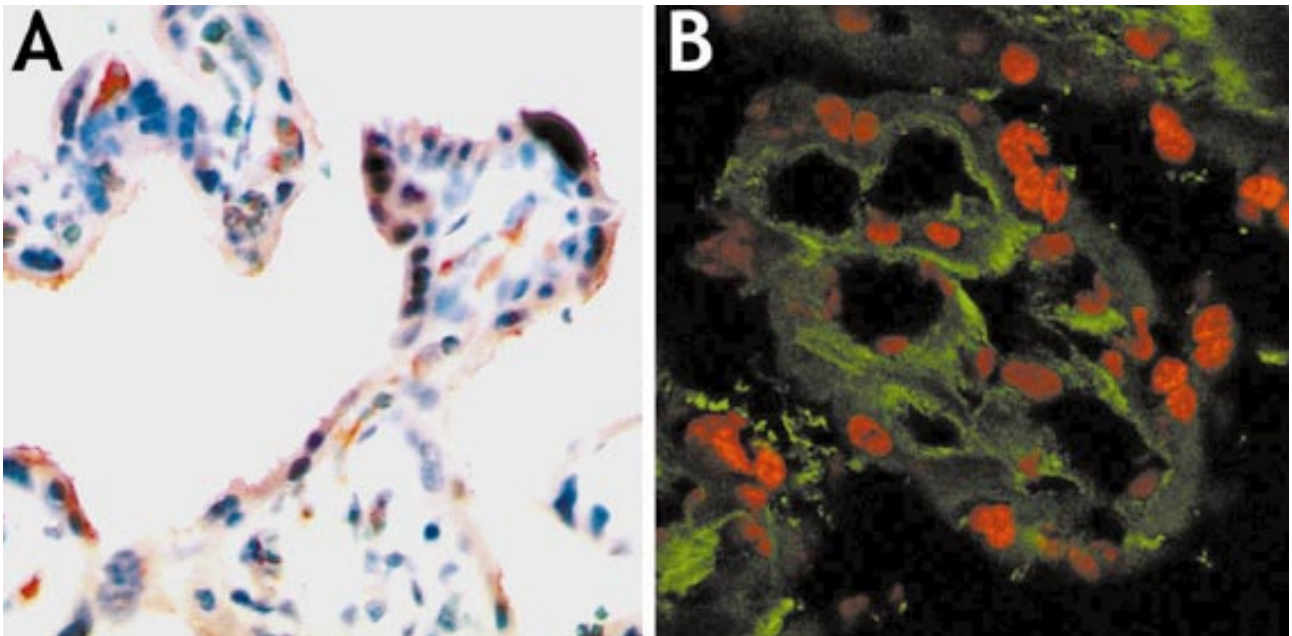
szimpóziumot, melyre ezúton hívjuk fel valamennyi MBKE-tag figyelmét. A szimpózium tematikája felöleli a bioanalitikai módszerek fejlesztésének és alkalmazásának körét, műszeres (HPLC, CE), immunanalitikai (RIA, ELISA) és molekuláris biológiai (PCR, NASBA) eljárásokat egyaránt.

Felkérjük a szimpóziumon részt venni szándékozókot, hogy jelentkezési szándékukat s megtartani kívánt előadásuk/poszterük címét juttassák el az aszek@nki.hu elektronikus levelezési címre.

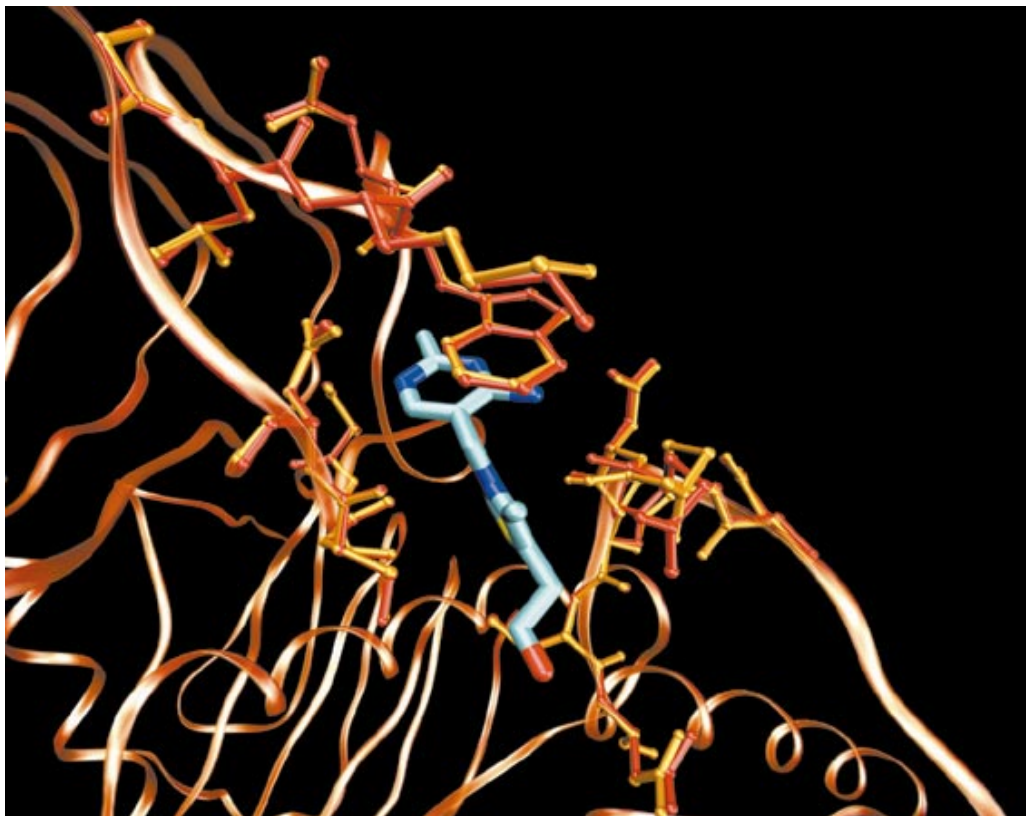
Jelentkezési határidő: 2004. január 23.

Jelentkezési lap letölthető a <http://www.nki.hu/bioanal2004.htm> internetes címen.

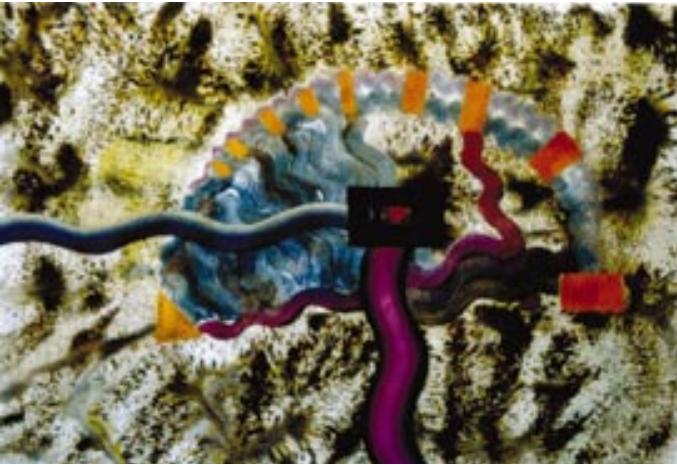




2. ábra A PP20/hTPK expressziója érett méhlepényben. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket monospecifikus anti-PP20 antitesttel festettük. (A) Az immunhisztokémiai metszeteken (400x) közepes PP20/hTPK expressziót láttunk szincitiotrofoblasztokban (nyilak), gyenge jelölődést pedig a citotrofoblasztokban és a Hofbauer-sejtekben. (B) A konfokális metszeteket párhuzamosan DRAQ5 (piros) magfestékkel is festettük (1000x). Számottevő PP20/hTPK festődés (zöld) figyelhető meg a szincitiotrofoblasztokban, és gyenge festődés a citotrofoblasztokban.



4. ábra A hTPK és az egér TPK szerkezetének összeillesztése az aktív helyre fókuszálva. Az aktív hely oldalláncai gömb-pálcika ábrázolásban láthatók, pirossal a hTPK, narancsszínnel az egér TPK szerkezete, középen a tiamin pálcika ábrázolásban. Az aktív hely nagyfokú hasonlósága a két szerkezetben jól látszik.



Bullás József, *Agy-kapu* (1995), vegyes technika, papír

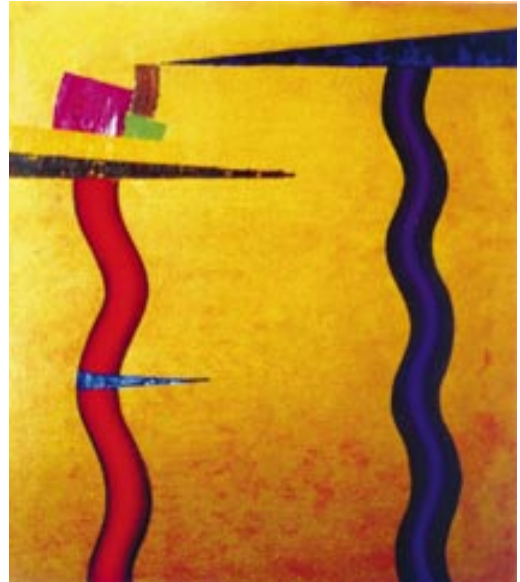
Munkái többnyire vászonra festett olajképek, de vegyes technikákkal, olaj-vászon-installációkkal és számítógépes grafikai technikával is kísérletezett. 1983–86 közötti, „útkereső” képein egyfajta absztrakt szimbolizmus mutatkozik, melyből fokozatosan fordul a térélmény generálásához, absztrakt terek kialakításához. Innen szinte egyenesen vezet az út a görbült formák, hullámvonalak, ívek dinamikája felé, mely elem 1989 után festett képeinek vezérmotívuma. Tereit persze nem csupán alakzatok hozzák létre, a minták (*pattern*) mellett döntő fontosságú a színek egymás melletti élete, kontrasztjuk és áttűnésük egymásba.



Bullás József, *Alkonyi hurok* (1994), olaj, vászon

amelyben a méret, a konkrét kontextus nem definiálódik, nem dönthető el, mikrokozmoszt vagy makrokozmoszt látunk; s emellett a spontaneitás, a kézmozdulat megismételhetetlen gesztusa, amely ugyanazt a formát minden alkalommal másképpen hozza létre. Mindkét gondolat filozofikus, ám Bullás – mint mondja – nem metafizikus értelemben, sokkal inkább a festői látásmód oldaláról közelít hozzájuk. Az ismétlődő, szabálytalanul szabályos formák természetanalógiák (kristály, hullám) is egyben, bár Bullás ezeket inkább közvetett inspirációknak vallja.

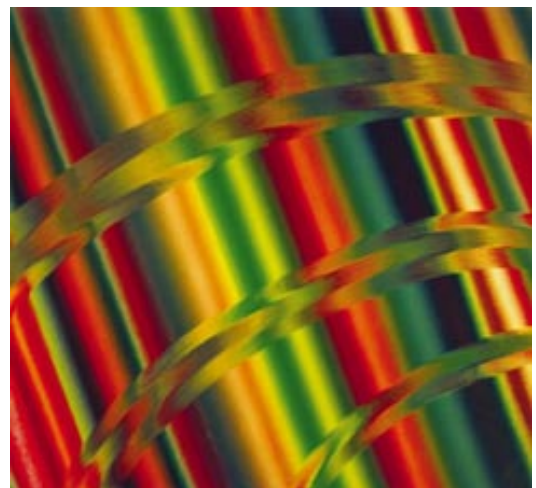
Bullás József 1958-ban született Zalaegerszegen. A Képzőművészeti Főiskolán Kokas Ignác és Dienes Gábor növendékeként végzett 1984-ben. Budapesten él és dolgozik, 1983 óta rendszeresen mutatja be képeit csoportos és egyéni kiállításokon. Hazai tárlatai mellett nagyszámú nemzetközi csoportos kiállításon szerepelt, Franciaországtól Bulgáriáig, Európa számos országán kívül több tengerentúli (Egyesült Államok, Kanada, Brazília) művészeti bemutatón szerepelt. Fontosabb díjai: Herman Lipót-díj (1984), Derkovits-ösztöndíj (1986), *Prix Ars Electronica Computergraphic*, *Anerkeannung* (1992).



Bullás József, *Konvergenca* (1995), vegyes technika, vászon

A fő vonulatnak két „kitérője” volt, részint egy kor- és újszerű technika, a számítógép bevetése (1988–92), részint egy visszanyúlási kísérlet az absztrakt

„klasszikus” irányzatához, a konstruktivizmushoz (1995–96). Számítógépes grafikai munkáiban részletgazdagon – keleti mintázatra emlékeztetően – ornamentált felszínekből hozott létre összetett tereket, s e munkájával a szakterület egyik legjelentősebb kitérítését nyerte el (*Anerkeannung*, Linz). Ezekkel együtt is következetesen két mozzanat foglalkoztatja a leg erősebben: az esemény, ahogy az egyszerű geometriai formák teret hoznak létre, még hozzá olyan teret,



Bullás József, *Kristály gesztus* (2001), olaj, vászon

Az Európai Biotechnológiai Szövetség regionális irodája Szegeden

A kutató, felsőoktatási és laikus érdeklődő közvélemény egyaránt fokozódó figyelemmel fordul a század vezető tudományága, a biotechnológia felé. Rendkívül fontos tehát, hogy szakmailag korrekt és alapos információ álljon rendelkezésére mindenkinek, aki az ezzel kapcsolatos kérdésekre választ vár, elkerülve a szenzációhajhász és felesleges pánikkeltés veszélyeit éppúgy, mint a túlzott elvárásokat. A szakmai közösség tevékenységének koordinálására 25 éve alakult meg az Európai Biotechnológiai Szövetség (EBSz). Az utóbbi két évben az EBSz, amely nonprofit szervezet, megújult és jelentősen átszerveződött, hogy a kor kihívásainak jobban megfeleljen. A legújabb szervezeti kezdeményezés az ún. Regionális Irodák létrehozása. A Regionális Irodák Európa minden régióját közvetlenül hivatottak elérni, az általános koordinációs feladatokon túl a helyi szakmai problémákra, tudományos kihívásokra és a közvélemény kérdéseire igyekeznek választ nyújtani.

Az elmúlt két év során az EBSz figyelemre méltó átalakuláson ment keresztül. A megújulás Prof. Børge Diderichsen (Novo Nordisk, Dánia), az EBSz elnökének nevéhez fűződik. Az átszervezéssel sikerült megújítani az EBSz szervezetét, amely így hatékonyabban tud megfelelni a gyorsuló fejlődés kihívásainak. Nem elhanyagolható az sem, hogy a megújulás időszakában az egyéni tagok száma 82%-kal nőtt (2002 nyarán 1655 tag volt, ez 2003



Az Európai Biotechnológiai Szövetség (EBSz) pavilonja a 11. Európai Biotechnológiai Kongresszuson (ECB11).



EUROPEAN FEDERATION OF BIOTECHNOLOGY

nyarára 3090-re emelkedett), és örvendetesen nőtt a szervezeti/vállalati részvétel is (139-ről 179-re).

Az EBSz sikeres számbeli fejlődése és az ezzel együtt járó szakmai súlya egyre több és szerteágazóbb feladatot rótt az EBSz operatív bonyolító és szervező irodájára (DECHEMA, Frankfurt, Németország). A méretnövekedésből származó hátrányok csökkentésére az EBSz Végrehajtó Bizottsága a tevékenység diverzifikálását határozta el, és pályázatot írt ki Regionális Irodák működtetésére. Az EBSz Regionális Irodák természetesen szintén nonprofit egységek, működésük feltételeit helyi, illetve regionális támogatásokból, kormányzati vagy kamarai forrásokból kell(ene) biztosítani. Szegeden közismerten kiemelkedő az élettudományok területén tevékenykedő, magasan kvalifikált szakemberek aránya, több mint 1000 fő kutató és oktató a régióban, akik zöme a Szegedi Tudományegyetemen, az MTA Szegedi Biológiai Központjában, a Gabonakutató Intézet Kht. intézményében, a Bay Zoltán Alapítvány Biotechnológiai Intézetében és néhány biotechnológiai vállalkozás keretében dolgozik. Szeged régóta nemzetközileg ismert és jegyzett tudományos központ az orvosi, élelmiszer- és környezettudományok területén. A szegedi régióban korábban izoláltan tevékenykedő intézmények az idei évben „Biopolisz-Szeged” néven együttműködési megállapodást dolgoztak ki, amelynek célja egységes fellépés a biotechnológiai ipar kifejlesztése érdekében. Annak ellenére, hogy minden más szempont alapján a térség Európa és Magyarország egyik elmaradott és csak elképesztően drágán vagy kalandosan megközelíthető vidékei közé tartozik, a dél-alföldi terület mind

országosan, mind a közép-európai régióban egyedülálló szellemi kapacitásokkal rendelkezik az élettudományi kutatásban és oktatásban. Évente 450 élettudományi diploma és 60 PhD-fokozat kiadására kerül sor. A régió fejlesztési terveiben kiemelt jelentőségű cél a csúcstechnológiára alapozott biopar létrehozása a meglévő élettudományi K+F infrastruktúra és források kihasználásával és fejlesztésével, amely versenyképességet biztosít majd az EU-csatlakozás kapcsán kialakuló új gazdasági feltételrendszerben.

A szegedi természettudományos kutatóközösség tagjai számára a nemzetközi együttműködés nem újdonság. A régió fizikai elzártsága ellenére sok két- és többoldalú nemzetközi együttműködést alakítottak ki és ápolnak, többek között az Európai Unió COST, EUREKA, SOCRATES, ESF, EMBO, NATO kezdeményezéseinek keretében. Az MTA SzBK-ban több mint 25 éve működik sikeresen az *International Training Course*, ami a fejlődő országok fiatal tehetségei számára nyújt gyakorlati kutatási továbbképzést a modern molekuláris biológia számos területén. Itt működik az UNESCO Környezeti Biológiai (virtuális) Tanszéke. Szegedet a PHARE Régiófejlesztési Program a biotechnológiai fejlesztések kiemelt térségének ismerte el, és az MTA SzBK elnyerte az EU 5. KTF Program keretében az „EU Kiválósági Központja” megtisztelő címet.

A Magyar Biokémiai Egyesület, melynek elnöke Friedrich Péter akadémikus, az EBSz alapító tagja. Az EBSz szervezetével a kapcsolat a Biotechnológiai Szakosztályon keresztül tartja. A szakosztály elnöke Prof. Kovács Kornél, akinek a csoportja a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékén és az MTA Szegedi Biológiai Központban dolgozik.

Mindezeket figyelembe véve és mérlegelve az EBSz Végrehajtó Bizottsága az egyik Regionális Iroda működtetési jogát Szegednek adta. Magyarországon kívül ez az iroda szolgálja ki Ausztria, Szlovénia és a Balkán országait. A szegedin kívül még nyolc regionális iroda alakult, többé-kevésbé lefedve Európa területét. A Regionális Irodák egymással is szoros együttműködésben oldják meg az általános feladatokat. Az általános tennivalókon túlmenően mindegyik Regionális Iroda választ néhány EBSz-szekciót, amelynek szakmai munkájában kiemelt intenzitással vesz részt.

A Regionális Irodák általános feladatai:

- ✓ Képviselő a kormányzati és helyi közigazgatási szervek felé.
- ✓ Regionális és nemzetközi projektek regionális végrehajtásának koordinálása.
- ✓ Pályázatok koordinálása európai szinten.
- ✓ Kapcsolattartás a minisztériumok, egyetemek, média és társadalmi szervezetek között.
- ✓ Regionális találkozók, konferenciák, kiállítások szervezése.
- ✓ Az EBSz-szekciók és -célcsoportok regionális tevékenységének támogatása.
- ✓ Egyéni és intézményi tagtoborzás a régióban.
- ✓ Információ terjesztése az EBSz szervezetéről és rendezvényeiről.
- ✓ Az EBSz és érdekeinek képviselője regionális fórumokon, rendezvényeken.
- ✓ A biotechnológiában érdekelt szervezetek regionális adatbázisának összeállítása és kezelése.
- ✓ Tájékoztatás a különféle EU- és más támogatási lehetőségekről.
- ✓ Az EBSz megjelenítése és képviselője a helyi, illetve regionális médiában.
- ✓ A közvélemény tájékoztatása és nyilvános vitákban való részvétel, illetve az EBSz álláspontjának képviselője.
- ✓ A regionális partnerek és az EBSz központi irodák és fórumok közötti kapcsolat és információáramlás megteremtése.

A szegedi Regionális Iroda által lefedett, nagyobb régió igényeit és szakmai felkészültségét figyelembe véve irodánk az EBSz Környezetvédelmi Biotechnológia, valamint a Biodiverzitás Szekciókban vállalt extra feladatokat, és aktívan dolgozik az innovációval foglalkozó munkacsoportban. A Környezetvédelmi Biotechnológia Szekció vezetője Dr. Thomas W. Egli (Swiss Federal Institute for Water Resources & Water Pollution Control, Svájc); a Biodiverzitás Szekció munkáját Prof. Dr. Klaus Ammann (Director, Botanical Garden, University of Bern, Switzerland) irányítja.

A kiemelt figyelemmel kísért EBSz-szekciók bevonásával a szakterületen rendezvények, kiállítások, konferenciák és kerekasztal-beszélgetések szervezését vállaljuk. Természetesen emellett az EBSz egyéb szakterületeken kifejtett aktivitását is támogatjuk a helyi adottságok és lehetőségek fel-

tárásával, rendezvényszervezési és logisztikai kérdések megoldásával. Az innovációval foglalkozó munkacsoport munkája például az egész EBSz tevékenységi területét átöleli. Hazánkban is óriási szükség van a kutatási eredmények innovatív fejlesztésére, az üzleti élet szereplőinek bevonására, technológiaátadási aktivitás erősítésére. Ennek a munkacsoportnak Charles F. A Bryce professzor a vezetője (Napier University, Edinburgh, UK).

A szegedi Regionális Iroda megalakulása után azonnal bekapcsolódott az EBSz egyik kiemelt programjába, amelynek magyarra fordított címe valahogyan így hangzik: az európai biotechnológia hozzájárulása az élettudományok globális fejlődéséhez (*European Action on Global Life Sciences, EAGLES*). Közismert, bár nem mindenütt kellőképpen felismert tény, hogy az emberiség előtt álló, az emberi kultúra fennmaradását veszélyeztető legfontosabb kihívások a betegségek terjedéséből, a tömeges éhezésemből és a környezet embertelen rombolásából fakadó bajok. A világ különböző részein ezek a problémák emberek millióinak okoznak szenvedést és idő előtti halált, az emberiség fejlődése szempontjából meghatározó fontosságú genetikai ártalmakat. Az egészségügy, táplálkozás és környezet problémái összefonódnak, kölcsönhatásuk nyilvánvaló, amint egyértelmű az élettudományok szerepe és felelőssége is a bajok orvoslásában. Sokan gondoljuk azt, hogy az európai tudomány és ezen belül az élettudományok kutatói a jelenlegi hozzájárulásnál jóval többet tehetnének a globális nehézségek leküzdéséért. Általában a segítő szándékban sincs hiány, inkább az a kérdés, hogyan tudnának minél hatékonyabban segíteni azok, akik vállalkoznak erre. Az EBSz égisze alatt formálódó EAGLES konzorcium új megközelítésből igyekszik a feladatokat pontosítani. Az elképzelés lényege az, hogy elsősorban a fejlődő országok pártatlan és kellő áttekintéssel rendelkező, vezető tudósai tudják egyértelműen megfogalmazni és rangsorolni az igényeket és tennivalókat. Rájuk kell tehát támaszkodnunk, őket kell bevonni az aktív munkába. A projekt koordinátora David McConnell professzor (Trinity College, Dublin, Írország).

Egy szintén új és szintén globális kitekintést igénylő program az Európa és Kína közötti kapcsolatokat a biotechnológia területén erősíteni szándékozó „*European Focus on Biotechnology in China*”

(EFBIC). A projekt az EBSz és a CNCBD (Chinese National Center for Biotechnology Development) közötti együttműködési megállapodáson nyugszik. Célja a kutatók és magas rangú döntéshozók stratégiai és folyamatos együttműködésének kialakítása, közös kutatási területek azonosítása és támogatása a biotechnológia és általában az élettudományok területén. Az EFBIC program az EU és Kína közötti tudományos és technológiai együttműködési megállapodás biotechnológiai fejezetre vonatkozó megvalósítása, amit az EBSz Nemzetközi Kapcsolatok munkacsoportja koordinál Brian F. C. Clark (University of Aarhus, Dánia) és David Bennett (Cambridge Biomedical Consultants, Delft, Hollandia) professzorok vezetésével. A program 2002 és 2005 között az alábbi feladatokat kívánja elvégezni:

- ✓ Közös tudományos és szervezeti felügyelő testületet hoz létre és működtet az EFBIC-projekt számára.
- ✓ Legalább hat közös szakmai műhely (*workshop*) jellegű konferenciát szervez.
- ✓ Kutatók, ipari szakemberek és döntéshozók cseréjét valósítja meg, ösztöndíjakat szerez.
- ✓ Kiadványokat szerkeszt a közös kutatási, fejlesztési és gyártási lehetőségekről, megvalósuló közös munkákat, sikertörténeteket mutat be.
- ✓ EFBIC-adatbázist és interaktív internetes oldalt hoz létre.
- ✓ Elősegíti a kínai partnerek részvételét az EU FP6 kutatási projektekben.

Az EBSz szegedi Regionális Irodája 2003 májusában kezdett el működni. Az eltelt rövid időszak alatt fő tevékenységünk egy EU FP6 pályázatban való részvétel volt. A pályázat, amely az EBSz Innováció Munkacsoport szervezésében készült, többek között az Iroda működésének anyagi és szervezeti feltételeit kívánja biztosítani azzal, hogy egy konzorcium keretében az európai biotechnológia versenyképességét erősíti, új fórumokat hoz létre az élvonalbeli fejlesztések koordinálására és a közös fejlődést hátráltató tényezők felszámolására. A konzorcium feladata továbbá a gazdasági és technológiai ismeretek terjesztése, versenyképes kutatási és innovációs stratégiák kidolgozása. Mindezeket a célokat a következő lépéseken keresztül kívánjuk megvalósítani: (i) Olyan módszerek elterjesztése és támogatása, amelyek elősegítik

a technológiaátadás, a vállalkozói szellem, az innovációs szemlélet, a stratégiai irányítás, szabadalmi kérdések, a közvélemény formálása és etikai kérdések áttekintése az élettudományok és biotechnológia területén. (ii) Sikeres gyakorlati példák felkutatása és bemutatása. (iii) Szakmai, technológiai és gazdasági ismereteket nyújtó intenzív tanfolyamok szervezése. (iv) A biotechnológiai kis- és középvállalkozásokban és a kutatóintézményekben dolgozó kutató-fejlesztő szakemberek és hallgatók cseréjének elősegítése.

A szegedi Regionális Iroda aktívan részt vett egy, az EBSz hivatalos állásfoglalását tükröző nyilatkozat kidolgozásában, amelyet az EU FP6 program felső vezetésének felkérésére fogalmaztunk meg a környezettudományok európai szerepéről és annak az EU FP6 prioritásokban való megjelenéséről. Felhívtuk az EU kutatás-fejlesztési prioritásait meghatározó döntéshozók figyelmét arra, hogy az emberiség fejlődésére leselkedő egyik legnagyobb veszedelem a már meglévő és folyamatosan gyarapodó környezeti szennyeződés, amely kikerülhetetlenül támadja az emberi szervezetet. Egyértelmű az összefüggés bármely emberi populáció egészségi állapota és környezete szennyezettsége között, amellet, hogy közismert módon bizonyos szennyeződések konkrét okai bizonyos betegségcsoportoknak. Következésképpen az európai és globális kutatási prioritásoknak egyensúlyt kell találni a betegségközpontú (terápiás célú) és környezetközpontú (megelőző célú) kutatások támogatása között. A nemzeti és globális döntéshozó szervezetek közkedvelt jelszava, a fenntartható fejlődés, nem valósítható meg a környezet tisztítása és megóvása nélkül. A környezetvédelmi biotechnológia az elmúlt két évtizedben óriási fejlődésen ment keresztül az élettudományok többségével párhuzamosan. Jelentős kutatási eredményeket értünk el a bioremediáció és biodegradáció területén. Számos esetben a gyakorlatban is bebizonyosodott, hogy ezek

a technológiák képesek a szennyeződések biztonságos és teljes felszámolására. Különösen eredményes a biotechnológiai megoldás, ha a spontán lebomlás valószínűtlen és/vagy a szennyezés alacsony, de toxikológiailag veszélyes koncentrációban fordul elő. A további fejlődés biztosítása érdekében sokkal kiterjedtebb ismeretanyagot, adatbázisokat kell létrehozni, amelyek a környezetvédelem számára hasznos mikroorganizmusok teljes körét vizsgálják és hasznosítják. Hasonlóképpen nagy igény van olyan diagnosztikus módszerekre, amelyek a *biochip* technológia segítségével a környezet gyors, pontos és hatékony monitorozását végzik, valamint a biotechnológiai úton előállítható, megújuló és tiszta energiaforrások fokozott bevezetésére a mindennapi gyakorlatba. Az EU FP6 deklarált prioritásai (és még inkább a megvalósuló döntéshozási gyakorlat) jórészt megfelelnek erről a területről, ami a korábbi eredmények elévüléséhez, az ezen a területen kivított európai vezető szerep elvesztéséhez és a fenntartható fejlődés teljesíthetetlenségéhez vezet. Az Európai Biotechnológiai Szövetségről a <http://www.efbweb.org> honlapon lehet további információt találni, az MTA SzBK, SzTE Biotechnológiai Tanszék és Biopolisz-Szeged témákról részletek a <http://www.szbk.u-szeged.hu> honlapon érhetők el.

Kovács Kornél

ÁLLÁSPÁLYÁZAT

Membránokból induló jelátviteli folyamatok tanulmányozására **posztdoktoráns molekuláris biológus kutatót** keresünk a Szegedi Biológiai Központba, kiemelt fizetéssel.

Önéletrajzot és ciklistát a bktik@nucleus.szbk.u-szeged.hu e-mail címre, vagy postai úton az MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet Titkársága, 6701 Szeged, Pf. 521 címre kérjük eljuttatni. A borítékra kérjük ráírni: „Állás pályázat”.

Minden kedves olvasónak

Boldog Karácsonyt

és eredményekben gazdag új esztendőt kíván a

MBKE Intéző Bizottsága.



 **NOVO-LAB**



*T*personal

BIOMETRA THERMOCYCLEREK



*T*3



*T*gradient



*T*1


**Gyorsaság és pontosság
5 variációja**



*T*robot

Whatman

Biometra®

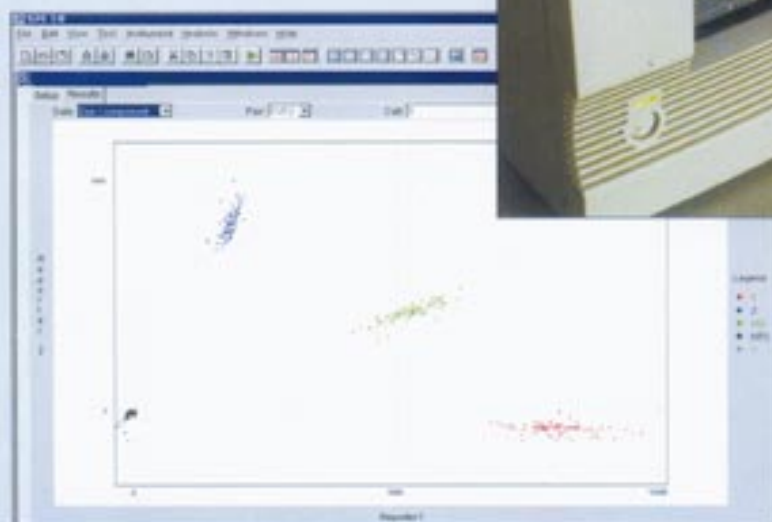
 **NOVO-LAB**

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. 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