

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

XXVIII. ÉVF. 4. SZÁM

2004. DECEMBER

A tartalomról:

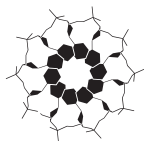
- ◇ Az immunhisztokémia szerepe a daganatterápiás célpontok azonosításában – *Orosz Zsolt*
- ◇ Tesztfejlesztés automatizált környezetben – *Baki Andrea, Bielik Attila, Molnár László és Keserű György Miklós*
- ◇ Az Agilent Technologies Inc. génexpresszió-vizsgálati rendszere – *Andrásfalvy Márton*
- ◇ Környezeti és egészségügyi tudatosságunk mai állása – *Juvancz Zoltán*
- ◇ Biogén tényező diákoknak – a BioGén tábor – *Székács Anna és Dobos Attila*
- ◇ Új dimenziót nyit a Peprotech! – *Holló Róbert*

Címlapkép: *Robotizált tesztelés az AssayStation munkaállomáson (ld. a vonatkozó közleményt a 89–94. oldalakon).*



Contents:

- ◇ The role of immunohistochemistry in identification of specific targets for therapy of cancer – *Zsolt Orosz*
- ◇ Assay development for robotic workstations – *Andrea Baki, Attila Bielik, László Molnár and György Miklós Keserű*
- ◇ Gene expression analysis system by Agilent Technologies, Inc. – *Márton Andrásfalvy*
- ◇ The present status of our awareness regarding our environment and health – *Zoltán Juvancz*
- ◇ A biogen factor for students – the BioGén course – *Anna Székács and Attila Dobos*
- ◇ Peprotech opens a new dimension! – *Róbert Holló*



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

**Whatever the length,
whatever the sequence,
the FailSafe™ PCR System
will faithfully amplify
your template every time.**

Never fail at *PCR*. We Promise.

We're scientists like you and we don't like making grandiose claims. However, this time we're making an exception.

We truly believe that if you use the FailSafe™ PCR System you will never have an unsuccessful PCR reaction, no matter what your template.

That's why we signed this ad, and that's our promise to you.

The FailSafe PCR System is a very different product. It is truly a much better way to amplify your DNA.

Our patented PCR Enhancement Technology (with betaine*) makes it very consistent from reaction to reaction. It's also a high fidelity system that makes many fewer mistakes than Taq. It's a long PCR system that amplifies any template up to 20 kb in length. And it's a "tough template" system that will amplify even the highest GC DNA.

We back our promise with a money-back guarantee. If you're not happy, you don't pay.

We're confident that if you use the FailSafe System you will always have successful PCR.

*The use of betaine in DNA or RNA polymerase reactions is covered by patent rights exclusively licensed to EPICENTRE Technologies. This product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) and RT-PCR for life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the advertised performance of the PCR system is contingent on up front license fee, either by payment to Applied Biosystems or direct payment to the authorized service center.

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

Circle 41 on Reader Service Card

NEW! Easy Shortcut to Product Information
For more information, go to our website at www.epicentre.com
and enter this QuickInfo code: **FSA08**

kvalitex

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

H-1120 Budapest, Pannónia u. 7. Tel: (36-1) 340-4700 Tel./fax: (36-1) 339-8274 E-mail: kvalitex@axelero.hu

Az immunhisztokémia szerepe a daganatterápiás célpontok azonosításában

The role of immunohistochemistry in identification of specific targets for therapy of cancer

Orosz Zsolt

Daganatpatológiai Osztály, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7–9.
Tel.: (36) 1 224-86-76 Fax: (36) 1 224-86-00/1405
E-mail: zso@oncol.hu

Összefoglalás

A hagyományos kemoterápiás kezelések jelentős mellékhatásokkal járnak, és a daganatok egy részében hatékonyságuk sem megfelelő. Az 1990-es évektől kezdődően egyre szélesebb körben kerülnek alkalmazásra az onkológiában paradigmaváltást eredményező, a daganatsejteket kóros molekuláris biológiai, biokémiai folyamataik szintjén megtámadó ún. célzott terápiák. Ezek a szerek molekuláris szinten megfelelően jellemzett hatásmechanizmussal, specifikusan hatnak, gyakorlati alkalmazásuk feltétele a terápiás célpontok megfelelő biokémiai azonosítása. A közlemény ezen terápiás célpontok azonosításának egyik módszerét, immunhisztokémiai vizsgálati eljárásait, illetve a célzott kezelések ma már gyakorlati alkalmazást nyert típusait tárgyalja.

Orosz, Zs.

Department of Tumor Pathology, National Institute of Oncology, H-1122 Budapest, Ráth György u. 7–9. Tel.: (36) 1 224-86-76 Fax: (36) 1 224-86-00/1405; E-mail: zso@oncol.hu

Summary

Traditional chemotherapeutic modalities cause significant side-effects, and in certain tumor types their effectiveness is not sufficient. Novel, so-called targeted therapies have increasingly been used in oncology since the end of the last century, resulting in a paradigm shift in our perception about cancer treatment. These new drugs target cancer cells at their specific pathological molecular biological, biochemical level. The specific therapeutic effects of these new agents are well characterized, and a prerequisite for their application is the biochemical identification of specific targets. The role of immunohistochemistry in identification of tumor targets and different target therapies presently installed in everyday therapeutic practice are discussed.

A daganatok kezelésében a XX. század második felétől kezdődően különböző kemoterápiás szerek kerültek alkalmazásra, amelyekkel egyes daganattípusok esetében igen komoly eredményeket lehetett elérni. A nyirokszervek és csírasejtek korábban kedvezőtlen rosszindulatú daganatai hatékonyan gyógyíthatókká váltak. Ugyanakkor más szervek daganatainak esetében, bár a terápiás hatás nem volt elhanyagolható, az gyakran csak átmenetileg és nem mindig kiszámíthatóan érvényesült. A daganatok genetikai hátterének és a daganatok kialakulásában szerepet játszó biokémiai mechanizmusoknak feltárása az elmúlt években olyan új kezelési módok kialakításához vezetett, amelyek akár önállóan, akár a korábbi kemoterápiás kezelések kiegészítéseként több daganattípus esetében

áttörést hoztak [1]. Ezek az ún. célzott (*targeted*) terápiák ma az onkológiai kutatások és a klinikai onkológiai vizsgálatok középpontjában állnak. A célzott kezelések indikációját pontosan meg kell határozni. Célul kell kitűzni, hogy minden, célzott kezelésre alkalmas beteg hozzájusson a megfelelő gyógyszerhez, illetve akiknél az ilyen típusú kezeléstől nem várható eredmény, azok haladék nélkül egyéb (kemoterápia, sugárkezelés) gyógymódban részesüljenek.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok szerepe a diagnosztikus patológiában

A szövettani metszeteken alkalmazott immunhisztokémiai vizsgálatok lényege, hogy bizonyos sejt-

alkotókat, fehérjéket (antigén) immunológiai reakció alkalmazásával a metszeten láthatóvá tesszük. A módszer alapvetően specifikus antigén–antitest kötődés, amelyet valamilyen jelölőanyaggal teszünk láthatóvá. A vizsgálat célja lehet a daganatok differenciációjának megállapítása (pl. hám, kötőszövet, lymphoid, csírasejtes, neuroendokrin), alcsoportba sorolása (pl. B- vagy T-sejtes lymphoma, sarcomatípusok stb.), nyirokcsomóáttétek azonosítása, érbetörés kimutatása, a prognózis megítélése, a terápiás terv kialakítása, terápia alkalmazhatósága, illetve ritkábban egyes kórokozók (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *humán papillomavírus*) kimutatása.

A részletesebb elemzés előtt az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelésekor szükséges lehet, hogy áttekintsük a figyelembe venni kívánt alapfogalmak definícióját. A specificitás az antitest azon tulajdonsága, hogy milyen biztonsággal reagál a célantigénnel, illetve hányféle sejt-, szövet- vagy daganattípushoz kapcsolódik. Ennek a tulajdonságnak elsősorban a differenciáldiagnosztikában van jelentősége. A specificitás arra utal, hogy milyen biztonsággal használható egy reakció különböző daganatok elkülönítésében. Például az ún. pan-citokeratin reakció különböző hámtípusokban pozitív, így azon kívül, hogy a daganat hámeredetét segít tisztázni, a szervi lokalizációra vonatkozóan nem ad támpontot. A citokeratinoknak több mint 20 izoformája ismeretes, melyeknek daganatokon belüli megjelenése, expressziós mintázata a szövettani képpel összevetve informatív lehet a kiindulásra vonatkozóan. Például a mirigyes szerkezetű rák áttéte citokeratin-20-pozitivitás és citokeratin-7-negativitás esetén vastagbélrák lehetőségére utal. A prosztataderedetű antigénekre specifikus antitestek nagy valószínűséggel a prosztatából kiinduló daganatokkal reagálnak, azaz segítenek az adott daganat szervi lokalizálásában is.

A másik fontos paraméter az érzékenység (szenzitivitás), ami az adott antitest azon tulajdonságát

jelzi, hogy milyen mennyiségű antigént tudunk segítségével kimutatni. Az immunhisztokémiai reakciók szenzitivitása mesterséges módon (pl. antigénfeltárással) növelhető. Az immunhisztokémiai reakciók értékelésekor tisztában kell lennünk azzal, hogy a megfelelő reakció a sejt melyik alkotóelemében jelentkezik, azaz vannak citoplazmatikus, magra, membránra lokalizálódó reakciók, illetve más esetekben – különösen daganatoknál – ezek kombinációi (citoplazma és mag vagy membrán és citoplazma) is elfogadhatók.

Céltott daganatkezelések

A normál sejtek és a daganatsejt közötti alapvető különbség utóbbi kontrollálatlan, környezeti hatásoktól független és a szervezet szempontjából szükségtelen sejtosztódásra való képessége. Ez a képesség sejttömeg-növekedéshez vezet, rosszindulatú daganatok esetében további szabályozórendszerek meghibásodása révén invázióra való hajlammal, áttétképződéssel társulva.

A sejtosztódás és a sejtek differenciálódása összetett, szabályozott folyamat. A sejtben elhelyezkedő DNS különböző proteinek, többek között növekedési faktorokat kódol, amelyek ugyanazon sejt vagy akár a környezetben elhelyezkedő más sejtek felszínén receptorokhoz tudnak kötődni. Ez a kötődés a sejtben különböző szignálokra keresztül információkat juttat vissza a sejtbe, amely szabályozza, szükség esetén beindítja vagy blokkolja a sejt ciklust. A leírt rendszer különböző pontjain bekövetkezett hibák kontrollálatlan sejtproliferációhoz, malignus transzformációhoz vezethetnek.

A céltott kezelés a daganat kialakulásában és/vagy növekedésében szerepet játszó valamelyik specifikus folyamat leállítását, blokkolását kíséri meg gyógyszerek segítségével. A célpontok különböző molekulák, sejtalkotók lehetnek, amelyek szerepe a carcinogenezisben ismert vagy valószínű.



Orosz Zsolt a Semmelweis Orvostudományi Egyetemen szerzett általános orvosi diplomát 1985-ben, patológus-szakvizsgát 1989-ben tett. A Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának Onkológiai programja keretében szerzett PhD-fokozatot 2001-ben. 2002-től az Országos Onkológiai Intézet Daganatpatológiai Osztályának vezetője. Szakmai érdeklődési területe a lágyszövet- és emlődaganatok, valamint pigmentált bőrváltozások patológiája. Az MTA kutatási Bolyai-ösztöndíjasa (2003–2005). Felkért előadóként részt vesz patológus-szakorvosi és posztgraduális képzésben a Semmelweis Egyetem Általános Orvosi Karán.

A kemoterápia és a célzott daganatkezelések közötti különbségek

A hagyományos kemoterápiás eljárások célpontjai az osztódásban levő, illetve az osztódás felé haladó (proliferáló) sejtek. A kemoterápia elvi háttere, hogy a tumorokban a normál szövetekhez képest jelentősen nagyobb a proliferáló sejtek aránya, s a kemoterápia éppen ezt a sajátosságot használja fel. A kemoterápiás szerek jelentős része a sejtosztódás fázisában hat. Ugyanakkor a szervezetben jelenlevő és életteni körülmények között is viszonylag gyorsan megújuló szövetek (pl. csontvelő, hajhagyma, bélnyálkahártya) is célpontot jelentenek a kemoterápiás szereknek, és ez a hatás felelős számos, kezelés miatti mellékhatásért is.

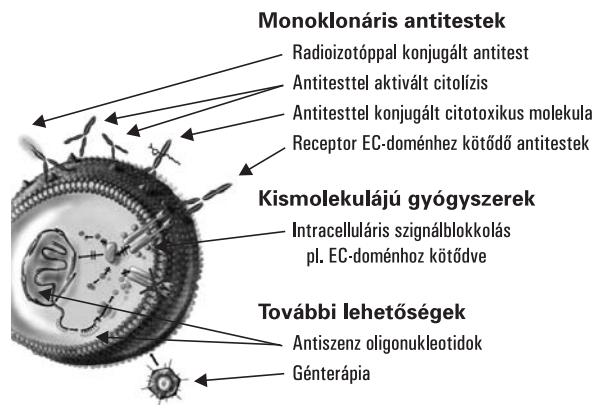
A célzott kezelések során igyekeznek olyan célpontot – célmolekulát (*target molecule*) – találni, ami a daganatsejtben specifikusan van jelen, és jelenléte a daganat működésében alapvető fontosságú. Az ideális célmolekula a normál sejtben egyáltalán nincs jelen.

A kérdést bonyolítja az a tény, hogy a daganat kialakulásában és működésében alapvető szerepet játszó gének és géntermékek a normális sejtekhez igen hasonlóak, akár ugyanazok lehetnek, utóbbi esetben csak mennyiségi különbségek vannak jelen. Vannak olyan esetek is, amikor a daganat kialakulásában két normális gén összeolvadását követően új protein képződik, ami elméletileg ideális célpont lehet. Mégis, a jelenleg alkalmazott célzott kezelések nagyrészt az előbb említett minimális minőségi vagy mennyiségi különbségeken alapulnak.

Célzott daganatterápiák

A célzott daganatterápiák alkalmazása többféle biokémiai hatásmechanizmust használ ki (1. ábra). Az egyik, legszélesebb körben alkalmazott forma a diagnosztikus immunhisztokémiánál már leírt antigén–antitest kötődésen alapul. A monoklonális antitestek a tumorsejt felszínén elhelyezkedő kóros szerkezetű vagy kóros mennyiségű antigénnel kapcsolódnak. A specifikus kötődésre alapozva többféle terápiás hatásmechanizmus indítható el [2]. A monoklonális antitestekhez kötött izotóp sejtje lokalizált sugárhatást fejt ki. Erre példa a Zevalin® (*ibritumomab tiuxetan*), amellyel B-sejtes non-Hodgkin limfómákban az egyik anti-CD20 (B-limfocita-marker) monoklonális antitesttel, az *ibritumomab*mal tiuxetan-keláton keresztül konjugált ittri-

umizotópot (Y^{90}) alkalmaznak a lokális sugárhatás elérésére. Hasonló felépítésű és hasonló indikációval alkalmazott gyógyszer a Bexxar® (*tositumomab*), amelyben a CD20 elleni antitesthez radioaktív jódizotópot (I^{131}) kapcsolnak.



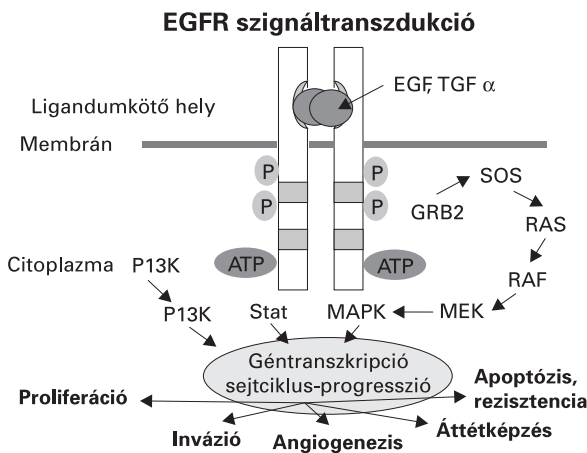
1. ábra A célzott kezelések elvi lehetőségei. A monoklonális antitestekkel, illetve a kismolekulájú gyógyszerekkel történő kezelések már gyakorlati alkalmazást nyertek. (Segota és Bukowski [2] után).

A monoklonális antitest konstans régiójához kapcsolhatunk citotoxikus vegyületeket, amely a daganatban koncentrálandó kemoterápiás hatást eredményez. Ezt a megoldást alkalmazzák a *gemtuzumab* esetében, amikor a leukémiák egy speciális formájában, a CD33-antigén elleni antitesthez a citotoxikus hatású *calicheamicin* hatóanyagot (*Myelotarg*®) kötik. További lehetőség, amikor az antitest bekötődése után kialakult antigén–antitest komplex aktiválja a komplementrendszer és/vagy sejtközvetített citotoxikus immunválaszt eredményez. Alkalmazhatunk olyan antitesteket is, amelyek specifikusan valamely transzmembrán receptor extracelluláris részéhez kötődve blokkolják annak működését. Amennyiben ez a receptor a daganat szempontjából alapvető jelentőséggel bír, a folyamat megszakítása a daganatsejt halálához vezet. A receptor-molekulák intracelluláris részei nem antitestekkel, hanem ún. kismolekulájú gyógyszerekkel blokkolhatók. Ez a blokkolás is a szignálrendszer működését függeszti fel.

Más, a gyakorlatban ma még nem alkalmazott módszer lehet a genetikai információ DNS-ről vagy RNS-ről történő átírásának blokkolása antiszenz DNS- vagy RNS-szakaszokkal, illetve valamilyen hiányzó génszakasz (pl. tumorszuppresszor gén) vektorral történő bejuttatása.

Receptorok blokkolása monoklonális antitestekkel

A növekedési faktorok egyik nagy csoportja a humán epidermális növekedésifaktor-receptorok (HER) családja. Az idesorolt molekulák a transzmembrán tirozin kináz enzimek közé tartoznak. Közös jellemzőjük, hogy extracelluláris ligandumkötő hellyel rendelkeznek. A bekötődő ligandum hatására a receptor dimerizálódik, aktívvá válik. Az aktív dimer intracelluláris része foszforiláción megy keresztül, majd különböző szignálutakon keresztül jeleket közvetít a mag felé [3]. A sejtmagban ezek hatására olyan génszakaszok aktiválódnak, amelyek szerepet játszanak a sejt proliferációjában, differenciációjában, migrációjában, a programozott sejthalálban (apoptózis) (2. ábra).



2. ábra Az EGFR jelátviteli rendszer vázlatja. Az ábra a ligandumbekötődés, illetve receptordimerizáció utáni állapotot illusztrálja, a lehetséges patológiás kimenetelek feltüntetésével. EGFR: epidermális növekedésifaktor-receptor, TGF α : transformáló növekedési faktor alfa, MAPK: mitogénaktivált protein kináz, MEK: MAPK kináz, GRB2: kettes típusú növekedésifaktor-receptor, SOS: guaninoáltó faktor, RAS: proto-onkogén szerin-treonin kináz, RAF: kináztermészetű proto-onkogén, STAT: szignálátalakító és transzkripciót aktiváló protein, P13K: foszfoinozítid-3-hidroxikináz.

A család 1-es számmal jelzett tagja a HER1, más néven epidermális növekedésifaktor-receptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Az EGFR 170 kD molekulatömegű fehérje, amely tirozin kináz enzimaktivitásán keresztül többek között a sejtnövekedés, differenciáció és angiogenezis szabályozásában vesz részt. Az EGFR liganduma az epidermális növekedési faktor mellett a TGF-alfa, a béta-cellulin, a heparinkötő növekedési faktor. Az EGFR számos normál sejtben, így a mellékvesekéregben, az

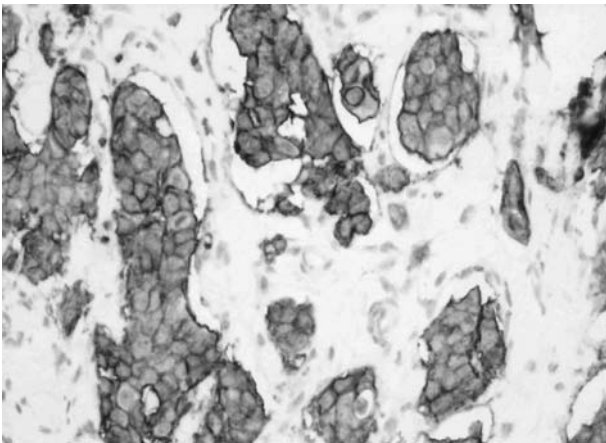
emlő lobuláris hámsejtjeiben, a méhnyak bazális sejtjeiben, a nyelőcső hámjában, a tüdő alveolusaiban, a bazális bronchialis sejtekben, a bőr bazális sejtjeiben, a méhnyálkahártya mirigyekben is kimutatható.

A megfigyelések arra utalnak, hogy bizonyos daganattípusok sejtjeiben az EGFR-molekulák száma megnő, és ez összefüggést mutat a daganat agresszívebb viselkedésével, áttétképző hajlamával, rosszabb prognózisával. Fokozott EGFR-positivitást írtak le többek között vastag- és végbélrákok, nem kissejtes tüdőrákok, hasnyálmirigy- és petefészekrákok és emlőrákok jelentős részében. Az EGFR-molekulák szövettani metszeten immunhisztokémiai módszerrel kimutathatók, és a pozitív indikációja lehet EGFR-ellenes monoklonális antitestes kezelés (Erbix[®]) elindításának.

A HER család következő tagja a HER2. Szinonimaként használatos a c-erbB-2, illetve a neu megnevezés is [4]. A normál sejtekben a HER2-génnek két kópiája található meg, amelyek a normál emlőmirigy-kivezető cső hámsejtjeiben elhelyezkedő kb. húsz ezer receptort kódolják. Az emlőrákok 15–25%-ában a HER2 fokozott jelenléte tapasztalható, és ez rosszabb prognózissal társul. A HER2 protein fokozott jelenlétének háttérében az esetek döntő többségében génamplifikáció áll, azaz a normál 2 kópia helyett annak többszöröse van jelen egyetlen sejtben, aminek eredményeként akár 1 millió receptor is lehet egyetlen sejt felszínén. (Ritkább esetben poliszómia léphet fel). A HER2-receptor fokozott jelenléte mellett az antiösztrogénkezelés általában hatástalan, míg a HER2 elleni antitestkezelés eredményt hozhat. A patológiai rutindiagnosticszában a HER2-receptor túltermelésének kimutatására immunhisztokémiai vizsgálatot (3. ábra), a génamplifikáció igazolására fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) alkalmazunk [5]. A génamplifikációt igazolhatjuk még a mindennapi gyakorlatban kevésbé elterjedt polimeráz láncreakcióval, kromogén *in situ* hibridizációval (CIS) vagy *Southern blot* immun-gélelektroforetikus eljárással is.

Antitesttel aktivált citolízis

A CD20 molekula 3337 kD molekulatömegű, nem glikozilált transzmembrán protein, amely a fehérsejtek egy típusának, a B-sejteknek különböző alcsoportjaiban fordul elő. A nyiroksejtek rosszindulatú daganatainak diagnosztizálásakor rendszeresen alkalmazzuk az anti-CD20 immunhisztokémiai



3. ábra Invaszív emlőrák szövettani metszetén elvégzett HER2 immunhisztokémiai reakció. A sejtmembránon erős, ún. 3+ pozitív reaktivitás látható. A nagyítás 200-szoros.

reakciókat a sejtek eredetének megállapításához. Az elmúlt években a rosszindulatú nyirokdaganatok kezelésével kapcsolatos kutatásokban egyre nagyobb figyelem fordul a monoklonális antitestekkel történő kezelés felé. A CD20-pozitív daganatos limfoid sejtek ellen kimérikus monoklonális antitestet (anti-CD20mAB) fejlesztettek ki (MabThera®, Rituxan®), melyek már a mindennapi kezelésben is helyet kaptak [6]. A kimérikus antitest konstans része humán (IgG1 típusú), míg variábilis része egér eredetű. Az antitest specifikusan kötődik a limfoid sejtek felszínén található CD20-antigénéhez, és ez a kötődés antitest- és komplementfüggő sejtmediált citotoxicitást vált ki, majd beindítja a programozott sejthalált, az apoptózist.

Kismolekulájú gyógyszerek

A CD117 (p145, c-kit, *stem cell factor receptor*, SCFR) is a tirozinkináz-receptorok családjába tartozik. A receptort kódoló gén a 4q11-12 kromoszómán található. A c-kit a feltételezések szerint szerepet játszik a sejt differenciációban és a proliferáció befejezésében. Normál körülmények között a c-kit fehérje a vérsejtképző őssejtekben, hízósejtekben, a bőr pigmenttartalmú sejtjeiben, hízósejtekben, illetve a gyomor-béltraktus mozgását szabályozó ún. Cajal-féle intersticiális sejtekben mutatható ki.

Ez utóbbi megfigyelés akkor kapott különös jelentőséget, amikor kiderült, hogy a gyomor-béltraktus speciális, nem hámeredetű (mezenchimális) daganata, az ún. gastrointestinalis stromális tumor (GIST) közel 100%-ban mutatja a c-kit fehérje génjének expresszióját [7]. A c-kit fehérjére vonatkozó

pozitivitás a diagnosztikában nagy segítséget adott, mert így ezek a korábban gyakorlatilag kezelhetetlen daganatok nagy biztonsággal különíthetők el más típusú kötőszöveti daganatoktól. Kiderült az is, hogy a c-kit fehérje expressziójának hátterében GIST előfordulások esetében a c-kit gén mutációja áll [8].

A daganat kezelésében áttörést az a felismerés hozott, hogy a c-kit-receptorhoz egy kismolekulájú gyógyszer, a Glivec® (*imatinib*, imatinib-mezilát) specifikusan kötődik. A hatóanyag kis molekulasúlyú 2-fenil-aminopirimidin-származék, az ATP-receptor intracelluláris részéhez történő bekötődés kompetitív antagonistája, így megakadályozza, hogy a c-kit foszfátcsoportokat szállítson az ATP-től a tirozinszármazékokhoz. A következmény a c-kit által közvetített szignálút megszakadása. (Hasonló mechanizmus feltételezhető a krónikus myeloid leukémiákban, ahol ugyanezen hatóanyag az Abl és Bcr-Abl tirozinkináz-doménhez kötődik). A gastrointestinalis stromális tumorok kezeléséhez azonban nem szükséges elvégezni a gén mutációjának molekuláris analízisét. Az immunhisztokémiai vizsgálat pozitivitása esetén nagy valószínűséggel jó terápiás effektus, akár a daganat remissziója is kialakulhat. Meg kell jegyezni azonban, hogy a GIST-esetek 1–2%-ának kialakulásában más mechanizmus és nem a c-kit mutációja húzódik meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N. Engl. J. Med.*, **344**: 783–792.
- [2] Segota, E., Bukowski, R. M. (2004) The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific. *Cleve. Clin. J. Med.*, **71**: 551–560.
- [3] Hubbard, S. R., Till, J. H. (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**: 373–398.
- [4] Bargmann, C. I., Hung, M. C., Weinberg, R. A. (1986) The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, **319**: 226–230.
- [5] Kobayashi, M., Ooi, A., Oda, Y., Nakanishi I. (2002) Protein overexpression and gene amplification of *c-erbB-2* in breast carcinomas: A comparative study of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.*, **33**: 21–28.
- [6] Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., Levy, R. (1997) IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.*, **90**: 2188–2195.
- [7] Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F., Meis-Kindblom, J. M. (1998) Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.*, **152**: 1259–1269.
- [8] Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., Kitamura, Y. (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, **279**: 577–580.



Fermentáció



Membránadszorpció elvén működő fehérjetisztítás/ elválasztás



Bioszeparáció ipari méretekben

Vákuum-, gőz/levegő- és forró vizes sterilizáló berendezések és rendszerek, gyógyszeripari alkalmazásra



Nagytisztaságú víz-, gőz-, és WFI-előállító berendezések, rendszerek

VÍZANALITIKA

WTW

* mobil
* laboratóriumi és
* on-line
kivitelben

PARAMÉTEREK

* pH
* redox potenciál
* kloridok
* oldott oxigén
* vezetőképesség
* hőmérséklet
* zavarosság
* BCl, KCl
* NH₄, NO₃, NO₂
* Po, P_{tot}, TOC, SAC
* automata
vízmintavevők

* TÜV
* ISO
* GLP
* 3 év garancia



WTW
redox

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA

SZÜRŐPAPÍROK MEMBRÁNSZÜRŐK SZÜRŐKARTONOK

A tradicionális minőség megújult választéka
meghíhatóságot garancia!



AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

GYORSTESZTEK



UNIVERSÁL DÜZET
INDIKÁTOR- ÉS TESZTPAPIROK
1 - 1000 mg/l

VIZUÁLIS TESZTKESZLETEK
0,01 - 100 mg/l



FOTOMETRIÁS TESZTKESZLETEK
0,001 - 1000 mg/l

MACHEREY-NAGEL MN

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA ELÉRHETŐ ÁRON

Chromatography

Bioanalysis

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

KÖRNYEZETVÉDELMI MÉRÉSTECHNIKA



AKTIVIT Kft.

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



VÍZANALITIKA LABORTECHNIKA

AKTIVITV TESZTPAPIROK

pH - PAPIROK

ELNEDVEZTESZTPAPIROK

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

MACHEREY-NAGEL - DÜREN MN

Az ELEMENTAR GmbH.

VARIO elemanalizátor családja

- vario EL III
20.000 g/m² szűrőanyag
10.000 g/m² szűrőanyag

- vario EL TRACE
4.2 literes szűrőanyag
1 literes szűrőanyag

- vario EL liquid injection
20.000 g/m² szűrőanyag
10.000 g/m² szűrőanyag

- vario trace liquid injection
4.2 literes szűrőanyag
1 literes szűrőanyag

ELEMANALIZIS FELSOROKON

- vario EL IRMS
20.000 g/m² szűrőanyag
10.000 g/m² szűrőanyag

- vario MAX
20.000 g/m² szűrőanyag
10.000 g/m² szűrőanyag

- vario MAX IRMS
20.000 g/m² szűrőanyag
10.000 g/m² szűrőanyag

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

NITROGÉN / PROTEIN tartalom mérése

Dumas módszer szerinti egyetessel,
automata analízátorokkal

Rapid N

Vario MAX

A Dumas módszer előnyei:

- * Gyors (1 perc)
- * Tökéletesen
- * Abszolút pontos
- * Pontos ismételt mérés
- * Nagy mintamennyiség
- * Robosztus
- * Felülvizsgálható

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

MEGBIZHATÓ EREDMÉNYEK A TEREPEN CSUCSMINŐSÉGŰ ESZKÖZÖKKEL

AKTIVIT Kft.
H-1145 Budapest, Pétóvárad u. 14.
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

Tesztfejlesztés automatizált környezetben

Assay development for robotic workstations

Baki Andrea, Bielik Attila, Molnár László,
Keserű György Miklós

Richter Gedeon Rt., HTS laboratórium,
1475 Budapest, Pf. 25

Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Keserű, M.
György

Richter Gedeon Rt., HTS Laboratory,
H-1475 Budapest Pf. 25, Hungary

Összefoglalás

Jelen munkában egy automatizált kinázteszt példáján mutatjuk be saját fejlesztésű, homogén tesztek automatizált megvalósítására alkalmas robotizált munkaállomásunkat. Részletesen szólunk a már validált teszt robotizált munkaállomásra való adaptálásáról, futtatásáról, valamint érintjük az adatkezelés és kiértékelés kérdéskörét. Összefoglaljuk a manuális eljárás automatizált környezetre történő átültetésének általánosítható tapasztalatait is.

Summary

The development of our new, open-architecture robotic workstation, its scheduling software and the corresponding data cartridge is reported. Adaptation of the validated manual kinase assay was carried out successfully. Steps of the adaptation, run of the assay and data handling is described in details. General guidelines for the adaptation process are provided.

Bevezetés

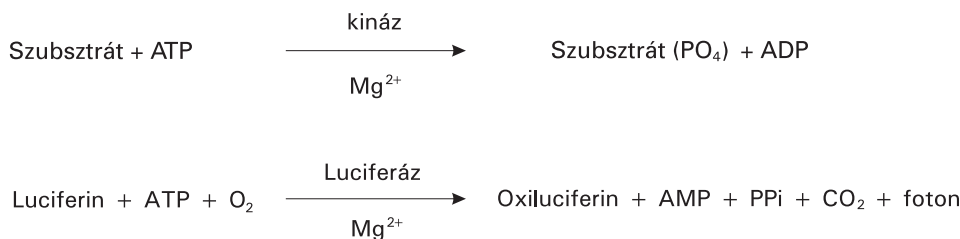
A nagy áteresztőképességű tesztelés (*high throughput screening*, HTS) napjainkra a gyógyszerkutatás széles körben alkalmazott eszközévé vált, a gyógyszeripar minden jelentősebb szereplője alkalmazza felfedező kutatásában. A technológia megszületése után jelentős tapasztalatoknak kellett összegyűlniük ahhoz, hogy a kezdetben kialakult kép mára jelentősen megváltozzék [1,2]. A többmillió vegyületárakat nagy kapacitású mérőlemezekon szűrni képes ultra-HTS rendszerektől inkább az egyszerűbben üzemeltethető, flexibilisebb és jóval olcsóbb, robotizált munkaállomások alkalmazása felé fordult a gyógyszeripar. Ezt a folyamatot segítette a kémiai és biológiai információs rendszerek, valamint a számítógéppel segített felfedező kutatás és a kombinatorikus kémia fejlődése. Ezek a változások lehetővé tették, hogy a robotizált munkaállomásokon megvalósított HTS megfelelően szelektált, néhány százezres vegyületárakra gyorsan szolgáltatasson megbízható eredményeket. Ezen eredmények – kémiai informatikai eszközök alkalmazásával – hatékony forrásaivá váltak a vezérmolekula-optimalás kutatási fázisának [3]. Jelen munkában egy kinázteszt példáján lépésről lépésre bemutatjuk a validált teszt robotizált munkaállomásra való adaptálását, futtatását, valamint érintjük az adatkezelést és kiértékelést is.

Módszerek, eszközök

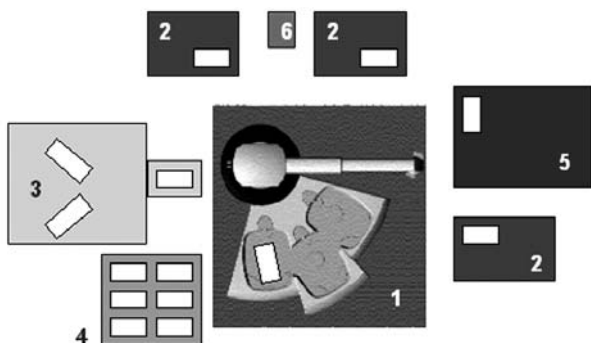
A kinázaktivitás meghatározásához a Promega által forgalmazott Kinase-Glo™ reagenskészletet használtuk [4]. A módszer a szubsztrát kináz katalizálta foszforilációja során fel nem használt, ún. „reziduális” ATP lumineszcens visszamérésén alapul. A luciferáz enzim által katalizált luciferin oxidációjához ATP-t használ fel, és a reakció során fotonemisszió következik be (1. ábra). A reagenskészletet úgy optimalták, hogy a luciferáz–luciferin reakció során fellépő fotonemisszió arányos a reakcióban felhasznált ATP mennyiségével.

A kinázaktivitás mérését 25 µM polipeptid szubsztrát-koncentráció, 1 µM ATP és 10 nM enzimkoncentráció mellett, 40 µl végtérfogatban, 30 °C-on végeztük. A reakcióidő 30 perc volt. A reakcióhoz használt puffer összetétele: 50 nM HEPES pH=7,5; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 15 mM magnézium-acetát. A vegyületek tesztelése 10 µM koncentrációban, 96 lyukú fekete mérőlemezen történt. A kinázaktivitást a reakcióeleggyel megegyező térfogatú Kinase-Glo™ reagens hozzáadásával állítottuk le, majd a keletkezett lumineszcenciát BMG Polarstar Optima készülékkel detektáltuk.

A Kinase-Glo™ reagenskészletet a Promega (V6712), a mérésekhez használt egyéb reagenseket a Sigma cégtől szereztük be. A teszt beállítása,



1. ábra A kináz és luciferáz enzimek által katalizált, lumineszcens jelet szolgáltató folyamat reakciósémája.



2. ábra Az automatizált mérőrendszer elrendezése. Zymark Twister II központi robotkar három mérőlemez tartóval (1), Labsystems Multidrop folyadékadagoló (2), Kendro Cytomat 2C automata termosztát (3), szoba-hőmérsékletű átmeneti tároló (4), BMG Polarstar Optima több leolvasási módot támogató mérőlemez-leolvasó (5), vonalkód-leolvasó (6).

adaptálása és futtatása során a laboratóriumunkban összeállított automatizált munkaállomást használtuk (2. és 3. ábrák).

3. ábra (lásd a címlapon) Robotizált tesztelés az AssayStation munkaállomáson.

A teljes rendszert egy, összesen tíz soros csatolót tartalmazó személyi számítógép vezérli Windows 2000 operációs rendszer alatt. A robotkart és a készülékeket a saját fejlesztésű ütemező (*scheduler*) program irányítja [5]. Az ütemezőprogramban egy fejlett prioritáskezelő algoritmust használtunk, amely képes a magasabb prioritású feladatok megkülönböztetett kezelésére, azok időtartamainak pontos betartására.



Baki Andrea 1990-ben szerzett gyógyszerész oklevelet a kolozsvári Orvos- és Gyógyszertudományi Egyetemen. 1992-től egyéves ösztöndíjjal az MTA Enzimológiai Intézetében dolgozott. 1993–1996 között az ELTE TTK szerkezeti biokémia doktori iskola hallgatója. PhD-fokozatát 1998-ban védte meg. 1997 óta a Richter Gedeon Rt. munkatársa.

Bielik Attila 1991-ben szerzett vegyészmérnöki diplomát a Budapesti Műszaki Egyetemen. Azóta a Richter Gedeon Rt. munkatársa. Kezdetben preparatív szerves kémiai munkát végzett, majd automatizált kombinatorikus kémiával foglalkozott. 2003 óta a HTS laboratórium munkatársa.



Molnár László 1995-ben szerzett vegyészmérnöki diplomát a Budapesti Műszaki Egyetem vegyészmérnöki karán. 1995–1998 között szoftverfejlesztőként dolgozott a Medexpert Kft.-nél. 1998-tól a Richter Gedeon Rt. munkatársa. PhD-értekezését 2003-ban védte meg „Farmakokinetikai paraméterek előrejelzése számítógépes módszerekkel” címmel.



Keserű György Miklós 1991-ben szerzett vegyészmérnöki diplomát a Budapesti Műszaki Egyetemen. Akadémiai doktori címét 2003-ban szerezte meg. 1996 és 1999 között a Chinoin Rt. laboratóriumvezetője, 2000-től a Richter Gedeon Rt. molekulatervezési osztályvezetője. 1994 óta a BME Kémiai Informatika Tanszék munkatársa, jelenleg egyetemi magántanár. Kutatási területe a számítógépes molekulamodellezés, gyógyszertervezés, valamint virtuális és valós nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerek.



Eredmények

Alapfeltételek

Első lépésben vizsgáltuk az enzim működésének optimális feltételeit, amelyek lehetővé tették aktiválásának, illetve a tesztelt vegyületek gátló hatásának optimális jel-zaj viszony mellett történő kimutatását. Meghatároztuk az optimális ATP-, szubsztrát- és enzimkoncentrációkat, valamint vizsgáltuk a detektálható lumineszcens jel stabilitását. Kísérleteink alapján a méréseket 25 μM szubsztrát-, 1 μM ATP- és 10 nM enzimkoncentráció mellett hajtottuk végre.

Az optimált paraméterek mellett megmértük három referenciavegyület IC_{50} -értékét, és ezeket összehasonlítottuk a ^{32}P -ATP módszerrel általunk meghatározott, illetve a szakirodalomban leírt IC_{50} -értékekkel. A különböző módon meghatározott értékek jó korrelációt mutattak egymással és az irodalmi adatokkal (I. táblázat).

A stabil és validált eljárás birtokában feladatunk a teszt automatizált megvalósításra alkalmas változatának fejlesztése, azaz a manuális eljárás adaptációja volt. A sikeres adaptáláshoz az alábbi követelményeknek kell megfelelni: 1. A laboratórium céljai világosan rögzítettek, az egyes programok prioritása meghatározott. 2. A méretnövelés mértéke meghatározott. 3. A hagyományos eljárás stabil, teljesen dokumentált és jellemzett. 4. Készség és képesség a hagyományos eljárás eszközeinek megváltoztatására, kompromisszumkészség.

A Richter Rt. kutatási programjainak hatékony támogatása érdekében a laboratórium működését éves munkaterv szabályozza, a vizsgálandó alkönyvtárakból szűrési vegyületkönyvtárat hoztunk létre és tartunk fenn. A kidolgozott tesztet részletesen, minden lényeges paraméter tekintetében megvizsgáltuk, validáltuk, a projekt tagjainak

dokumentált formában átadtuk. A laboratórium diplomás és fizikai dolgozói a szükséges szaktudással és tapasztalatokkal rendelkeztek, az előttük álló feladatot megismerték, a megvalósítás módját és célját elfogadták és készek voltak arra, hogy az eljárást mintegy 40000 mérési pont/nap hatékonyságú módszerré fejlesszék.

A teszt adaptálása robotizált munkállomásra

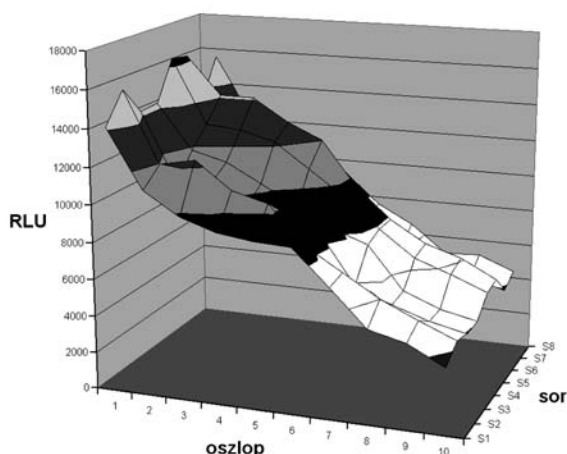
Előjáróban fontos leszögezni, hogy egy automatizált környezetre adaptált teszt szükségképpen különbözik a hagyományos eszközökkel végzett mérestől. Vegyük sorra az automatizált megvalósítás során felmerülő leggyakoribb problémákat.

Folyadékadagolás

Az automatizált megvalósítás során alkalmazott pipetták kivételükben, bemérési pontosságukban és működési elvükben is különböznek a manuális eljárásokban alkalmazott eszközöktől. Mindezek miatt az automatizált folyadékadagolás gyakran lehetetlenné teszi a hagyományos eljárások során alkalmazott laboresszközök (reagenstartók, pipettahegyek, reakcióedények stb.) felhasználását. Esetünkben a folyadékadagolás különbözőségei egyrészt az adagoló eszközök pontosságának különbségeiből adódnak, másrészt az adagolt oldatok koncentrációviszonyainak időbeli változásából származnak. Az általunk használt rendszer beállítása során a mért értékeknek a mérőlemez hossztengeleje irányában történő graduális változását figyeltük meg. A paraméterek szisztematikus vizsgálatával megállapítottuk, hogy az effektus az ATP-oldat adagolásával volt összefüggésben. Automata folyadékadagolóval dolgozva az oldat néhány milliliternyi mennyisége mindig az folyadék szállító csőben marad holtterfogatként. Ugyan az ATP-

I. táblázat Referenciaanyagok irodalomban leírt és általunk meghatározott IC_{50} -értékei

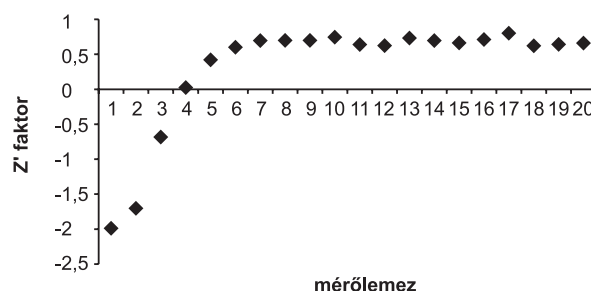
Referenciavegyület	Irodalmi IC_{50}		Mért IC_{50}	
	Radioaktív módszer (μM)		Radioaktív módszer (μM)	Lumineszcens módszer (μM)
Ref 1.	2,000		0,990	1,300
Ref 2.	0,077		0,132	0,103
Ref 3.	0,104		–	0,187



4. ábra Az ATP bomlása miatt kialakuló graduális intenzitáskülönbségek egy mérőlemezen

oldatot tartalmazó edény folyamatosan hűtött, a holttérfogat nincs hűtve, így az abban maradó ATP bomlik, koncentrációja csökken. Mivel az egy mérőlemeze adagolt ATP-oidat összmenyisége összemérhető a holttérfogattal, a mérőlemezen graduális intenzitásváltozás alakul ki (4. ábra). E nehézség megoldásaként a folyadék szállító csövet minden egyes adagolás után automatikusan visszaürítettük az ATP-oidatot tartalmazó edénybe, így a teljes ATP-oidatot folyamatosan hűtött körülmények között tudtuk tartani. A folyadék szállító csövek visszaürítése következtében azokat minden adagolás megkezdése előtt újra fel kell tölteni az adagolandó oldattal (*automatic prime*). Mivel az általunk használt folyadékadagoló perisztaltikus elven működik, az újrafeltöltés biztonsággal csak a holttérfogat többszörösével végezhető el. Az enzim adagolásánál a holttérfogatból adódó problémák nem jelentkeztek, mivel az erre a célra alkalmazott készülék (Multidrop micro) holttérfogata lényegesen kisebb, mint az ATP és a szubsztrát egyidejű adagolására alkalmas adagolóé (Multidrop384). Jóllehet az enzim aktivitása – kismértékű bomlás következtében – időben némileg csökken, ez a folyamat jól kézben tarthatónak bizonyult. Rendre kb. 15 mérőlemeze elegendő enzimoldatot készítve az enzim előbb fogyott el, minthogy aktivitása jelentősen csökkent volna.

A folyadékadagolásokkal kapcsolatba hozható másik probléma az egyes lemezekon mért aktivitások megbízhatóságára jellemző jóság faktorok időfüggése volt. A rendszer indítását követő első öt mérőlemez Z' jósági faktora [6] a minimálisan elvárt 0,5-



5. ábra A Z' faktorok változása a testben vizsgált mérőlemezek számának függvényében.

ös érték alatt maradt úgy, hogy a mért lemezek számával monoton növekedve tartott a már elfogadható tartományba (5. ábra). Kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a jelenség oka az, hogy az enzim kitapad a folyadékadagoló szállítócsöveinek belső falára. A jelenség csak indításkor, tranzienst jelleggel alakul ki, pufferral frissen átmosott csövek esetében átlagosan öt mérőlemeznyi oldat adagolása alatt áll be az egyensúly. A frissen érkező enzimoldatból felépül a csövet borító enzimréteg, ami a továbbiakban egyensúlyban marad az átfolyó enzimoldattal. A nehézség megoldása az adagolandó oldattal az indítás előtt történő bőséges átmosás, ami az enzimoldat tetemes anyagköltségét tekintve pazarlásnak tűnhet, így azonban elértük, hogy elégtelen enzimadagolás miatt ne kelljen lemezeket újramérni.

Inkubálás

A tesztadaptálás további jellemző problémája az inkubáció. Az automatizált tesztekhez használható robotizált inkubátorok általában sokkal drágábbak a hagyományos eszközöknél, ugyanakkor integrálásuk sokszor nem egyszerű, mivel az integrálási probléma ez esetben két robotkar együttműködésére vezethető vissza. Ezen szempontok miatt számos esetben célszerű *off-line* inkubáláshoz folyamodni, a Richter Rt. HTS laboratóriumában megvalósított nyílt architektúrájú vezérlőprogram azonban az automata inkubátor integrálását rutinfeladattá egyszerűsítette. Az inkubációval kapcsolatban általában két kérdés merül fel: egyrészt az inkubációs idő pontos betartása, másrészt a testtér fogat, illetve a tesztkoncentráció állandóságának biztosítása. A tesztkoncentráció változása az inkubáció során a párolgásból ered, amit a mérőlemezek lefedésével lehet megakadályozni. A mérőle-

II. táblázat Az egyes készülékekben mérőlemezek által töltött idők átlaga és szórása

	Multidrop2	Multidrop3	Cytomat	Multidrop4	RT inkubáció	BMG	Összes idő
tartózkodási idő (sec)	203±5	56±3	1717±4	74±8	680±12	207±6	2937±19

mezek lefedése, automatizált környezet esetén bármilyen módon is történjék (műanyag mérőlemez-tető, fólia stb.), újabb eszköz meglétét és integrálását feltételezi. Tekintetbe véve, hogy a mérőlemezek lefedésére alkalmazható eszközök általában drágák, a legtöbb esetben ezt a feladatot *off-line* módban oldják meg, vagy igyekeznek olyan teszt-körülményeket beállítani, ahol a lemezek lefedése elkerülhető. Esetünkben ez utóbbi utat választottuk: a koncentrációt úgy kívántuk állandó szinten tartani, hogy az inkubátor belsejében megfelelő víztenziót biztosítottunk. Mérésekkel igazoltuk, hogy az általunk használt tesztprotokoll esetében az inkubátor atmoszférájának víztenzióját állandó szinten tartva nem lép fel a mérési hibahatárnál nagyobb különbség a lefedett és le nem fedett mérőlemezek között rögzített adatok között.

Enzimreakciók esetén alapvető fontosságú, hogy pontosan betartsuk a reakcióidőket. A méréseket kézzel végezve ez nem okoz gondot, hiszen egy mérőlemezen belül az inkubációs idők megegyeznek. Automatizált mérőlemez-mozgatás esetén azonban fontos, hogy az időzítőprogram a rendszerben egy időben több mérőlemezzel dolgozva is képes legyen minden esetben közel azonos időtartamú inkubálásokat biztosítani. Az általunk létrehozott időzítőprogramban ezt a problémát a prioritási rend bevezetésével oldottuk meg. A teszt egyes részfolyamataihhoz különböző prioritásokat rendelve az időzítőprogram képes két, azonos időben felmerülő tennivaló között választani azok prioritása alapján, így a magasabb prioritású inkubációs lépés, az inkubátorba történő mérőlemez-behelyezés, valamint az onnan történő mérőlemez-eltávolítás tekintetében előnyt élvez a többi részfolyamathoz képest. A II. táblázat tartalmazza a mérőlemezek által a különböző készülékekben eltöltött időt, valamint azok szórását egy tízórás tesztfutás adatai alapján. A mérőrendszerrel tíz óra alatt 141 mérőlemez mértünk meg, ez összesen 13536 mérési pontot jelent. Amint a II. táblázat adataiból látható, az időkritikus inkubációs lépés időtartamát az időzítőprogram a prioritáskezelés segítségével

négy másodperces szórással tudta tartani a tízórás futás során, ami meghaladja a kézi mérőlemez-kezeléssel elérhető pontosságot.

Detektálás

A hagyományos mérések elvégzésére alkalmas leolvasók nem minden esetben alkalmasak automatizált körülmények között történő mérésre. A minták behelyezése és mérést követő eltávolítása, a mérést vezérlő szoftver külső irányíthatósága, a rendelkezésre álló kommunikációs protokoll, illetve ennek integrálhatósága gátat szabhat az adott leolvasó alkalmazásának. A hagyományos eljárás fejlesztése során alkalmazott leolvasó – esetünkben a robotkar – fizikai korlátai és a leolvasót vezérlő szoftver sajátosságai miatt nem volt alkalmas az automatizált megvalósítás támogatására. E körülmény arra készítetett bennünket, hogy az automatikus megvalósítás során egy új, többfunkciós leolvasót használjunk (BMG Polarstar), amelyet a robotkar képes kiszolgálni. A leolvasó Windows operációs rendszer alatt futó vezérlőprogramját DDE protokoll alapján hajtottuk meg. Ez a megoldás az automatikus mintaváltáson és adatgyűjtésen túl a keletkezett mérési adatok mentését is lehetővé tette. A leolvasóváltás az adaptálási folyamat egyik legkritikusabb állomásának bizonyult, lévén az optimális jel-zaj viszony eléréséhez számos, a készülékre jellemző mérési paramétert kellett megvizsgálnunk. Végezetül a validációs protokoll ismételt végrehajtásával meggyőződünk a készülék automatizált eljárásban való alkalmazhatóságáról.

Egyéb tényezők

Az automatizált mérőlemez-kezelés során számos hibalehetőségre kellett felkészülnünk, melyek közül a legfontosabbak a következők: mérőlemez-azonosítási hiba (a vonalkód-leolvasó nem olvasta le a mérőlemez azonosítóját), adagolási hibák (reagenskifogyás), a tárolóhely betelése, vészleállítás. Ha vonalkód-leolvasási hiba merült fel, kézi beavatkozással rendeltük a mérőlemez azonosítóját a többfunkciós leolvasó által előállított eredményfájlhoz. Ezt viszonylag egyszerűen meg tudtuk

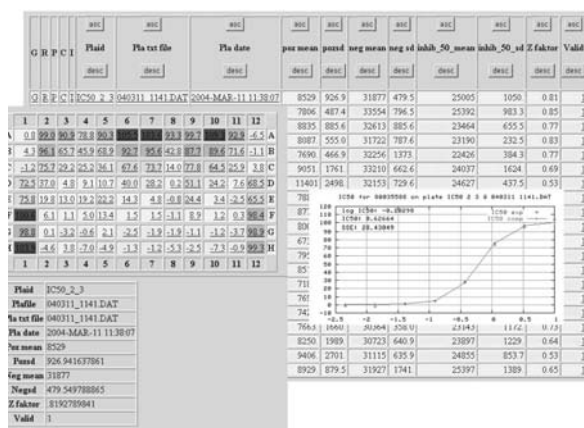
tenni, hiszen a mérőlemezek sorrendje a bemeneti, illetve a kimeneti mérőlemez-tárolóban fordítottan megegyezik. A kimeneti tároló betelése vagy a reagensek elfogyása emberi tényezők miatt következhet be. A reagensek nem megfelelő adagolása az érintett mérőlemezek újramérését eredményezi, hiszen a mérés megbízhatóságát jellemző Z' faktor értéke alacsony lesz. A kimeneti tároló telítődése az időzítőprogram azonnali leállítását eredményezi, így ez a vészmeállással egyenértékű. A vészmeállás esetére kidolgozott eljárás szerint a robotkar által a mérőrendszerbe már bejuttatott, de még meg nem mért mérőlemezeket a leállított rendszerből eltávolítottuk, és azokat újra összeállítva az újramérésekkel együtt mértük le. Erre azért volt szükség, mert az időzítőprogram leállításával az összes időadat elvész, így a reakcióidők tartását a továbbiakban már nem lehet biztosítani.

A mérőlemez-leolvasó által mért adatok a mérőlemez azonosítóját is tartalmazó szövegfájlba kerülnek. A szövegfájlokat egy Linux operációs rendszerű adatbázisszerver fogadja hálózaton keresztül, ahol egy Tcl/Tk nyelven írt program a mért nyersadatokat és az azokból számított értékeket elhelyezi egy Oracle adatbázisban. A felhasználók számára az adatbázis adatait, numerikusan és grafikusán egy webalapú alkalmazás jeleníti meg (6. ábra), amely összeköttetésben áll a Richter Rt. kémiai adattárával [7].

Következtetések

Munkánk során kifejlesztettünk egy hatékony, flexibilis, könnyen kezelhető robotizált mérőállomást, mely lehetővé teszi műszakonként több mint 10000 vegyület *in vitro* tesztelését, így napi szinten akár 40000 mérési pont előállítását. Cikkünk igyekszik rávilágítani azokra a nehézségekre, amelyek az automatizált környezetre való áttérés és a teszt ilyen körülmények közötti kivitelezése során adódnak.

A korábban validált eljárás adaptálása során felmerülő problémák tekintetében megállapíthatjuk, hogy ezek javarészt már nem biológiai, biokémiai eredetűek. A folyadékadagolás nehézségei fizikai-kémiai (kitapadás), kémiai (bomlás) jelenségekre vezethetők vissza. A mérőlemez-mozgatások automatizálása térinformatikai (berendezések elrendezése), optikai (vonalkód-leolvasás), irányítástechnikai (időzítések, prioritások) nehézségeket rejt



6. ábra A mérési adatok numerikus és grafikus megjelenítése Oracle alapon web alkalmazás segítségével

magában. Az inkubálások körülményeinek biztosítása (reakcióidő, hőmérséklet stb.) a fizikai-kémia, a mérőlemezek leolvasása, a jel-zaj viszony optimalása pedig a fizika, a méréstechnika és az informatika területeit érinti.

A rendszer eredményes működtetéséhez, az erőforrások hatékony kihasználásához a gazdasági, folyamatirányítási elvek, tapasztalatok tudatos alkalmazása szükséges. Végül, de nem utolsósorban, a rövid idő alatt született, nagy mennyiségű adat kezelése, feldolgozása speciális és hatékony informatikai megvalósításokat kíván.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak Horváth Zoltánné és Reicska Krisztina technikusoknak a teszt beállítása, adaptálása és a kampány megvalósítása során nyújtott segítségükért.

Irodalomjegyzék

- [1] Keserű, G. M. (2004) A nagy áteresztőképességű tesztelés szerepe a gyógyszerkutatás korai stádiumában. *Acta Pharm. Hung.*, **75**: 5.
- [2] Greiner, I., Keserű, G. M., Szombathelyi, Zs. (2004) Nagy áteresztőképességű módszerek a gyógyszerkutatásban. *Magy. Kém. Lapja*, 207.
- [3] Fox, S., Farr-Jones, S., Sopchak, L., Boggs, A., Comley, J. (2004) High-throughput screening: searching for higher productivity. *J. Biomol. Screen.*, **9**: 354–354.
- [4] Koresawa, M., Okabe, T. (2004) High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2**: 153–160.
- [5] Bánki, Zs., Báthor, M., Molnár, L., Bielik, A., Keserű, G. M. (2004) AssayStation: a flexible, open-architecture robotic workstation for homogeneous assays. *J. Assoc. Lab. Autom., közlésre beküldve*.
- [6] Zhang, J. H., Chung, T. D., Oldenburg, K. R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.*, **4**: 67–73.
- [7] Molnár, L., Vágó, I., Fehér, A. (2003) Construction of a Linux based chemical and biological information system. *Mol. Div.*, **7**: 61–67.



SIGMA-ALDRICH

ÁLLÁSHIRDETÉS

A Sigma-Aldrich piacvezető szerepet tölt be a kutatási vegyszerek gyártása és forgalmazása területén.

A magyarországi leányvállalat munkatársat keres területi képviselői munkakör betöltésére.

Jelentkezését várjuk: Sigma-Aldrich Kft. • 1399 Bp. Pf. 701/400 • info@sigma.sial.hu

Elvárások:

- felsőfokú végzettség az élettudományok területén – laboratóriumi, kereskedelmi gyakorlat előnyt jelent
- felelősségteljes, kreatív, önálló munkavégzés
- angolnyelv-tudás
- jó kommunikációs és szervezőképesség
- jogosítvány, mobilitás
- felhasználói szintű számítógépes ismeret

Feladatok:

- személyes kapcsolattartás jelenlegi és leendő partnereinkkel

- szakmai képviselet kiállításokon, rendezvényeken
- a piac folyamatos figyelemmel kísérése
- szaktanácsadás, konzultáció

Kínálatunk:

- teljesítményorientált, versenyképes jövedelem
- gépkocsi, mobiltelefon
- csapatmunka kiváló feltételekkel
- folyamatos szakmai fejlődés

A jelentkezéshez szakmai önéletrajzot és motivációs levelet (magyar és angol nyelven) kérünk csatolni.

HIBAIGAZÍTÁS – ERRATUM

Folyóiratunk előző (2004. szeptemberi) számában sajtóhiba fordult elő: az egyik publicisztikai írás mellől – a nyomdai előkészítésbe csúszott sajnálatos pontatlanság miatt – lemaradt a szerző neve. A közlemény szerzője a szám tartalomjegyzékében megtalálható, így szerencsére nem tűnhetett úgy, hogy az írás névtelen. Kiigazításképpen ezúton utólag közöljük, hogy a XXVIII. évf. 3. szám 69–72. oldalán szereplő „Tűpárna” című írás szerzője **Darvas Béla**. A hibáért elnézést kérünk a szerzőtől, az írás által érintett Baintner Károlytól, valamint minden olvasónktól, akinek a sajtóhiba esetleges fennakadást okozott.

Tisztelt Tagtárs!

Kérjük, hogy a mellékelt csekken a 2005. évi tagdíjat befizetni szíveskedjék. Egyesületi tagoknak: 4000 Ft; PhD-hallgatóknak: 1500 Ft; nyugdíjasoknak: 500 Ft

Kérjük azokat, akik tagdíjukat nem postai csekken, hanem banki átutalással rendezik, az átutalási megbízás másolatát küldjék el címünkre, mert csak így tudjuk az átutaló személyét azonosítani.

Boldog Karácsonyt, és eredményekben gazdag új esztendőt kíván a

MBKE Intéző Bizottsága.



Az Agilent Technologies Inc. génexpresszió-vizsgálati rendszere

Napjaink *microarray*-technológián alapuló kutatásában különösen fontos a naprakész genetikai információ: a betegségek biológiai lefolyásának megismerését és az asszociált új célgének meghatározását nagymértékben lelassíthatja, ha elavult géntartalmú *chip*et alkalmazunk. A génkutatás területén az új eredmények mindennaposak, ezért érdemes olyan *microarray*-t használni, melynek tartalma lépést tart a fejlődéssel. A védjegyzett *SurePrint* nyomtatási technológiának, valamint a géntartalom frissítésében közreműködő jelentős ipari együttműködéseknek köszönhetően lehetővé vált, hogy az Agilent Technologies az elérhető legnaprakészebb *microarray* rendszereket kínálja a jövő kutatásának.

Agilent *SurePrint* nyomtatótechnológiával gyártott *microarray chip*

A *SurePrint* nyomtatótechnológiával gyártott *chip* (1. ábra) nagy rugalmasságú, ipari tintasugaras *microarray*-nyomtatással folyamatos minőség-ellenőrzés mellett készül annak érdekében, hogy kiváló minőségű 60 bázis hosszúságú oligomer *microarray chip*ek kerüljenek piacra, melyek egyedülállóak megbízhatóság, reprodukálhatóság és összetétel szempontjából. Az Agilent 60-as oligomer *microarray* 5-8-szor érzékenyebb, mint a 25 bázis hosszúságú oligomerformátum, ennek segítségével tehát olyan gének is vizsgálhatók, amelyek alacsony kópiaszámban expresszálódnak a sejtben. Az Agilent *microarray chip*ek az alacsonyabb háttérzaj miatt előnyösebb kísérletkivitelezést tesznek lehetővé.

A *SurePrint* nyomtatótechnológián alapuló, helyben (*in situ*) történő oligomerszintézis lehetővé teszi a *microarray*-összetétel gyors megváltoztatását, így lépést tartva a genetikai tartalom és a gének annotálásának folyamatos bővülésével. Különösen kedvez ez azoknak, akik saját felhasználói *array*-t akarnak tervezni, hiszen az Agilent az egyedi Hewlett Packard szabadalmon alapuló nyomtatótechnológiának köszönhetően ezt kiváló minőségben el tudja készíteni. Ez a nyomtatótechnológia nem igényli maszkok előzetes elkészítését – így új összetételek, valamint a meglévők finomítása gyorsan

és kisebb költséggel valósíthatók meg, mint más kereskedelmi forgalomban lévő vagy házilag gyártott *array*-k esetében. A jelenleg elérhető *chipek*: teljes emberi genom, egér, patkány, élesztő, rizs, *Arabidopsis*, *Magnaporthe*.

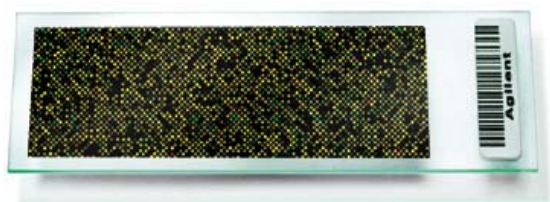
Felhasználói oligo *microarray* program

Specializáltabb *microarray*-kísérletek esetében kihasználhatók az Agilent felhasználói 60-as oligomer *microarray* előnyei. Az Agilent igény szerinti *microarray chip*ek gyártását vállalja, s ehhez közérthető *microarray*-tervezősémákat és konzultáló szolgáltatást biztosít, amely felgyorsítja a felhasználói *microarray chip*ek tervezésének folyamatát. Ezen felül létezik számos különböző sűrűségű *array*formátum – 44.000-től a 2x8000 pontot tartalmazó *array*-ig.

Mintaminőség-ellenőrzés a megbízhatóbb eredmények érdekében

Az Agilent 2100 Bioanalyzer műszere az RNS LabChip® reagenskészlettel együtt ténylegesen az RNS-minta minőség-ellenőrzési szabványa lett. A hagyományos gélelektroforézishez képest nagyobb hatékonyságot és egyedülálló pontosságot lehet elérni az RNS-integritás és az RT-PCR-termékek vizsgálatában – mindezt nagyobb érzékenységgel és a hagyományos gélelektroforézishez képest kisebb mintaigénnyel (1 µl), valamint az azonnali digitalizált feldolgozás miatt is lényegesen gyorsabban valósítja meg.

A rendelkezésre álló reagenskészletek: 1) RNS 6000 *Nano LabChip kit* – kimutatási határa 5 ng teljes RNS; 2) RNS 6000 *Pico LabChip kit* – kimutatási határa 200 pg teljes RNS; 3) Agilent DNS, sejt- és fehérjevizsgáló *LabChip kiték*. Ezenfelül a 2100 Bioanalyzer műszer az *array*kísérlet további munkafázisaiban is jó szolgálatot tesz, hiszen a jelölt cDNS- és cRNS-próbák mennyiségét, tisztaságát és fragmentáltságát is képes meghatározni, emellett az *array*kísérlet után génvalidálásra is alkalmazható. A műszerről részletesebb információt talál a *Biokémia* folyóirat korábbi számában [1].



1. ábra Agilent tintasugaras nyomtatótechnológiával készült microarray chip.

Microarray minta-előkészítés, hibridizálás elejétől végig, optimalizált microarray reagenskitek

Az Agilent speciális *microarray* reagenskítjei lehetővé teszik, hogy Cyanine-3 és Cyanine-5 festékekkel jelölt nukleotidok épüljenek be a cDNS-, illetve cRNS-molekulákba. A felerősítési lépésnek köszönhetően – amely szekvenciára és kiindulási mennyiségre való tekintet nélkül az egyes expresszáldó szakaszokat 240-szeres mennyiségre szaporítja fel – a kiindulási mintából elegendő 50 ng mRNA, hogy a hibridizáláshoz elegendő mennyiségű cRNS-t kapjunk. A hibridizálás ideális körülményeit az Agilent *Hybridization Plus* optimalizált hibridizációs puffereket, blokkolóanyagokat és kontroll *target* DNS-eket tartalmazó *kit*-je biztosítja.

Microarray-leolvasás kiváló minőségben

Az Agilent *SureScan* technológiája automatizált, kettőslézer-leolvasással rendkívül pontos és megbízható detektálást tesz lehetővé (2. ábra). A tapasztalati úton kifejlesztett *SureScan* technológia dinamikus autofókuszot használ a leolvasás közben, amely folyamatosan a fókuszszíkba igazítja az *array*-t hordozó, egyenetlen felületű üveglemezt. Ez az érzékenység területén és a leolvasási technológia megbízhatóságában lényeges előnyt jelent. A PMT beállítási funkció lehetővé teszi a telítésben lévő pontok pontos intenzitásmeghatározását is. Automata lézerteljesítmény-szabályozó is rendelkezésre áll, amely kiküszöböli a lézerteljesítményben jelentkező egyenetlenségeket, ami gyakran előfordul más, lézerral működő rendszerek esetében. A statisztikai pontelemző programból kapott proceszszált hatalmas mennyiségű adatnak a Rosetta Bioinformatics által kifejlesztett *Luminator* program ad értelmet, segítségével a szignifikánsan változó gének kinyerése mellett clusteranalízis, ANOVA és egyéb statisztikai elemzések végezhetőek. Az



2. ábra Agilent microarray-leolvasó.

Agilent *microarray*-leolvasót vezérlő *Feature Extraction* program gyors és hatékony adatkinyerést tesz lehetővé (kevesebb mint 1 perc szükséges az Agilent 22.000 oligo *microarray* pontanalíziséhez).

A Hewlett-Packard a számítástechnikai és a mérés-technikai ágazatát 1999-ben függetlenítette egymástól, ekkor jött létre az Agilent Technologies. Az Agilent Technologies Inc. a világ egyik vezető cége a folyadék- és gázkromatográfiában, tömegspektrometriában használatos műszerek, valamint a mikrofluidikán alapuló és a génexpressziós profil meghatározására alkalmas készülékek gyártásában [2].

Irodalomjegyzék

- [1] Andrásfalvy, M. (2004) Új megoldás DNS, RNS és fehérje kapillár-elektroforetikus vizsgálatára. *Biokémia*, XXVIII: 20–21.
- [2] <http://www.agilent.com>

Andrásfalvy Márton
Kromat Kft.
1124 Budapest, Sirály utca 3.
Tel.: 248-2110
E-mail: marton.andrasfalvy@kromat.hu



Fata Norbert 1975-ben született Pincehelyen. A Théba Művészeti Szakközépiskola alkalmazott grafikai szakán végzett, a Szálkai és Gyermelyi Szabadiskola tagja, valamint a Mártélyi Szabadiskola alkalmi látogatója. Tanulmányai mellett az autodidakta képzést tartja a legfontosabbnak, nem leragadva egyetlen körben sem – inkább több technikát, módszert és társaságot megismerve –, saját hitvallása szerint a negatív kritikán kívül ez inspirálja. Závodszy Ferenc (Zsöti) így ír róla:

„Először csak Halász Géza miatt kerestem meg a képeit. Nekem igen tetsző képeket láttam, így néztem aztán utána, ki az alkotójuk. Fata Norbert – még harmincon inneni – fiatal festő. Abban mindenféleképpen egy húron pendülünk, hogy én is a gyerekeimet tartom legerősebb referenciaanyagomnak, ahogy ő is kisfiát tartja a kezében, hasonló állítását illusztrálendő. Kell még persze számomra bizonyíték, hogy képeiben az az ígéret, amit én látok, komoly tartalékokkal, a jövőben ennél elmélyültebben előjön. De az nem kevés, amit festményeiben most is látni. A világba, amit Fata Norbert teremt, én szívesen megyek be. Művészetről, tiszta, egyszerű formákról és mondjuk nem piacról szól abban a faluban a harang. Minden blaszfémiát szándékosan kerülve, meg kell jegyeznem, semmi bajom a piaccal, hiszen amikor ezeket a sorokat írom, éppen készül az aukció, ahol Munkácsy a colpachi iskolához festett tanulmányát kínálják megvételre, amiért én is sorba állnék, ha lenne rá tehetségem. Munkácsy tanulmányai az igazi remekművek. Leplezetlenül mutatkozik meg az a szellemi rend – ezt kívánja talán József Attila is –, amit a kor még megkövetelte kidolgozás aztán elfed. Ismeretlenül nem tudok



Fata Norbert, *Irány* (2002), olaj, farost

ba tart. Jelenleg talán a hitelét gyártja mindehhez, remélem az ezzel járó nagy munka nem ijeszti el, képei is inkább a bátorságáról árulkodnak. A világ, amit teremt – még ha nem előzmény nélküli is (ezen az úton nekem Rothko jutott mondjuk a legtovább) – meglehetősen biztos környezet a valódi, az igazi dolgok alkotására.”



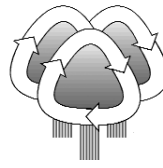
Fata Norbert, *Atom* (2003), olaj, farost

szebbet írni Fata Norbertről annál, hogy ennek a rendnek (ahogy Withehead írja: a dolgok elkerülhetetlen rendeződésében nyilvánul meg isten természete) látom a finoman megrajzolt szerkezetét, a világoskékben irányt mutató, öreg, megsárgult műszaki rajzokról idecsalt, megtépzott nyilat meg a rózsaszínbén küzdő fehér tégláit. Ha már a festő nyilat emlegettük, az gondolható, hogy ez a fiatalember jó irány-



Fata Norbert, *Merre?* (2000), olaj, farost

A Környezettudományi Központ (KTK) „Kémiai és genetikai biztonság a mezőgazdaságban” címmel 2004. szeptember 16-án konferenciát szervezett a Novotel Szálloda Liszt tanácstermében. A konferencia célja az volt, hogy neves szakértők részvételével áttekintse a mezőgazdasági vegyszerek – szűkebb értelemben a növényvédők szerek és biotechnológiai növényvédelmi módszerek – kapcsán az engedélyezés és az ellenőrzés terén európai uniós tagságunk következményeképpen beállott változásokat, bemutassa a növényvédőszer-használat környezeti és egészségügyi kockázatait, továbbá a megelőzés lehetséges módozatait. A mintegy 100 résztvevő és 13 szakmai előadó közreműködésével zajló konferencia fontos napirendi pontja volt, hogy áttekintse az élelmiszer-biztonság biotechnológiai vonatkozásait. A KTK által szervezett konferencián zömmel kutatók, egyetemi oktatók, az államigazgatás vezető szakemberei, nemzetközi szervezetek képviselői, a növényvédelem és egészségvédelem területen dolgozó szakértők, környezetvédő civil szervezetek és posztgraduális képzésben résztvevők voltak jelen. Az előadások az alábbi négy szekcióban hangzottak el: 1./ Növényvédőszer-engedélyezés, 2./ Ellenőrzés és egészségügyi kockázatok, 3./ Prevenció és kémiai biztonság, 4./ Biotechnológia és élelmiszer-biztonság. A – célkitűzése szerint a fenntartható fejlődés megvalósulását katalitikus intézményként elősegíteni kívánó – KTK célja a konferencia megszervezésével az volt, hogy fórumot teremtsen a kémiai és genetikai biztonság kérdéseivel különféle megközelítésben és szempontból foglalkozó szakemberek számára, továbbá hogy felhívja a döntéshozók és a közvélemény figyelmét arra, hogy a gazdasági haszon mellett e szerek használata károsodást is okozhat. Különösen a lassan lebomló, perzisztens (ún. POP) maradványok jelentősen károsítják az élő szervezetek immunrendszerét, hormonháztartását, rákkeltő hatásúak lehetnek, és fejlődési rendellenességet idézhetnek elő. Az utóbbi időben egyes génmódosított élelmiszerekkel kapcsolatban is felvetődtek toxikológiai/ökotoxikológiai aggályok. Cél volt az is, hogy a konferencia találkozóhelyül szolgáljon széles körű szakmai kapcsolatok, együttműködések létrejöttének, valamint az ennek szervezeti keretét biztosító Magyar Ökotoxikológiai Társaság megalakításának. A konferencia költségeit az EU Phare Access Makroprojekt Programja és a Környezettudományi Központ Alapítvány fedezte.



Környezettudományi Központ
Center for Environmental Studies

Laczó Ferenc

A „Kémiai és genetikai biztonság a mezőgazdaságban” című, a Környezettudományi Központ Alapítvány civil szervezet rendezte (1. ábra) konferencián, melyet a szakmaiság jellemezett, a hazai szakértők és a civil szervezetek képviselői egyaránt részt vettek (2. ábra). Az elhangzott előadások a konferenciakiadványban nyomtatásban is megjelentek, s a konferenciáéval azonos című, viszonylag terjedelmesnek (163 oldal) mondható könyv (3. ábra) az érdeklődők számára a KTK Alapítványnál rendelkezésre áll.

Megtudtuk, hogy az Európai Unióban a növényvédőszer-hatóanyagok engedélyeztetése úgy zajlik, hogy adott hatóanyag dokumentációja (vagyis a megkívánt toxikológiai-ökotoxikológiai vizsgálati eredmények teljes köre) bármely tagország hatóságához benyújtható, amely ezt részletesen kivizsgálja, majd – amennyiben a növényvédő szer minden kívánalomnak megfelel – hatósági javaslat alapján forgalomba hozatalra engedélyezi. Az adott ország



1. ábra A konferencia megnyitója. A bevezetőt a szervező KTK Alapítvány nevében Laczó Ferenc tartotta. Mellette az első szekció elnöke (Tompá Anna) és egyik előadója (Simon Gergely).



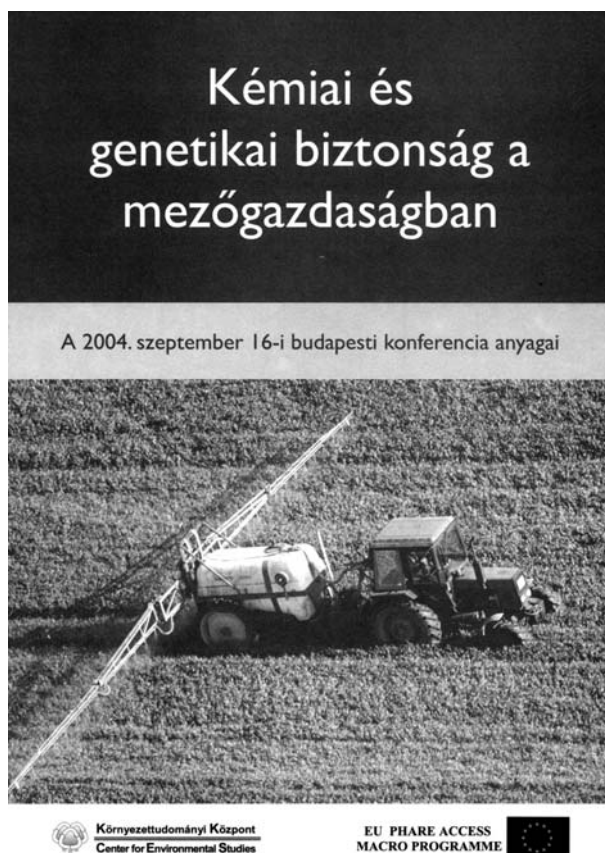
2. ábra A lelkes hallgatóság az „Ellenőrzés és egészségügyi kockázatok” szekció egyik előadására figyel.

ezáltal az adott növényvédő szerre nézve az Európai Unión belül ún. referencia-tagországgá válik, s az adott hatóanyag forgalmazását ezután a többi tagországnak is el kell fogadnia – hacsak egyedi helyi körülmények (klimatikus viszonyok, táplálkozási szokások stb.) nem indokolják, hogy az engedélyezéshez további vizsgálatokat írjanak elő. Ma már a kockázatbecslés is szerves részét képezi az engedélyeztetésnek. Az ökotoxikus hatásokat is vizsgálják, de a kis dózisu, tartós terhelések még nincsenek kellően figyelembe véve, amelyek rendkívül fontosak az immunmoduláns és endokrin hatások felderítésében. Több mint ezer anyag engedélyt is felülvizsgálja az EU, mivel ezek engedélyeztetési vizsgálatai már nem felelnek meg a mai követelményeknek. Az alapanyagok engedélyezésétől különbözik a formulázott termékek engedélyezése, mert ezekről az egyes tagországok a helyi adottságok figyelembevételével döntenek.

Magyarországon az engedélyezési eljárások és az ellenőrzések EU-konformok. Azonban nagy problémát jelent, hogy a nagyipari mezőgazdaság szétesésével a szakemberek kezéből kikerült a növényvédő szerek használata, és gyakran laikus, felelőtlen, illegális felhasználás történik. Magyarországon a növényvédőszer-maradékok kimutathatók a felszíni vizekben. Egy reprezentatív vizsgálat a minták 91%-ában kimutatott valamilyen szermaradékot. A káros hatásokat fokozza, hogy poláris anyagok megjelenhetnek az ivóvízben is, mert ezek a parti szűrési kutakon átjuthatnak. A primőr termékeknél gyakrabban találtak határértéknél magasabb mennyiségben szermaradékokat, így ezek

vizsgálatára a hatóságok nagyobb hangsúlyt fektetnek. Az utóbbi évek tendenciája, hogy a határértéktülpések száma csökkent, de a kultúrában nem engedélyezett szerek használata szaporodott. Hazánk egyes, az Európai Unióban már betiltott anyagok használatára (pl. atrazin, diklórop, fenuron) hosszabbítást kapott, mivel alkalmazásukat nélkülözhetetlennek nyilvánították. Magyarországon a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium intézi az engedélyezést és az ellenőrzést. Az engedélyeztetést jobb lenne, ha egy független, az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatalához (US EPA) hasonló szervezet végezné, ahogy ezt a skandináv államokban már megvalósították.

A konferencia fontos témája volt a genetikailag módosított szervezetek (GMO) térhódításával felépő ökológiai veszélyek. A GMO típusú növények bevezetése a terméshozamok emelkedését és az agrokemikáliák nagymérvű csökkenését ígerte, amiket az eddigi eredmények nem igazolnak egyértelműen. Úgy tűnik, hogy a GMO-k bevezetésének legfontosabb hajtóereje, hogy ezek szabadság alá esnek, így a cégek monopolárakat diktál-



3. ábra A konferencia előadásait tartalmazó kiadvány.

hatnak. A GMO-k hatalmas piaci térhódításával nem tartott lépést a bevezetésük előtti kipróbálás, az előzetes kockázatbecslés és a hatósági ellenőrzés. GMO-k bevezetésénél legalább olyan szigorú vizsgálatokat kellene folytatni, mint amilyenek a gyógyszeriparban már megszokottak. Nem elégséges az amerikai hatóságok által a lényegi azonoság elve alapján (főbb kémiai tulajdonságok megegyezése) kimondani, hogy egy GMO azonos a hagyományos növényvel. Feltétlenül *in vivo* tesztekkel kell bizonyítani a két anyag azonosságát.

A GMO típusú növények, állatok szabályozott engedélyeztetési eljárásával, forgalmával, kereskedelmével és felhasználásával az ún. Cartagena

jegyzőkönyv foglalkozik, amelyhez hazánk is csatlakozott. A jegyzőkönyv előírja, a kockázatbecslések előzetes elvégzését és a nyilvánosság tájékoztatását is kötelezővé teszi. Magyarországon a GMO-t engedélyező hatóságok munkáját egy tízfős független szakértői bizottság segíti, amelyből egy tagot a civil szervezetek delegálnak. Az EU-ban engedélyezett GMO termékek nem kapnak Magyarországon automatikusan engedélyt. Hazánkban önálló döntési lehetősége van, mivel a Pannon-Ökorégió speciális értékeinek védelme megkövetelhet egy helyi viszonyokra elvégzett környezeti hatásvizsgálatot is.

Juvancz Zoltán

Biogén tényező diákoknak – a BioGén tábor

2004. június 21–25. és június 28–július 2. között két turnusban került sor a Magyarországon egyedülállóan és példa értékűnek mondható, középiskolás diákok számára szervezett nyári programra, a BioGén táborra. A programot – a tavalyi év hasonló tematikus nyári rendezvényéhez hasonlóan, melyről annak idején szintén hírt adtunk [*Biokémia*, XXVIII: 16–17 (2004)] – a Bio-Science Kft. szervezte az egyetemi felvételi előtt álló vagy ahhoz közeledő, a genetika, a molekuláris biológia iránt érdeklődő fiataloknak azzal a kifejezett céllal, hogy megkönnyítse számukra a pályaválasztást. A szakmai előadások és laborgyakorlatok formájában megtartott, kétszer egyhetes rendezvénynek a Semmelweis Egyetem mint társszervező adott otthont. A táborban délelőttönként nemzetközi tapasztalattal rendelkező kutatók, orvosok és tanárok tartottak elméleti előadásokat, délutánonként a kísérleti programok keretein belül a diákok különböző laboratóriumi módszerekkel elemezhettek ismert (saját) és ismeretlen DNS-mintákat, miközben megismerkedhettek néhány csúcstechnológiai berendezés működésével is.

Húzó dolog ma gimnazistának lenni, hát még, amikor el kell dönteni, hogy hol is tanuljon tovább az ember. Azok, akiket a biológia, genetika, biokémia érdekel, nem kis segítséget kaptak a BioGén tábor során, melynek résztvevői úgy érezhették: gimnazista létükre rövid időre beugorhattak a molekuláris biológia mélyvizébe. Az egyhetes tábor alatt egyetemi szintű előadásokat hallgathattunk, és igazi „laborszagú” kísérleteket végezhetünk. A magunk részéről nem tudtuk, mire számít-



hatunk – végül is ki szeretné rövid nyári szünetét tanulással tölteni? A hét végére aztán kiderült, szó sem volt itt a gimnáziumban megszokott unalmas órákról, amikor a diák nem érti, mért áll

meg az idő a tanteremben.

De ne szaladjunk előre túlságosan! A tábor megnyitóját mindkét turnus – mert valójában két turnus volt – meghallgatta. Nem tudjuk, a második turnus milyenre sikeredett, mi nem abban voltunk, de az elsőben igazán összejött a társaság (1. ábra). Biztos

csupa jó fej voltunk, de talán az is számított, hogy a szervezők is mindent megtettek annak érdekében, hogy jó hangulatban teljen az időnk. Úgy gondolhatták, ők minden külső feltételt megteremtének ahhoz, hogy jól érezhessük magunkat, miközben új tudást szedünk magunkra, a többi pedig már rajtunk múlik – milyen hangulatban, milyen csapatban tesszük ezt. Övék az érdem a lehetőségekért, s mienk volt az öröm, hogy élhettünk azokkal. S éltünk is! A tábor jó hangulatát megalapozta az első napi ismerkedési pizza- és tekeparty (2. ábra), de hogy milyen jó banda verődött össze, mutatta az is, hogy két nap után már magunknak szerveztünk délutáni programot.



1. ábra A BioGén tábor résztvevői a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájának kapujában

A jó hangulatot a családi légkör is biztosította. Tizenhatan voltunk a turnusban, ebből hatan vidékiek voltak. Őket kollégiumban szállásolták el, és gondoskodtak a szállításukról, valamint az egész csoport étkeztetéséről. Emellett senkinek nem kellett éheznie: az előadások közt mindig volt valami, csoki, alma, szendvicsek, üdítő, amivel pótolhattuk az elveszett energiát.



2. ábra Vidám hangulat a pizzatálak mellett az első nap estéjén

Szakmaiakra áttérve, tervezték ugyan, hogy a tábort megelőzően felvételi tesztet íratnak, de a vidékiekre való tekintettel végül jelentkezési sorrendben töltötték fel a turnusokat. Ugyancsak a vidékieket segítette, hogy kollégiumi szállást kaphattak. Másként nem is működött volna a tábor, hiszen már korán reggel kezdődtek az érdekesebbnél érdekesebb előadások. S nem is akárkiktől! Csak hogy néhány nevet említsek: Kopper Lászlótól, a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének igazgatójától igazi egyetemi szintű előadást hallhattunk arról, hova is jutott az orvostudomány napjainkra, amikor is molekuláris szinten, a sejtciklus szabályozásának részleteibe hatolóan tudja értékelni egyes betegségek kialakulását. Vagy Csermely Pétertől, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetének egyetemi tanárától, aki két előadást is tartott nekünk. Az elsőben (Kopperé után, talán megkönnyebbülésül) inkább beszélgettünk a „laboratóriumi” életről és arról, milyen a jó kutató. A másodikban (az utolsó napon) aztán már komolyabbra fordította

a szót, de addigra már mindenki profi vegyész lett (3. ábra). És ott volt Falus András, a Semmelweis Egyetem Genetikai Sejt- és Immunbiológiai Intézetének igazgatója is, akinek a genomikáról szóló előadása után nehezünkre esett felállni, és a teremben szétnézve is csupa tátott szájat láttunk. Emellett további nyolc elméleti és módszertani, valamint egy munkavédelmi előadást hallgathat-



3. ábra Csermely Péter filozofikus előadása a fehérje- és génhálózatok – s tágabb értelemben valamennyi, gyenge kölcsönhatások által fenntartott rendszer – stabilitásáról

tunk meg a hét során az I. és II. sz. Belgyógyászati Klinikák, a Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, valamint a Bio-Science Kft. és a Genodia Molekuláris Diagnosztikai Kft. munkatársaitól. S persze nem hagyható ki az előadók sorából Tátrai Ágnes, a Bio-Science Kft. ügyvezető igazgatója, a tábor főszervezője és szellemi motorja sem! A vizsgálati módszereken belül megismerkedhettünk a DNS-izolálási eljárásokkal, a PCR és RT PCR tech-

nikákkal, gélelektroforetikus, immuncito- és immunhisztokémiai módszerekkel, valamint a DNS-*microarray* technikával. A sok új információt tartalmazó előadásokról kivonatot kaptunk, benne az összes levetített diával, valamint egy munkafüzetet, ami- ben mindenki önállóan jegyzetelhetett, illetve a gyakorlatokról jegyzőkönyvet készíthetett.



4. ábra DNS-izolálás a laboratóriumban

Ami a laborgyakorlatokat illeti (4. ábra), délután azon frissiben kamatoztathattuk éppen megszerzett tudásunkat a gyakorlatokon. Itt Kósa János nevét kell megemlíteni, aki kitartóan végigvezette a hallgatóságot a gyakorlati tenivalókon, és mindig készséggel segített, de ugyanilyen szerep jutott Somlai

Zsoltnak is, aki nem kevésbé felelősségteljesen tett eleget laborvezetői feladatának. Ezen gyakorlatok során mindenki megismerkedhetett különböző, a már említett „laboréletben”, mindennapos műveletekkel, masinákkal (pipettázás, hígítási sor készítése, centrifugálás, Vortex). Miután pedig mindenki tökélyre fejlesztette ezeket, izoláltuk saját DNS-ünket a vérünkből (erre a célra az egyetemi klinikán mindenkitől vért vettek, s ki-ki saját vérmin-táját használhatta kiindulási biológiai mintaként), majd megvizsgáltuk a csontritkulásra hajlamosító

kollagén-1 génünk jellegét, domináns vagy recesz-szív voltát. A vizsgálat alatt – személyiségi jogi szempontokat is figyelembe véve – természetesen semmi életbe vágó nem derülhetett ki a vizsgálati alanyról (vagyis saját magunkról), ezért nem is végezhattunk magunkra vonatkozó vizsgálatokat például a vérzékenységre. A kísérletekhez a szervezők által biztosított vérmintákat használhattuk, de saját mintát nem. Összességében – a módszertani vizsgálatok körében – többféle kísérletet végez-tünk: DNS-izolálást, a kollagén-1 kimutatását (pon-tosabban a fehérje génjében mutatkozó polimorfiz-mus vizsgálatát), a prothrombingén mutációjának feltárását, valamint kromoszóma-rendellenessége- ket. A patológiai laborvizsgálatok mind ehhez iga-zodtak.

A tábor végén tudástesztet írtunk, aminek persze megint semmi köze nem volt egy iskolai dolgozat-hoz: nem kaptunk osztályzatot, és nem szidtak le hiányosságaink miatt. Meglepő módon azt hiszem, mégis sokaknak jobban sikerült így, mintha az isko-lában tanulta és írta volna a szükséges anyagot.

Ezzel a héttel segítettek nekünk a BioGén tábor szer-vezői a menthetetlenül közelgő döntésben: hogyan tovább? Arra persze nem kaptunk választ, hogy melyik egyetemre menjünk, de az kiderült, hogy szeretnénk-e ezen a téren tovább dolgozni. Így az-tán mindazoknak is hasznos volt ez a hét, akik csak azt tudták meg, hogy nem akarnak „laboréletet” élni. A tábor többi résztvevői viszont megerősödtek szakmai pályaválasztásukban. Köszönet mind- ezért.

Székács Anna és Dobos Attila

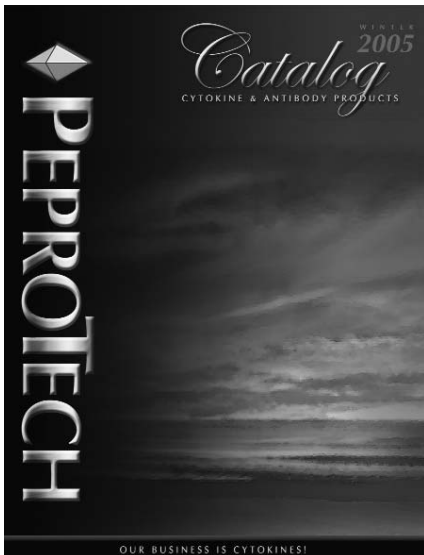
Új dimenziót nyit a Peptotech!

A Peptotech cég azzal a szándékkal jött létre 15 év-vel ezelőtt, hogy az immunológusokat, orvosokat, kutatókat jó minőségű és jó árfekvésű citokinekkal, növekedési faktorokkal lássa el. Ezen időszak alatt nemcsak az előállítási technikák változtak, hanem az előállított fehérjék száma is többszörösére nőtt. Ez jelenleg több mint 300 rekombináns növekedési

faktort és citokint jelent a hozzájuk tartozó mono-klonális és poliklonális ellenanyagokkal.

A *növekedési faktorok* igen széles tárházából szinte mindegyik jól ismert típus megvásárolható, úgy- mint a PDGF, EGF, TGF-alfa és -béta, a TGF-béta szupercsaládhoz tartozó BMP, FGF, NGF stb. Az elsősorban az immunrendszerben képződő és mű-

kődő *citokinek* – interleukinek, interferonok, TNF-alfa, -béta, IFN-gamma stb. – a növekedési faktorokhoz hasonlóan többféle élőlényből (humán, patkány és rágcsálók) származó formában vásárolhatók. A citokinek egy csoportját alkotó *kemokinek*, melyek mint nevük is mutatja elsősorban kemotaktikus hatással bírnak különböző sejttípusokra szintén mindhárom élőlényből származó formában kaphatók. A C (XCL)-, CC (CCL)- és CXCL (CXCL)-„alcsalád” sok-sok képviselője megtalálható a cég kínálatában. Az idegrendszeri sejtek szaporodását, differenciálódását, a szinaptikus kapcsolatokat szabályozó növekedési faktorok a *neurotrofinok*. Az NGF proteincsalád számos humán és patkány eredetű tagja



kapható, pl. maga az NGF, BDNF, NT-3 stb., valamint további neurotrofinok, mint a GDNF és NT-4 is. További növekedési faktorokat, citokinek is kínál a Peptide, nevezetesen az inzulin aktiv-

tasát befolyásoló *adipokinek*et, az antimikrobiális hatású *defenzinek*et, illetve más peptideket, mint a leptinek.

Az itt bemutatott anyagok kimutatásához ellenanyagokat és ELISA teszteket vásárolhatunk. Az *ELISA kitek* 600–1000 vizsgálathoz elegendő ellenanyagokat és standardot tartalmaznak. A biotinizált ellenanyagok láthatóvá tételéhez a gyártó avidin-peroxidáz konjugátumot és ABTS szubsztlátot javasol, de ezt már a felhasználónak kell biztosítania.

A *monoklonális ellenanyagokat* általában immunizált egerek aszciteszfolyadékából tisztították protein-A kromatográfiás oszloppal. Immunizálásra rekombináns antigéneket használtak.

A *poliklonális ellenanyagokat* általában nyúlserumból izolálták, mikor is a kísérleti állatokat rekombináns fehérjével előimmunizálták. A tisztítást affini-

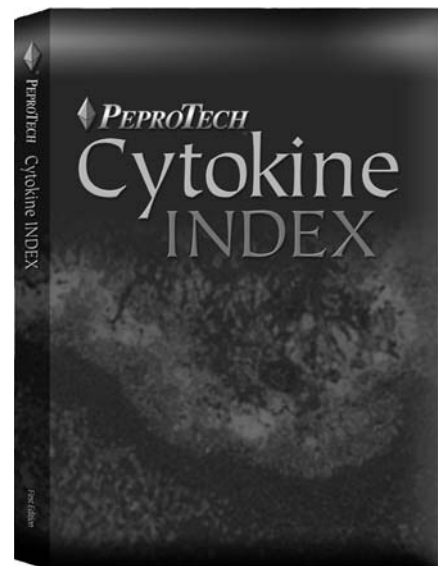
táskromatográfiával végezték immobilizált antigén mátrixszal. Az így kapott ellenanyagok jó része biotinizált formában is megvásárolható.

A cég nagy hangsúlyt fektet a *minőségellenőrzésre*.

A minőségi paraméterek vizsgálatára sokféle módszert használnak: szekvencia és aminosav-összetétel megállapítása, SDS-PAGE, RP-HPLC, FPLC, UV-spektroszkópia. Emellett a biológiai aktivitás megállapítására *in vitro* és *in vivo* teszteket végeznek. Az endotoxintartalom megállapítására kinetikus LAL módszert használnak. A kész fehérjeoldatot a liofilizálás előtt sterilre szűrik. Az ellenanyagok tekintetében nagy hangsúlyt kap a különböző alkalmazásokra (mint ELISA, Western-blot) való alkalmaság, valamint neutralizációs kísérletek, ahol az ellenanyag gátló hatását vizsgálják az antigénként használt növekedési hormonokra, citokinekre.

A fehérjék liofilizált formában szobahőmérsékleten érkeznek a felhasználóhoz. Rövid távon, legalább egy hónapig így is tárolhatók, de hosszabb távon –20 °C-on kell tárolni a reagenseket. Ezen a hőfokon a feloldott fehérje is eltartható legalább egy évig, de a felolvasztott fehérjeoldatot nem ajánlott újra visszafagyasztani további felhasználásra.

Holló Róbert



BIO-SCIENCE

Bio-Science Kft.

1119 Budapest, Andor u. 47–49.

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

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

Internet: www.bio-science.hu

NOVO-LAB

BIOMETRA THERMOCYCLEREK



*T*personal



*T*gradient



*T*1



*T*3


**Gyorsaság és pontosság
5 variációja**



*T*robot

Whatman

Biometra®

 **NOVO-LAB**

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





New!

Applied Biosystems

9800 Fast PCR System.

PCR in just 25 minutes.



The 9800 Fast PCR System is the first fully integrated solution delivering fast PCR performance in a standard 96-well format. The system reduces PCR reaction time from two hours to 25 minutes

or less—advancing you quickly to the next step of your research. With the fast-optimized system including the 9800 thermal cycler, GeneAmp® reagents, integrated consumables, and world-class technical support, you can count on fast, reliable results. Put your trust in the 9800 Fast PCR System for faster PCR performance—visit www.appliedbiosystems.com/9800



Applied Biosystems provides the innovative products, services, and knowledge resources that are enabling new, integrated approaches to scientific discovery.

AB Applied Biosystems

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a license. The Applied Biosystems 9800 Fast PCR System Thermal Cycler (base unit) in combination with its immediately attached Applied Biosystems 9800 Fast PCR System Thermal Cycler sample block module is an Authorized Thermal Cycler for PCR and may be used with PCR licenses available from Applied Biosystems. Its use with Authorized Reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. GeneAmp is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. Applied Biosystems is a registered trademark and AB (Design), Applied, Science, and Science (Design) are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the US and/or certain other countries. ©2006 Applied Biosystems. All rights reserved.