

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

XXX. ÉVF. 2. SZÁM

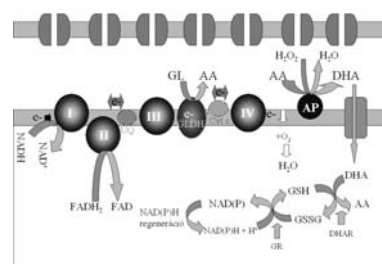
2006. JÚNIUS

A tartalomról:

- ◇ A sejten belüli proteolízis: az ötlettől az alapmechanizmusokon át az emberi betegségekig és a célzott gyógyszerfejlesztésig – *Aaron Ciechanover*
- ◇ A mitokondrium szerepe a növényi sejt C-vitamin-bioszintézisében és redoxállapotának szabályozásában – *Szarka András, Bánhegyi Gábor és Mayer Miklós*
- ◇ Ökotechnológia megalapozása fafelületek gombásodás elleni védelmére az alap kutatások szintjén. II. Faminták felületi módosítása – *Mohammedné Ziegler Ildikó, Hórvölgyi Zoltán és Billes Ferenc*
- ◇ Bioanalitika: elméleti mechanizmusvizsgálatoktól a környezeti és egészségügyi alkalmazásokig – *Szarka András*
- ◇ In memoriam Simoncsits András – *Kiss Antal, Pongor Sándor és Venetianer Pál*

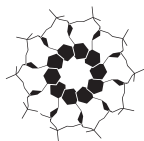
Címlapkép:

A mitokondriális respiráció és a C-vitamin mitokondriális metabolizmusának hipotetikus kapcsolata. A mátrix (sárga) és az intermembrán tér (zöld) határfelületén, a mitokondriális belső membránon a galaktono-lakton dehidrogenáz (GLDH) elektrontokat ad át a III-as és IV-es komplex között a citokrom c (Cyt c) enzimnek, miközben a galaktono-lakton (GL) aszkorbinsavvá (AA) alakul. A mitokondriális respiráció melléktermékeként keletkezett – esetleg más mitokondriumon kívüli folyamatok során képződött és a citoszolból (szürke) az intermembrán térbe bejutott – hidrogén-peroxid eltávolítását a belső membránban található, de intermembrán térorientációjú aszkorbát peroxidáz (AP) enzim végzi. A folyamat során keletkezett aszkorbilgyökök spontán aszkorbátra és dehidroaszkorbátra (DHA) diszproporcionálódnak. Az így módon keletkezett DHA a mitokondriális belső membránban található transzporterén keresztül a mátrixba jut. A mátrixban található dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR) redukált glutation (GSH) terére visszaredukálja aszkorbinsavvá. Az oxidálódott glutation (GSSG) regenerálását a glutation reduktáz (GR) enzim végzi NAD(P)H terhére (ld. a vonatkozó közleményt a 33–38. oldalakon).



Contents:

- ◇ Intracellular proteolysis: from an idea through basic mechanisms and onto human diseases and drug targeting – *Aaron Ciechanover*
- ◇ The role of mitochondrium in vitamin C biosynthesis and redox state regulation of the plant cell – *András Szarka, Gábor Bánhegyi and Miklós Mayer*
- ◇ Fundamental studies towards eco-technological wood preservation against fungal infections. II. Surface modification of wood samples – *Ildikó Mohammed-Ziegler, Zoltán Hórvölgyi and Ferenc Billes*
- ◇ Bioanalytics: from theoretical mechanism exploration to environmental and health care applications – *András Szarka*
- ◇ In memoriam András Simoncsits – *Antal Kiss, Sándor Pongor and Pál Venetianer*



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6

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

Felelős kiadó: Dr. Fésüs László

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

A sejten belüli proteolízis: az ötlettől az alapmechanizmusokon át az emberi betegségekig és a célzott gyógyszerfejlesztésig

Intracellular proteolysis: from an idea through basic mechanisms and onto human diseases and drug targeting*

Aaron Ciechanover

Vascular and Tumor Biology Research Center,
the Rappaport Faculty of Medicine and Research
Institute, Technion – Israel Institute of Technology,
Haifa 31096, Israel,
E-mail: c_tzachy@netvision.net.il

Összefoglalás

A biokémikusok a hetvenes évekig a fehérje-bioszintézis felderítésével voltak elfoglalva, ahogy a genom lefordítódik a proteomra, s a fehérjék biokémiai lebontását kevésbé tanulmányozták. Az, hogy fehérjéink a keletkezés és lebomlás dinamikuss állapotában állnak, a harmincas évek óta ismeretes, ám úgy gondolták, hogy a sejt saját fehérjéit is – a külső fehérjékhez hasonlóan – a lizoszómákban bontja le. Később világossá vált, hogy az intracelluláris fehérjék lebontása nem lizoszomális, de a folyamat hatásmechanizmusára csak az ubiquitin-alapú proteolitikus rendszer felfedezése derített fényt. Bizonyosodott, hogy az ubiquitin közvetítette fehérjelebontás olyan alapvető folyamatokban működik közre, mint a sejtciklus és -osztódás, növekedés és differenciáció, transzkripció, valamint a sejten belüli minőségbiztosítás. Az ubiquitin-alapú fehérjelebontás hibás működése, a túlzott proteolízis vagy a fehérjelebontás gátlása egyaránt betegségekhez, például rosszindulatú kórképek és neurodegeneratív rendellenességek kialakulásához vezethet. Az ubiquitinrendszer hibás működését korrigáló, mechanizmusalapú gyógyszerek – köztük egy már gyakorlati gyógyászati alkalmazású készítménnyel – olyan kórképek gyógyítását ígérik, mint a többszörös myeloma vagy a nem Hodgkin típusú limfómák.

Ciechanover, A.

Vascular and Tumor Biology Research Center,
the Rappaport Faculty of Medicine and
Research Institute, Technion – Israel Institute
of Technology, Haifa 31096, Israel,
E-mail: c_tzachy@netvision.net.il

Summary

Until the seventies, scientists were preoccupied with protein biosynthesis, the translation of the genome into the proteome, and protein degradation was less studied. The fact that our proteins are in a dynamic state is known since the thirties, yet it was assumed that intracellular proteins, just like extracellular ones, are degraded within the lysosome. Later it turned out that intracellular proteolysis is non-lysosomal, and its mechanism was solved only when the ubiquitin-proteasome system was discovered. It was shown that ubiquitin-mediated protein degradation is involved in regulation of numerous basic cellular processes such as cell cycle and division, growth and differentiation, transcription, and in the assurance of the cellular quality control. Misfunctioning of ubiquitin-related protein degradation, excessive proteolysis or the inhibition of proteolysis may result in diseases, among them malignancies and neurodegenerative disorders. Mechanism-based drugs correcting the operation of the ubiquitin system may offer treatment for such diseases including an already available drug for the treatment of multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphomas.

* This paper is based on Prof. Ciechanover's lecture at the Hungarian Academy of Sciences (HAS) on May 5, 2005 at a joint meeting of HAS Sections of chemistry, biology and medicine. The text and the figures are reproduced with permission.

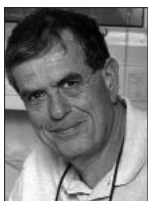
The idea that the body of all living organisms is in a constant state of destruction and synthesis is relatively novel to scientists. The question of protein turnover emerged in biochemistry almost 70 years ago, yet it took time to convince scientists that such mechanism exists at all, and how extensive it is. Indeed, the process of protein turnover is extremely extensive: we are turning over about 5% of our own proteins every day. There are proteins that are long-lived (with half-lives measured at days), while others are extremely short-lived (with half-lives measured at few minutes), but in about a month we are exchanging almost all of our proteins. It appears that key regulatory proteins are extremely unstable, which provides a means to tightly regulate their activity. Proteins with half-lives of 5 minutes, are being replaced more than one hundred times a day. The fundamental question regarding protein turnover is why this is happening, why are we not static in our protein composition. Nowadays it is evident that we are exchanging our body material, but this used to be far not obvious to scientists until several decades ago.

Protein stability and degradation

Why proteins are so prompt (while sugars and lipids to a lesser extent) to this process? The proteins are the machines of our body, we are moving on proteins, the muscles, the eyes, the receptors, the

channels, everything is made of proteins, and these proteins (enzymes, structural proteins, transport proteins, motor proteins, storage proteins, signaling proteins, receptor proteins, gene regulatory proteins and special purpose proteins) are written in a relatively simple „language” consisting of 20 letters of amino acids linked together by peptide bonds to form the 30,000 proteins that our body consists of. An inherent problem of the „protein language” is how to keep its „words”, the actual peptides made of hundreds of amino acids each, intact.

It is a very exciting question evolutionarily, why we are destroying our proteins. Why is the protein structure not stable and stay intact for long? Obviously the structure of the proteins is very complex, held together by secondary, tertiary, time to time quaternary structural forces, by complex formation, and the resulting architecture is very much prone to damage, to temperature, to irradiation and to various chemical damages. The body temperature of higher order animals is controlled; the human body lives at a relatively constant temperature of 37 °C. Why is it? How dangerous is it? What is the price that we are paying for maintaining this constant temperature? We can say, the price is enormous. At 42 °C our proteins are being denatured irreversibly. A difference of 5 °C is a question of life and death. A 5 °C difference in the external temperature may go unnoticed, but 1 °C difference in



Aaron Ciechanover was born in Haifa, Israel, in 1947. He graduated as MS and MD at “Hadassah” and the Hebrew University School of Medicine at Jerusalem. He was a graduate student in the laboratory of Avram Hershko at the Technion (Israel Institute of Technology) at Haifa, and defended his MD degree in medicine in 1975 at the Hebrew University of Jerusalem, and in PhD in biology in 1982 at the Technion. He became an Associate Professor at the Technion in 1987 and a Professor in 1992. He spent a postdoctoral fellowship at the Department of Biology at the Massachusetts Institute of Technology, where he studied asialoglycoprotein and transferrin receptors and mechanisms of iron delivery into cells in the laboratory of Harvey Lodish, and also collaborated with Alexander Varsharsky and his student Daniel Finley in their studies of ts85 ubiquitin system mouse mutant cells, when they showed that the system is also involved in degradation of short-lived normal proteins in nucleated cells. At present he is a Distinguished Professor at the Unit of Biochemistry and Director of the Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute at the Technion, Haifa, Israel. His research profile includes regulated activation and degradation of transcriptional regulators, such as the major immune and growth control modulator NF- κ B, the tumor suppressor p53, the tumor promoting protein c-Myc, and MyoD, the major transcriptional regulator involved in muscle differentiation, and as these processes relate to ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins. He also focuses on the linkage between the ubiquitin system and programmed cell death, apoptosis through distinct mechanisms e.g., activation of NF- κ B and regulation of the ubiquitin ligases as inhibitors of apoptosis proteins. He was awarded the 2000 Albert Lasker Prize in Basic Medical Research (along with Avram Hershko and Alexander Varshavsky) and the 2004 Nobel Prize in Chemistry (shared with A. Hershko and I. Rose).

internal temperature is quite significant. So we are living on a very narrow edge of a temperature scale. This was, on one hand, optimal for efficient catalysis of many processes, what enabled the development of the mammalian world to the extent that it has developed. But on the other hand, this is a temperature that is horrendous for the proteins, many of them are heavily damaged within a short time at 37 °C or even at room temperature, and therefore must be removed by the proteolytic processes and replaced with new ones. So the heavy price of living at a temperature of efficient biocatalysis is that our proteins constantly get denatured. This is one reason why we have to destroy these damaged proteins, and then we have to replace them.

The other reason is obviously the oxygen that we are living in. In an evolutionary aspect, the 21% oxygen concentration was probably optimal to drive the aerobic respiration that enables us again to become so efficient in using the energy derived from our nutrients. Yet the oxygen causes damage as well, oxygenizes our proteins and inactivates them. And we continuously cope with this effect, we invest the majority of our energy to reduction: we are generating NADPH in the Krebs cycle, and other reducing agents. And when we die, we are running into a rapid oxidizing cycle.

Destruction is therefore useful in removing proteins damaged by the effects of temperature or oxygen, but we also use destructive processes to control biochemical pathways, cell cycle, and the action of transcription factors by programmed removal of critical key regulatory proteins. So destruction is very useful, yet phosphorylation could be even more efficient. Why to take a complex protein that so much energy was invested in the generation of, and destroy it? It would be much more economical energetically if we phosphorylated unneeded proteins, and by this means activated or inactivated them, and then later reversed this effect by dephosphorylation. Why do we need then levels of control mechanisms that destroy regulated proteins completely? The answer may be residing in the idea of reversibility. Phosphorylation/dephosphorylation are reversible, and if a mistake happens in the biochemical process, it can lead to faulty consequences. Degradation, however, is irreversible. If a single cut is executed in a protein, it is

broken into two pieces, and is practically gone. If you need the given protein again, you have to go all the way back to DNA and RNA, and to synthesize the entire peptide chain again. There is no glue to stick the broken protein together, there is no repair mechanism for proteins, the destruction mechanism is irreversible. So maybe we need to degrade proteins in order to secure directionality. If something goes wrong at one stage along the cell cycle, it is impossible to stop the cycle in the middle and turn back. We probably need to physically remove and destroy the proteins that control the cell cycle to ensure the unidirectionality. So the role of protein destruction is one one hand quality control (damaged proteins, temperature, oxygen) and on the other hand control of processes.

The history of science on degradation of intracellular proteins

The history of protein destruction is extremely interesting. The father of this field is, no doubt, Rudolf Shoenheimer [1], a professor at Columbia University, a Jew who escaped Germany when the Nazis raised to power, and was taken in the late thirties to become a faculty member in the Department of Biochemistry at Columbia University in New York led by Hans T. Clarke, who established, by collecting talented people from all over Europe and mostly from Germany, that wonderful department, probably the best in the United States and in the world at that time. One of those invited scientists was Konrad Bloch, who discovered the biosynthetic pathway of cholesterol (and won the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1964). Rudolf Shoenheimer collaborated with Harold Urey, a physicist also at Columbia University (who won the Nobel Prize in Chemistry in 1934 for discovering heavy hydrogen), who synthesized amino acids enriched with heavy isotopes H, C, and mostly N. Shoenheimer's goal was to decipher many metabolic pathways in mammals. In my mind there is no doubt that he would have won a Nobel Prize, had he lived longer and not died untimely. He left behind a rich heritage and a large cohort of students, fellows, and faculty members who trained with him. He took this isotope idea and scattered it all over biochemistry, to from cholesterol to amino acids and

proteins, and from phosphate to phosphorylated compounds. At that time he used labeled amino acids, he fed them to animals, and he analyzed their dynamics. He found that they are incorporated into proteins and then are removed from proteins, and concluded, in contrast to the view at that time, that proteins are in a dynamic state and are not static compounds [1].

This was not met by complete agreement by contemporary biochemists, as many of them claimed that our proteins do not change, are permanent in time. They wondered, however, why are we eating proteins if we do not need anything from them to add to our body proteins? Why are we still dependent on proteins? It was claimed that we need proteins mostly as fuel, as energy source, just like we need lipids or carbohydrates. A small amount of proteins was believed also to be used for replacement in the “wear and tear” process, but this was regarded as minimal quantitatively. Shoenheimer argued, however, that this classical, static picture of our constituting proteins must be replaced by one that takes account of the dynamic state of body structure. With his own words: *“The simile of the combustion engine pictured the steady flow of fuel into a fixed system, and the conversion of this fuel into waste products. The new results imply that not only the fuel, but the structural materials are in a steady state of flux. The classical picture must thus be replaced by one which takes account of the dynamic state of body structure”* [1].

Although he has shown with isotopes, well-founded science and solid evidence that our proteins are dynamic, his idea has not been accepted for about 15 years or more. Almost two decades after publishing his initial findings, in 1955, scientists as the famous Jacques Monod (who was awarded the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1965 for his studies on genetic control of enzymes) and David Hogness (arguably the founding father of modern fly genetics genome analysis), when dealing with a protein stability issue [2], concluded the following: *„there seems to be at present no conclusive evidence that the protein molecules within the cells of mammalian tissues are in a dynamic state. Moreover our experiments have shown that the protein growing in E. coli are static. Therefore, it seems necessary to conclude that the synthesis and maintenance of proteins within growing cells is not necessarily or inherently associated with a «dynamic state».”* A bit delicate detail in retro-

spect, that they even challenged Shoenheimer directly using his term, the word “dynamic state” in their discussion.

The field took further turns by Christian de Duve from the University of Louvain in Belgium and the Rockefeller University in New York, who discovered the organelle lysosome [3] (and received, along with other scientists, the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1974). The lysosome, a membrane-surrounded organelle, contains inside its lumen proteases that act in concert to degrade proteins, nucleic acids, sugars and lipids. It was clear from almost the day it was discovered that the lysosome is involved in degradation of extracellular proteins. Based on this, it was assumed it processes also intracellular proteins. People thought that the lysosome pinches off droplets of the cytosol in microautophagic vesicles that pour their contents later into the lysosomal lumen where it is degraded. In this case, however, each droplet should have the full cohort of the cytosolic proteins, every protein of the cytosol should be represented in it. Therefore, all proteins should be degraded at the same time, once the droplet enters the lysosome.

The ultimate answer, namely that the lysosome is not responsible for the degradation of intracellular proteins, came as knowledge about kinetics emerged, very sophisticated methods evolved, when it was found that various proteins have different half-lives, different stability. It was difficult to explain how the proteins can have half-lives ranging from 12 minutes to 15 hours. One idea was that short lived proteins are degraded immediately in the lysosome, while more stable ones return, exit the lysosome following their entry into it, back into the extralysosomal compartment, the cytosol [4].

The picture changed when a brilliant approach was taken by Brian Poole of the Rockefeller University, using lysosomal inhibitors [5]. Brian asked, why play around with models? Let us take inhibitors of the lysosome and ask the question whether the cell can or cannot degrade its own proteins after the inhibition of the lysosome. And the answer was that the cell keeps on degrading its own proteins perfectly, unaffectedly, even after lysosomal proteolysis is inhibited [5], proving that

the lysosome is not involved in intracellular protein degradation, only in extracellular protein degradation. As formulated by Poole: *„Some of the macrophages labeled with tritium were permitted to endocytize the dead macrophages labeled with ^{14}C . The cells were then washed and replaced with fresh medium. In this way we were able to measure in the same cells the digestion of macrophage proteins from two sources. The exogenous proteins will be broken down in the lysosomes, while the endogenous proteins will be broken down wherever it is that endogenous proteins are broken down during protein turnover.”* Thus, he defined two types of proteolysis: (i) lysosomal for exogenous proteins and (ii) non-lysosomal for endogenous proteins. What he wrote instead of „non-lysosomal”, the word „wherever it is”, is almost poetic in science in my opinion: he left it to scientists beyond his era and age to find the next stage. So in my opinion Brian can be regarded as one of the founding fathers of the modern field of proteolysis and the ubiquitin system that we later discovered, when I was a graduate student with Avram Hershko.

Another development in the field in the mid’ fifties was the discovery of Melvyl Simpson that protein degradation in the cells very interestingly requires energy [6]. This did not make any sense in terms of thermodynamics: proteins are carriers of energy to us, we are eating proteins in order to turbocharge ourselves with energy, so why to invest energy to degrade proteins? Here we have to make a clear distinction between the two proteolytic processes. When we consume proteins and hydrolyze them in the gastrointestinal tract, proteolytic enzymes degrade them, and we are generating heat and energy. This is the “normal” thermodynamic process. But in the cell, something completely else is occurring. The purpose of degrading intracellular proteins in the cell is not to generate energy, but what was shown above: quality control and switching. The gastrointestinal tract is non-discriminatory: every protein that goes into the stomach will be degraded. Protein degradation within the cell, however, has to be discriminatory: it has to be controlled, which proteins are degraded and at which time point, otherwise the cell would be in chaos. And control always takes energy.

The ubiquitin system of protein degradation

This was the state of the art when we entered the field with Avram Hershko. The state of knowledge can be summarized in the following: (i) proteins are degraded in the cells, (ii) the process requires energy, and (iii) it is non-lysosomal. So we were researching a very defined system: a non-lysosomal, ATP-requiring proteolytic system. Avram was studying already protein degradation during his post-doctoral fellowship with Gordon Tomkins at the University of California at San Francisco, where he confirmed Simpson’s finding that the process is endergonic, requires energy, showing it now for the degradation of a specific enzyme, tyrosine aminotransferase, TAT. However, the mechanism(s) remained elusive. We decided to work with a cell that has no lysosome. Nowadays people would use molecular biology, mouse models, knock out genes, but at that time genetic and molecular manipulations were not possible, so we had to rely on nature, and actually, nature is a better genetic planner than a human being. So we picked a cell that does not have lysosomes: the reticulocyte, the immature red blood cells. We found, in parallel to Etlinger and Goldberg [7], that the reticulocyte cell extract degrades proteins [8]. If we fractionated the cell extract on an ion exchange column, none of the two main fractions had protein degradative activity. Yet if the two fractions were combined, the degradative activity emerged again [9]. This was already a non-paradigmatic finding: at that time it was thought that all what is needed for proteolysis is an enzyme and its substrate. One does not need a third party for this type of enzymatic action. And the number of fractions and components started increasing [10–15]. By now we know that the approximate number of the components of the ubiquitin system is 1,500, most of them ubiquitin ligases, enzymes which endow the system with its high specificity and selectivity towards its numerous substrates. This means, the ubiquitin system is about 5% of the total human genome, far larger than any other known biochemical system. And there is has a reason why this is the largest system that exists in the human genome. If you look at protein synthesis, it uses nucleic acids for the encoding sequences. Yet the code for protein degradation is encoded within its components. There is no DNA or RNA to tell

which protein has to be degraded at a given time, which one is an abnormal protein and which one is normal. All the codes are within the system, and therefore, one needs a cumbersome architecture.

We purified a heat-stable protein from Fraction I, which later turned out to be ubiquitin, labeled it, and incubated it in the crude extract. Without ATP nothing happened, and when resolved on a column, the protein eluted in the right places. But once ATP was added, ubiquitin was shifted to the high molecular mass region [11]. What we found was that our small protein, what we called at that time APF-1 (or ATP-dependent proteolysis factor 1) became attached to many proteins in the extract. We surmized that this protein (what later was poetically termed „the kiss of death”) marks the substrate for degradation, and marks it for degradation by a protease that recognizes only the tagged protein [12].

Here we run into a metaphor. The ubiquitin system may be considered similar to the legal court system. The court is the one that decides if someone is a criminal: no one will take action until the court decides that the given person is guilty. But if it does so, then another authority comes and executes the judgement. The criminal and the executor exist in the same system, yet they are separated by a barrier: by the decision of the court. It is very similar in the ubiquitin system (Figure 1). The barrier here is not physical, as was thought before (the membrane of the lysosome), but rather a chemical barrier. It is

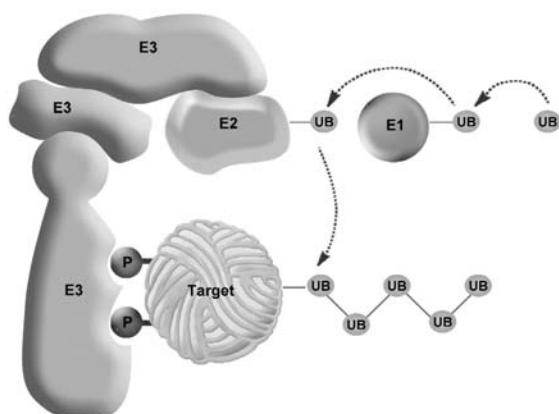


Figure 1 Decision-making about the degradation of a given protein in the ubiquitin system. (**Target**: substrate protein targeted to degradation, **UB**: ubiquitin, **E1**: ubiquitin-activating enzyme, **E2**: ubiquitin carrier protein, **E3**: ubiquitin-protein ligase)

a kind of a virtual barrier, in form of a protein, ubiquitin that attaches, *via* a novel form of post-translational modification, to another protein. It is a two-step process: E1 and E2, two enzymes that we discovered are the „court”, and E3 are the „judges”. When the protein shows up in front of the court, it binds to E3, ubiquitin ligase, a most important component of the ubiquitin system: there are close to 1,000 ubiquitin ligases to ligate to different proteins. The court starts the judgement process: ubiquitin is activated by E1, the ubiquitin-activating enzyme, it then jumps to another enzyme in a chain reaction, to E2, and from there to the substrate that is bound to an E3: once ubiquitin is attached, a second ubiquitin is getting attached, and a third to the second, and a fourth to the third, and so on and so forth, and a polyubiquitin chain is being built. It is the polyubiquitin chain that is the marker for the executioner (Figure 2), which is another protein, a big protease, the so-called 26S proteasome, which recognizes only polyubiquitinated substrates, and degrades only those.

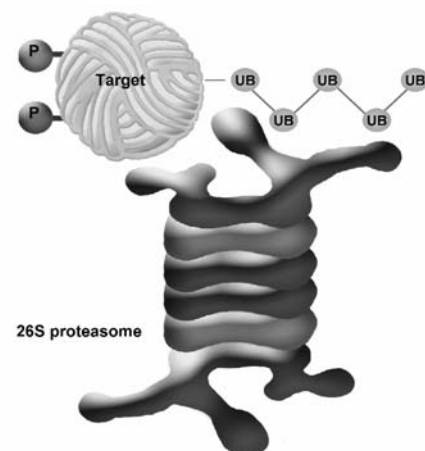


Figure 2 Degradation of the polyubiquitin-marked protein by the 26S proteasome binding to polyubiquitinated proteins and hydrolyzing them. (**Target**: substrate protein targeted to degradation, **UB**: ubiquitin)

Because the ubiquitin system is involved in the regulation of numerous basic cellular processes, it was not surprising to find that, aberrations in the ubiquitin system have been implicated in the pathogenesis of many human diseases, malignancies and neurodegenerative disorders among them [16]. With this we can move to medicine: how the ubiquitin system may affect medication of human dis-

eases? Everything in our body must be under control, our blood pressure, our glucose level, and all other compounds and physiological parameters. So proteins are kept by the ubiquitin system under control, and when we have a problem, it is either overproteolysis, excessive proteolysis that takes too much protein, or an inhibition of proteolysis leading to the accumulation of the substrate. In any event we are in trouble. For example, if we are excessively degrading a tumor suppressor, like p53, that keeps our genome from mutations, or if we are underdegrading an oncogenic protein, a growth promoting factor, like the EGF receptor, we both ways end up in cancer (Figure 3). One possibility of medical applications is to stop the ubiquitin system from degrading a tumor suppressor. In some cancers we have to slow down the ubiquitin system, so that the level of a tumor suppressor will increase and function properly. An inhibitor of the system, though a non-specific one, is a drug that is already marketed, Bortezomib (Velcade). It is an inhibitor of the proteasome and therefore not a specific inhibitor of the system, but it does have its window of toxicity. It inhibits generation of active NF- κ B, stabilizes cell-cycle regulatory proteins (p27, p53), has an inductive effect of apoptosis, behaves as a weak MDR substrate, and overcomes Bcl-2 cytoprotection. Its indications are expanding rapidly for numerous diseases including multiple myelo-

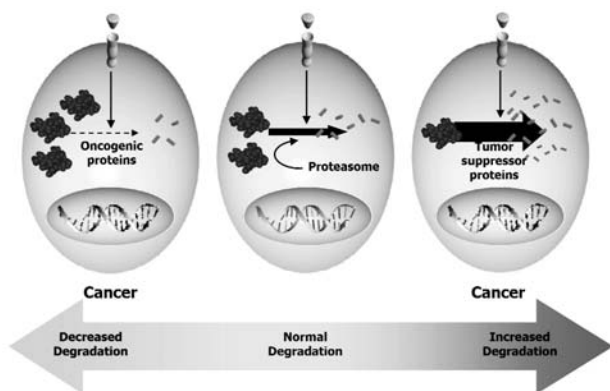


Figure 3 Aberrant protein degradation leads to disease. Should a tumor suppressor be overdegraded or an oncogenic protein underdegraded, both types of malfunctioning of the ubiquitin system leads to cancer.

ma, a form of leukemia, a deadly disease of the bone marrow in which the bone marrow is being replaced by the malignant immune plasma cells,

and refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma, a cancer that begins in the cells of the lymph system.

In conclusion we can say that proteins are degraded by a unique mechanisms that we deciphered the basics of. In the meanwhile it became a huge platform in modern biology, and thousands of scientists, and many drug companies are studying it now: it became an entire new field in modern biology. I was privileged to take an active part in this exciting journey from a vague idea in basic sciences all the way to a drug on the shelf [17].

References

- [1] Scoenheimer, R. (1942) The dynamic state of body constituents. (Harvard University Press, Cambridge, MA, USA)
- [2] Hogness, D. S., Cohn, M., Monod, J. (1955) Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*: The kinetics and the mechanism of sulfur incorporation. *Biophys. Biochim. Acta*, **16**: 99–116.
- [3] de Duve, C., Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.*, **28**: 435–492.
- [4] Haider, M., Segal, H. L. (1972) Some characteristics of the alanine aminotransferase- and arginase-inactivating system of lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**: 228–237.
- [5] Poole, B., Ohkuma, S., Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: Protein turnover and lysosome function (The Rockefeller University, New York)
- [6] Simpson, M. V. (1953) The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J. Biol. Chem.*, **201**: 143–154.
- [7] Etlinger, J. D., Goldberg, A. L. (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**: 54–58.
- [8] Hershko, A., Heller, H., Ganoth, D., Ciechanover, A. (1978) Mode of degradation of abnormal globin chains in rabbit reticulocytes. In: Protein Turnover and Lysosome Function (Segal, H. L., Doyle, D. J., Eds.) (Academic Press: New York) pp. 149–169.
- [9] Ciechanover, A., Hod, Y., Hershko, A. (1978) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**: 1100–1105.
- [10] Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., Hershko, A. (1980) Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**: 761–765.
- [11] Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L., Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**: 1365–1368.
- [12] Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., Rose, I. A. (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**: 1783–1786.
- [13] Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S., Hershko, A. (1980) Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, **255**: 7525–7528.
- [14] Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Hershko, A. (1982) Covalent affinity purification of I ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257**: 2537–2542.
- [15] Hershko, A., Heller, H., Elias, S., Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8206–8214.
- [16] Ciechanover, A., Schwartz, A. L. (2004) The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**: 3–17.
- [17] Ciechanover, A. (2005) From the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**: 79–86.

A mitokondrium szerepe a növényi sejt C-vitamin-bioszintézisében és redoxállapotának szabályozásában

The role of mitochondrium in vitamin C biosynthesis and redox state regulation of the plant cell

Szarka András¹, Bánhegyi Gábor²,
Mayer Miklós¹

¹Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, 1111 Budapest, Műegyetem rakpart 3.

²Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, 1444 Budapest, Pf. 260

Összefoglalás

Az aszkorbinsav a növényi és állati sejtek legfontosabb vízoldható antioxidánsa, továbbá számos enzim kofaktora. Az ember és néhány más állatfaj a bioszintetikus útvonal utolsó lépését katalizáló enzim mutációja miatt képtelen előállítására, felvételét növényi forrásokból biztosítja. Meglepő módon a növényi aszkorbinsav bioszintetikus útvonalat csak a közelmúltban sikerült felderíteni. A szintézis folyamatában a mitokondrium kulcsszerepet játszik. A bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim (L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz) a mitokondrium belső membránjában található, szoros kapcsolatban a mitokondriális elektrontranszferrel. A megfelelő aszkorbinsavszint biztosításában a *de novo* bioszintézis mellett a különböző reakciók során oxidálódott aszkorbinsav visszaredukálása is fontos szerepet kap. Az oxidált forma, a dehidroaszkorbát aszkorbáttá történő visszaforgatását első ízben a kloroplaszt esetében írták le. A visszaredukálásához szükséges elektronok a NADPH-ről glutation közvetítésével kerülnek a dehidroaszkorbátra. A redukációs ciklus enzimeinek jelenlétét a mitokondriumban is kimutatták. A közelmúltban leírásra került mitokondriális dehidroaszkorbát/aszkorbát transzporter és a dehidroaszkorbát redukálásában részt vevő enzimek mitokondriális jelenléte arra utal, hogy a mitokondrium a *de novo* aszkorbát-bioszintézis mellett az aszkorbinsav megfelelő redoxállapotának fenntartásában is szerepet játszik.

Szarka, A.¹, Bánhegyi, G.², Mayer, M.¹

¹Budapest University of Technology and Economics, Department of Biochemistry and Food Technology, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3., Hungary

²Semmelweis University, Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, H-1444 Budapest, POB 260, Hungary

Summary

Ascorbic acid is the most important water-soluble antioxidant in animal and plant cells and also co-factor for several enzymes. Due to mutations in the enzyme catalysing the last step in the synthesis, humans and a few animal species are unable to synthesize it, hence we cover our need from plant sources. Surprisingly, the biosynthetic pathway in plants has only been recently elucidated. Mitochondria plays an essential role, since the enzyme catalyzing the last step is located in the inner mitochondrial membrane, coupled to the mitochondrial electron transfer chain. Sufficient level of ascorbate is not only maintained by *de novo* biosynthesis, but also by the reduction of oxidized ascorbate produced in different reactions. Recycling of the oxidized form of dehydroascorbate into ascorbate was first described in chloroplasts. The electrons required for the reduction of dehydroascorbate come from NADPH *via* glutathione. The enzymes of the reduction cycle were found in mitochondria as well. The recently described mitochondrial ascorbate/dehydroascorbate transporter and the mitochondrial presence of enzymes contributing to reduction of dehydroascorbate suggest that besides *de novo* ascorbate synthesis mitochondria plays a major role in sustaining the redox status of ascorbate.

Bevezetés

Az aszkorbinsavat mellékveséből, narancsból és káposztából elsőként Szent-Györgyi Albert izolálta 1928-ban. A tiszta formájában fehér kristályos anyag több fontos biokémiai reakció résztvevője. Kiemelkedő szereppel bír a sejtek antioxidáns kapacitásának biztosításában mind a növények, mind az állatok esetében. Antioxidáns funkciója mellett számos enzim kofaktora. Az ember néhány más emlőssel egyetemben (pl. tengerimalac, gyümölcssevő denevér) elveszítette az aszkorbinsav bioszintézisének képességét [1], ezért megszerzésére külsődleges, elsősorban növényi forrásokra szorulunk. Ezt a tényt figyelembe véve különösen érdekes, hogy az aszkorbát szintézisére képes állatokban (pl. patkány) folyó reakciók mintegy négy évtizede ismeretesek, addig a növényekben folyó aszkorbát-bioszintézis útvonala a közelmúltig ismeretlen volt.

A C-vitamin bioszintézise és a mitokondrium

Az aszkorbinsav *de novo* bioszintézise gulonolacton oxidáz aktivitással rendelkező állatfajokban a hexuronsav úton zajlik. A hexuronsav-útvonal során az aszkorbinsav glukózból képződik, amely egyaránt származhat a glikogenezisből, a glükoneogenezisből, vagy akár a glukóz extracelluláris

felvételéből, így az aszkorbinsav bioszintézise és a szénhidrát-anyagcsere kölcsönösen befolyásolhatják egymást. Az útvonal első szakasza a citoszolban zajlik, az utolsó három enzim lépés az endoplazmás retikulumhoz kötött [1]. A nemrégiben feltárt növényi aszkorbinsav-bioszintetikus útvonal jelentős különbséget mutat az állati szervezetben megismert bioszintetikus útvonalhoz képest. A bioszintézis ez esetben is D-glükózból indul ki. A Wheeler és Smirnof által javasolt aszkorbát bioszintetikus út közti termékei: a fruktóz-6-foszfát, mannóz-6-foszfát, mannóz-1-foszfát, GDP-mannóz, GDP-galaktóz, L-galaktóz és az L-galaktono-1,4-lakton [2] (1. ábra). Csökkent aszkorbinsavsinttel rendelkező mutánsokról (vtc1-4) több ízben is beszámoltak [3], ellenben a mai napig nem ismert életképes, teljesen aszkorbinsavhiányos növény. Ennek oka feltételezhetően az, hogy az aszkorbinsav bioszintetikus útvonalának közti termékei más fontos szerepet is betöltenek a növényi sejt életében [4].

A bioszintézis folyamatai az utolsó lépésig a citoszolban folynak, azonban az utolsó lépést katalizáló enzim, az L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz a mitokondrium belső membránjában található [5]. Az enzimet elsőként 1954-ben írták le, azóta több forrásból tisztították és a kódoló gének szekvenciáját meghatározták [6,7]. A fehérjelánc első 83–91 ami-



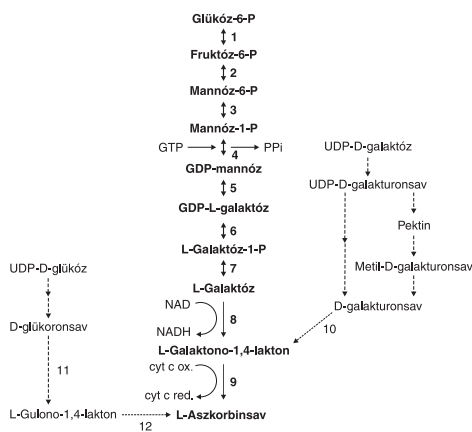
Szarka András 1999-ben szerzett okleveles biomérnöki diplomát a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyész-mérnöki Karán. 1999 és 2002 között a Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola nappali tagozatos hallgatója. Doktori értekezését „Az antioxidánsok szerepe a fehérje diszulfid kötések kialakulásában” címmel 2003-ban védte meg. 2003 óta a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszékén dolgozik, jelenleg egyetemi adjunktusi beosztásban. Érdeklődésének központjában a növényi mitokondrium antioxidáns-anyagcsereben

betöltött szerepe áll. A témakör tanulmányozása során hosszabb időt töltött az Antwerpeni Egyetem Biológiai Tanszékén, jelenleg is élő Tét együttműködése van a tanszékkel.

Bánhegyi Gábor 1982-ben végzett általános orvosként a Semmelweis Orvostudományi Egyetemen, azóta az egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetében dolgozik. 1990-ben kandidátusi, 1998-ban MTA doktori fokozatot szerzett. 1990 óta egyetemi docens. Kémiát és biokémiát oktat orvostanhallgatóknak, valamint patobiokémiát a posztgraduális képzés keretében. Érdeklődési területe: az endoplazmás retikulum szerepe az anyagcsereben, az organelum transzport-rendszerei és redox homeosztázisa.



Mayer Miklós ötödéves biomérnök-hallgató a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyész-mérnöki karán. Témavezetőjével, Szarka Andrással az aszkorbinsav növényi mitokondriális anyagcserejét kutatja. A 2005-ben megrendezett OTDK versenyen harmadik helyezést ért el a „Dehidroaszkorbinsav és glukóz transzportja a növényi mitokondriumban” című munkájával. Diplomamunkája során a növényi mitokondrium aszkorbinsav-regenerációban betöltött szerepét vizsgálja BY-2 dohánysejtekben.



1. ábra Az aszkorbinsav-bioszintézis útvonala növényi sejtekben. A szintézis fő útvonala kiemelve. A szűrővel jelölt útvonalak feltételezett kisebb jelentőségű alternatív aszkorbát-bioszintetikus útvonalak. (1) Glükóz foszfát izomeráz (2) Foszfomannóz izomeráz (3) Foszfomannóz mutáz (4) GDP-mannóz pirofoszforiláz (5) GDP-mannóz-3,5-epimeráz (6,7) Ismeretlen enzimek (8) L-galaktóz dehidrogenáz (9) L-Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz (10) D-Galakturonsav reduktáz (11) D-Gliükuronsav reduktáz (12) L-Gulono-1,4-lakton oxidáz/dehidrogenáz.

nosava tipikus mitokondriális célszekvencia, a fehérje érése során levágódik [5]. A tisztított enzim egy 56 kDa molekulatömegű monomer. Aktivitását az atebrin, a riboflavin és az akriflavin is gátolja, mely alapján valószínűsíthető, hogy flavin kofaktorral rendelkezik, amit abszorpciós spektruma is alátámaszt. Az enzim *in vitro* kizárólag citokróm c-t használ fel elektronakceptorként [7]. Az L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz lokalizációja a mitokondrium belső membránjában, valamint a citokróm c irányába mutatott specifikussága felvetette a légzési elektron-transzport lánchoz való kötődését. Mitokondrium és L-galaktono-1,4-lakton együttes inkubációja során az L-galaktono-1,4-lakton aszkorbinsavvá történő oxidációját, valamint a mitokondriális respirációs hányados megnövekedését tapasztalták [8]. A III-as komplex (citokróm c reduktáz) gátlószere, az antimycin A jelentős mértékben gátolta a mitokondriális respirációt, ugyanakkor serkentette a galaktono-1,4-laktonból történő aszkorbinsav-szintézist. A IV. komplex (citokróm c oxidáz) gátlószere KCN mind a respirációt, mind az aszkorbinsav bioszintézisét gátolta. A galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz tehát az oxidált citokróm c-t használja elektronakceptorként a galaktono-1,4-lakton aszkorbinsavvá történő oxidációját során. A kísérletek egyértelműen arra utalnak, hogy az L-galaktono-1,4-lakton alternatív elektrondonorként elektronokat

juttat az elektrontranszportlánc III-as és IV-es komplexe közé, ezáltal az aszkorbinsav bioszintézisét a mitokondriális légzési elektrontranszfer lánchoz köti [8] (2. ábra). A két folyamat kapcsolatát tovább árnyalja az a megfigyelés, mely szerint az I-es komplex gátlószere rotenon a ciánhoz hasonló mértékben gátolja az aszkorbinsav bioszintézisét [9]. A rotenon ezen gátló hatása nem érvényesül, amennyiben a folyamatban az I-es komplex nem vesz részt (pl. szukcinát légzési szubsztrát esetén), igaz az aszkorbinsav-szintézis mértéke ez esetben elmarad az I-es komplexen keresztül belépő szubsztrát (pl. malát) esetében tapasztalttól [9]. Mindezek arra utalnak, hogy az I-es komplexen keresztül folyó elektronáram nagymértékben befolyásolja, sőt elengedhetetlen a megfelelő szintű aszkorbinsav-bioszintézishez. Ezen megfigyelések különösen érdekesek annak a ténynek a tükrében, hogy az I-es komplexek kisebb hányada a galaktono-1,4-lakton dehidrogenázzal asszociáltan található a növényi mitokondriumban [10]. Könnyen elképzelhető, hogy az I-es komplexek ezen alcsoportja egy további szerepkörrel is bír, a komplexen átmenő elektronáram alapján regulálja az aszkorbinsav bioszintézisét.

2. ábra (lásd a címlapon) A mitokondriális respiráció és a C-vitamin mitokondriális metabolizmusának hipotetikus kapcsolata. A mátrix (sárga) és az intermembrán tér (zöld) határfelületén, a mitokondriális belső membránon a galaktono-lakton dehidrogenáz (GLDH) elektronokat ad át a III-as és IV-es komplex között a citokróm c (Cyt c) enzimnek, miközben a galaktono-lakton (GL) aszkorbinsavvá (AA) alakul. A mitokondriális respiráció melléktermékeként keletkezett – esetleg más mitokondriumon kívüli folyamatok során képződött és a citoszolból (szürke) az intermembrán térbe bejutott – hidrogén-peroxid eltávolítását a belső membránban található, de intermembrán térorientációjú aszkorbát peroxidáz (AP) enzim végzi. A folyamat során keletkezett aszkorbilgyökök spontán aszkorbátra és dehidroaszkorbátra (DHA) diszproporcionálódnak. Az ily módon keletkezett DHA a mitokondriális belső membránban található transzporterén keresztül a mátrixba jut. A mátrixban található dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR) redukált glutation (GSH) terére visszaredukálja aszkorbinsavvá. Az oxidálódott glutation (GSSG) regenerálását a glutation reduktáz (GR) enzim végzi NAD(P)H terhére.

Az aszkorbinsav regenerációja: a Foyer-Halliwell-Asada ciklus

A megfelelő aszkorbinsavszintet két úton lehet biztosítani: 1. *de novo* szintézis révén, 2. az oxidálódott aszkorbinsav visszaredukálása (reciklálása) révén. Az aszkorbát számos szabad gyökkel és más oxidáló ágenssel képes reagálni, így kiemelkedő sze-

reppel bír a sejtek antioxidáns kapacitásának biztosításában [11]. Emellett számos enzim kofaktora (prolil-4-hidroxiláz, γ -butiril-betain hidroxiláz, dopamin- β -hidroxiláz stb.) [12]. Ezen reakciók során az aszkorbátból aszkorbil gyök, majd dehidroaszkorbát keletkezik. A dehidroaszkorbát a legtöbb biológiai szövetben megtalálható, igaz a viszonylag nagy mennyiségben előforduló aszkorbáthoz képest igen alacsony koncentrációban [11, 12]. A tény, hogy a dehidroaszkorbát mind a növényi, mind az állati sejtekben előfordul, állandóan fennálló oxidációs reakciók léteére utal, másrésztől nagy teljesítményű aszkorbátregeneráló mechanizmus szükségességét veti fel. A regeneráló mechanizmus nélkülözhetetlenségét az aszkorbát esszenciális funkciói (és egyes fajokban az aszkorbátszintézis hiánya) messzemenően indokoltá teszik.

Szent-Györgyi Albert már 1928-ban megfigyelte, hogy a „redukáló szubsztancia” GSH mint redukálószer segítségével visszanyerhető oxidált alakjából. A dehidroaszkorbát glutationnal történő redukciója enzimek távollétében is lejátszódó kémiai reakció [12]. Az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy a folyamatot mind növényi, mind állati sejtekben számos enzim katalizálhatja, elektrondonorként glutationt, NADPH-t, liponsavat vagy fehérjeteriolokat használva [12–14].

Az aszkorbinsav és a glutation között fennálló kapcsolatot és annak funkcióit először kloroplasztban mutatták ki [15]. A kloroplaszt elsősége nem véletlen, hiszen a fotoszintézis során nagy mennyiségű szuperoxid-anion és hidrogén-peroxid keletkezik. Mivel a kloroplaszt nem tartalmaz katalázt, így a hidrogén-peroxid eliminálása elsősorban aszkorbát-peroxidáz segítségével történik [16]. Az aszkorbát-peroxidáz két molekula aszkorbinsav terhére a hidrogén-peroxidot vízzé redukálja, miközben két molekula aszkorbilgyök keletkezik. A szabad gyök vagy gyorsan monodehidroaszkorbát-reduktáz segítségével NAD(P)H, redukált citokróm b vagy ferredoxin terhére visszaredukálódik aszkorbinsavvá, vagy spontán módon aszkorbáttá és dehidroaszkorbáttá diszproporcionálódik. A keletkezett dehidroaszkorbát glutation terhére dehidroaszkorbát reduktáz segítségével aszkorbinsavvá redukálódik. A reakció során keletkezett glutation diszulfid, glutation reduktáz segítségével NADPH felhasználásával redukálódik vissza glutationná [16]. A H_2O_2 eliminálásának ezen útvonalát aszkor-

binsav-glutation vagy felfedezőiről Foyer-Halliwel-Asada ciklusnak nevezik. A reakcióút során sem aszkorbinsav-, sem glutationfelhasználás nem történik, azonban mindkét anyag részt vesz egy négy enzim közreműködésével zajló elektronátvitelben, mely során a NADPH-től származó elektronok terhére bekövetkezik a H_2O_2 vízzé történő redukciója (2. ábra)

Az aszkorbinsav-glutation ciklus a mitokondriumban

A kloroplaszt elektrontranszportlánc mellett a mitokondriális légzési elektrontranszportlánc is jelentős szuperoxid-anion és hidrogén-peroxid forrás. A mitokondrium védelme érdekében enzimekből és kis molekulásúlyú antioxidánsokból álló védelmi rendszert épített ki. Enzimes védelmi hálózatának legkorábban megismert tagja a szuperoxid diszmutáz. A kataláz jelenlétéről patkány-szívmitokondriumok mátrixában beszámoltak, azonban növényi mitokondriális jelenléte vitatott [17]. Ez a tény és a glutation-reduktáz mitokondriális lokalizációja [18] felvetette a lehetőséget, hogy az aszkorbinsav-glutation ciklus a mitokondriumban is működik, és fontos szerepet kap a respiráció során keletkező hidrogén-peroxid semlegesítésében.

Az aszkorbinsav-glutation ciklus valamennyi enzimének aktivitását ki lehetett mutatni Arabidopsisből, vagy borsó levélből izolált mitokondriumok esetében [13, 19]. Az enzimek latenciájának vizsgálata, valamint a mitokondrium szubfrakcionálása során kiderült, hogy az aszkorbát peroxidáz feltételezhetően a belső membránban elhelyezkedő enzim, amelynek aktív helye a két membrán közötti tér felé néz. A monodehidroaszkorbát reduktáz szintén a mitokondriális belső membránban foglalhat helyet, ellenben aktív helye nagy valószínűséggel a mátrix felé néz. A ciklus további két enzime a dehidroaszkorbát reduktáz és a glutation-reduktáz döntő többsége a mátrixban, kisebb hányada a két membrán közötti térben található [13]. Az enzimek elhelyezkedését és topológiáját proteáz emésztéses vizsgálatok is megerősítették. A monodehidroaszkorbát-reduktáz, a dehidroaszkorbát-reduktáz és a glutation-reduktáz mátrixban történő elhelyezkedése nem meglepő, hiszen működésükhöz elengedhetetlen a trikarbonsav ciklusból, illetve a fotorespirációs glicin dekarboxilációból származó NADH/NADPH.

A ciklus enzimjeinek génjeit azonosították, valamint nyomon követték a fehérjemolekulák kloroplasztba, illetve mitokondriumba történő importját. A kísérletek rendkívül érdekes eredményeket hoztak: az enzimek mindegyike egyaránt importálódhat a kloroplasztba és a mitokondriumba is, tehát kettős irányítottsággal rendelkeznek. Attól függetlenül, hogy a kloroplasztban vagy a mitokondriumban váltottak ki oxidatív stresszt, mindkét esetben egyforma mértékben nőtt meg az enzimek transzkriptumszintje. [13]. Ez azt jelenti, hogy a két organellumban működő aszkorbinsav-glutation ciklus transzkripció szinten egymástól függetlenül nem szabályozható. Amennyiben egymástól független szabályozásra is szükség lehet, az a fehérjeimport szabályozásával vagy poszttranszlációs módosításával oldható meg.

Mitokondriális aszkorbinsav/dehidroaszkorbinsav-transzport és szerepe az aszkorbinsav reciklásában

A ciklus folyamatos működéséhez a feltöltést biztosítani kell; ahhoz, hogy a mitokondrium ténylegesen részt tudjon venni az aszkorbinsav regenerációjában, mindenképpen léteznie kell egy mitokondriális aszkorbinsav/dehidroaszkorbát transzporternek, hiszen a dehidroaszkorbát redukciójáért felelős enzimek mindegyike a mitokondriális márixban helyezkedik el, míg a dehidroaszkorbát produkciójáért felelős aszkorbát-peroxidáz aktív helye a két membrán közötti tér felé néz [13]. Tehát a dehidroaszkorbátnak valahogyan a márixba, a redukálódott aszkorbátnak pedig onnan ki kell jutnia. A transzporter meglétét egy másik tény is indokolja, emlékezzünk vissza, hogy az aszkorbinsav bioszintézisének utolsó lépését katalizáló enzim, az L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz a mitokondrium belső membránjában található [5], azonban topológiája ismeretlen. Az enzim aktív helyének ismeretlen orientációja két hipotézist is felvet. I. Az enzim aktív helye a márix felé tekint. Ez esetben egy L-galaktono-1,4-lakton transzporternek kell léteznie a mitokondrium belső membránjában, mely biztosítja az enzim számára a megfelelő szubsztrátellátást, valamint egy aszkorbát transzporternek, amely a megtermelt terméket szállítja el onnan (az aszkorbinsav jelenlétét majd minden sejtorganellumban leírták, tehát mindenképpen el kell jutnia azokba a szintézis helyéről).

II. Az enzim aktív helye a két membrán közti tér felé néz. Az aszkorbát mitokondriális jelenlétét leírták, így a mitokondrium belső membránjában ez esetben is léteznie kell aszkorbáttranszporternek.

Annak ellenére, hogy ennyi érv szól a transzporter létezésé mellett, a mitokondriális aszkorbinsav-transzportot csak a közelmúltban sikerült leírni és jellemezni. BY-2 dohánysejtekből izolált mitokondriumok esetében megállapítható volt, hogy a mitokondrium mind a redukált forma aszkorbátot, mind az oxidált forma dehidroaszkorbátot felvette [20]. A redukált forma transzportja meglehetősen kis affinitást mutatott ($K_M = 36$ mM), ellentétben a dehidroaszkorbátéval ($K_M = 6$ mM). Itt érdemes megjegyezni, hogy a növényi sejtek citoszóljában az aszkorbát koncentrációja 20 mM körül van [16], valamint a kloroplaszt aszkorbáttranszporterének K_M -értéke is 18–40 mM közé esik [21]. A dehidroaszkorbát preferenciája sem egyedi. Az aszkorbinsav emlős sejtek esetében mind redukált állapotban Na^+ iongradiens terhére, Na -függő módon [22], mind oxidált formában facilitatív glükóztranszporterek révén képes a sejtbe jutni [23]. Növények esetében a plazmamembránon keresztül zajló C-vitamin-transzport preferált transzportformája sem az aszkorbát, hanem az oxidált dehidroaszkorbát [24]. Sejt-szervecskék esetében is beszámoltak mind az oxidált, mind a redukált forma transzportjáról [21, 25].

Mindkét vegyület transzportja hőmérséklet- és időfüggőnek bizonyult, továbbá telítési kinetikával rendelkezik és gátlható, ami a transzportfolyamat fehérjemediált voltát valószínűsíti. Leghatásosabb gátlószerek a glükóz és a GLUT inhibitor genistein bizonyult, ami alapján feltételezhető, hogy a transzporter rokona a kloroplasztban lévő glükóz transzlokátornak, esetleg tagja az emlős glükóz és dehidroaszkorbát transzporter GLUT-családnak. További munka szükséges a transzporter molekuláris azonosításához.

A két vegyület transzportja látszólag független a mitokondriális légzéstől. A transzportméréseket BY-2 sejtek mitokondriumából nyert mitoplasztokon is elvégezve az aszkorbát és dehidroaszkorbát transzportja a mitokondriálishoz hasonlóan bizonyult, így igen valószínű, hogy a transzporter a belső membránban helyezkedik el. A mitokondriális aszkorbinsavtranszport folyamatának megismerésével a ciklus teljessé vált (2. ábra).

Berekesztés

A mitokondrium növényi C-vitamin bioszintézisében betöltött szerepe vitathatatlan. Az aszkorbinsav körforgásban betöltött szerepe már több kérdést vet fel. Jelenleg ismeretlen a mitokondrium aszkorbinsav-regeneráló kapacitása. Nem tisztázott, hogy csak a mitokondriális anyagcsere során keletkezett hidrogén-peroxid eliminálása és az eliminálás során keletkezett dehidroaskorbát redukciója a feladata, vagy esetleg más sejtorganelumokban keletkezett dehidroaskorbát regenerálásában is szerepet vállal. A kloroplaszttal együtt történő transzkripció szabályozás mindenesetre arra utal, hogy a mitokondrium besegíthet a kloroplaszt antioxidáns védelmébe és a kloroplaszt is viszonyozhatja ezt a gesztus a mitokondrium irányába. Az egygénes szabályozással a növényi sejt egyúttal a két sejtszervecske közötti antioxidáns kommunikációt is biztosíthatja. A növényi mitokondrium aszkorbinsav regenerációban betöltött szerepe nem példa nélküli. Patkányvázizom-mitokondriumok esetében a közelmúltban írtak le egy hasonló aszkorbinsav-regenerációs ciklust [26]. Az állati ciklus során a regenerációs folyamat és a légzési elektrontranszfer kapcsoltsága bizonyítottan látszik. Növényi mitokondriumok esetében jelenleg a légzési elektrontranszferlánc szerepe sem felderített a dehidroaskorbát redukációjában.

Mind az elsődleges anyagcsere és a mitokondriális aszkorbinsav-reciklálás kapcsolatának, mind a mitokondrium aszkorbinsav-regeneráló kapacitásának megismerése csak további kísérletek útján történhet meg. A vizsgálatok során különös figyelmet kell szentelni annak a ténynek, hogy a mitokondrium a sejt életében más fontos szerepet is betölt, valamint hogy a dehidroaskorbinsav-regenerálásban más sejtszervecskék is szerepet kapnak. Így a folyamatot összességében kell górcső alá venni.

Irodalomjegyzék

- [1] Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskas, F., Mandl, J. (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**: 793–803.
- [2] Wheeler, G. L., Jones, M. A., Smirnoff, N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, **393**: 365–369.
- [3] Lukowitz, W., Nickle, T. C., Meinke, D. W., Last, R. L., Conklin, P. L., Somerville, C. R. (2001) Arabidopsis cyt1 mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 2262–2267.
- [4] Conklin P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R., Last, R. L. (2000) Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics*, **154**: 847–856.
- [5] Smirnoff, N., Wheeler, G. L. (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 291–314.
- [6] Imai, T., Karita, S., Shiratori, G., Hattori, M., Nunome, T., Oba, K., Hirai, M. (1998) L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol.*, **39**: 1350–1358.
- [7] Ostergaard, J., Persiaum G., Daveym M. W., Bauw, G., van Montagu, M. (1997) Isolation of a cDNA coding for L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J. Biol. Chem.*, **272**: 30009–30016.
- [8] Bartoli, C. G., Pastori, G. M., Foyer, C. H. (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.*, **123**: 335–344.
- [9] Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., Foyer, C. H. (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.*, **133**: 443–447.
- [10] Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Millar, A. H. (2003) Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **1604**: 159–169.
- [11] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999) Ascorbic acid. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. (Halliwell, B., Gutteridge, J., Eds.) (Oxford University Press) pp. 200–208.
- [12] Wells, W. W., Xu, D. P. (1994) Dehydroascorbate reduction. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**: 369–377.
- [13] Chew, O., Whelan, J., Millar, A. H. (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.*, **278**: 46869–46877.
- [14] Nardai, G., Braun, L., Csala, M., Mile, V., Csermely, P., Benedetti, A., Mandl, J., Bánhegyi, G. (2001) Protein-disulfide isomerase and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **276**: 8825–8828.
- [15] Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: proposed a role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**: 21–25.
- [16] Noctor, G., Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**: 249–279.
- [17] Moller, I. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**: 561–591.
- [18] Edwards, E. A., Rawsthorne, S., Mullineux, P. M. (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **180**: 278–284.
- [19] Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio L. A., Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.*, **114**: 275–284.
- [20] Szarka, A., Horemans, N., Bánhegyi, G., Asard, H. (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **428**: 73–80.
- [21] Foyer, C. H., Lelandais, M. (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea mesophyll cells. *J. Plant Physiol.*, **104**: 391–398.
- [22] Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., Hediger, M. A. (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399**: 70–75.
- [23] Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., Levine, M. (1997) Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **272**: 18982–18989.
- [24] Horemans, N., Asard, H., Caubergs, R. J. (1997) The ascorbate carrier of higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. *Plant Physiol.*, **114**: 1247–1253.
- [25] Bánhegyi, G., Marcolongo, P., Puskás, F., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. (1998) Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J. Biol. Chem.*, **273**: 2758–2762.
- [26] Li, X., Cobb, C. E., May, J. M. (2002) Mitochondrial recycling of ascorbic acid from dehydroascorbic acid: dependence on the electron transport chain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **403**: 103–110.

Ökotechnológia megalapozása fafelületek gombásodás elleni védelmére az alap kutatások szintjén

II. Faminták felületi módosítása

Fundamental studies towards eco-technological wood preservation against fungal infections II. Surface modification of wood samples

Mohammedné Ziegler Ildikó¹,
Hórvölgyi Zoltán², Billes Ferenc²

¹MTA-Kémiai Kutatóközpont, 1025 Budapest,
Pusztaszeri út 59–67.
(jelenlegi cím: Richter Gedeon Rt., Minőségirányítási
Főosztály, 2510 Dorog, Esztergomi út 27.),
E-mail: mohammedne@richter.hu

²Fizikai Kémia Tanszék, Budapesti Műszaki
és Gazdaságtudományi Egyetem,
1111 Budapest, Budafoki út 8.

Mohammed-Ziegler, I.¹, Hórvölgyi, Z.²,
Billes, F.²

¹Chemical Research Center of the Hungarian
Academy of Sciences, H-1525 Budapest,
Pusztaszeri út 59–67., Hungary (present address:
Quality Control Department, Gedeon Richter Ltd.,
H-2510 Dorog, Esztergomi út 27., Hungary)

²Department of Physical Chemistry, Budapest
University of Technology and Economics,
H-1111 Budapest, Budafoki út 8., Hungary

Összefoglalás

Projektünk célja olyan új, iparban is hasznosítható eljárás(ok) alapjainak megteremtése, amely(ek) során természetes eredetű vegyületeket alkalmazunk a fa anyagának tartósabbá tételére, helyettesítve ezzel a nehézfémeken (pl. réz-arszenáton) alapuló, napjainkban elterjedt technológiákat. A korábban már bemutatott rezgési spektroszkópiai vizsgálatok mellett a másik, általunk alkalmazott módszer a fafelület hidrofóbbá tétele szililezéssel. Ennek alkalmazása azon alapul, hogy a védeni kívánt fafelületen megvonjuk a megfelelő víztartalmat, mely köztudottan minden élő szervezet életben maradásának feltétele. A felületen elért vízlepergető hatást a dinamikus és sztatikus csepptapadási vízperemszögek mérésével, valamint az így nyert adatokból a fa felületi energiájának kiszámításával jellemeztük. A számítások elsősorban a Lifshitz–van der Waals-féle sav–bázis modellen alapulnak. Több más szerzővel egyetértésben arra a következtetésre jutottunk, hogy ennek a modellnek a használatakor ellentmondások tapasztalhatók. Ezért indokoltnak tartjuk, hogy alternatív elméleti megközelítéseket is kipróbáljunk. A nedvesedési kísérleteket teljes reflexiós infravörös spektroszkópiai és röntgenfotoelektron-spektroszkópiai mérésekkel is kiegészítettük. Jelen írásunkban bemutatunk néhány fafelület módosításával kapcsolatos eredményt.

Summary

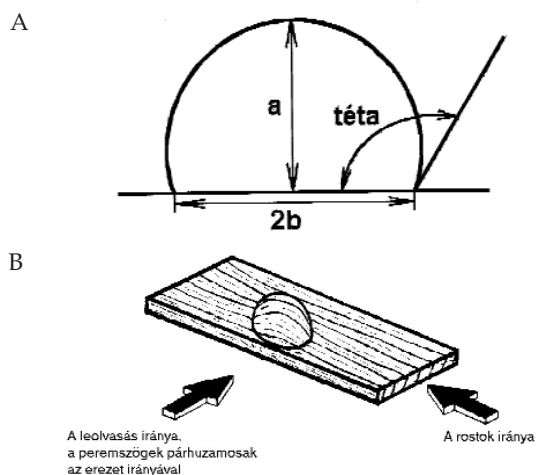
The aim of our project is to establish new, industrially applicable preserving processes for wood against fungal infections. These technologies apply natural substances in wood preservation to replace current, heavy metal based applications (e.g. copper arsenate). In addition to previously shown vibrational spectroscopic analyses for the characterization of novel processes, surface modification examinations have been performed. Silylation of different wood samples was carried out in order to render the wood surface hydrophobic. As known, water is essential for the growth of every microorganism, however, water-repellent surfaces deprive microorganisms of the moisture source. Surface free energies of the studied wood species were calculated using dynamic and static contact angles obtained by the sessile drop method. The calculation was carried out in terms of the Lifshitz–van der Waals acid–base model. In certain cases the applied model resulted in contradictions. Therefore, it is necessary to find alternative evaluation method for the description of wetting properties of such complex biological systems like wood. Wetting experiments were complemented with total reflexion infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy studies. Selected, recently obtained results from the area of surface modification are presented in this paper.

Bevezetés és áttekintés

A faszervezetek mikrobiológiai támadástól való megóvása gazdasági szempontból kívánatos. Ugyanakkor egyre nyilvánvalóbb a „zöld technológiák” kifejlesztésének szükségessége is, így az általánosan elterjedt nehézfémvegyületeken (pl. réz-arsenáton) alapuló fatartósítási eljárások kevésbé mérgező anyagokkal való helyettesítése is [1,2]. Mivel a fa kémiaiag rendkívül sokféle vegyületet tartalmaz, és ezek anyagi minősége és koncentrációja sok tényezőtől – így a fa fajtájától, életkorától, éghajlati és geológiai adottságoktól stb. – függ, bármilyen kezelés paramétereinek megállapítása és optimalizálása sokoldalú megközelítést igényel. Munkánkkal igyekszünk olyan új, iparban is hasznosítható eljárás(ok) alapjait megteremteni, amely(ek) során kevésbé mérgező vegyületeket alkalmazunk faszervezetek tartósabbá tételére.

Eddigi kísérleteinkben alapvetően kétféle módszert alkalmaztunk. Korábban már beszámoltunk az infravörös spektroszkópiai és az ehhez kapcsolódó kvantumkémiai számítások alkalmazásáról [3]. A másik – általunk alkalmazott módszer – a fafelületek hidrofobizálásán alapul, aminek célja, hogy az élő szervezetek működéséhez elengedhetetlenül szükséges víztől megfosszuk a fa felületén élő mik-

robákat. Ugyanakkor a hidrofób felületeken a mikroorganizmusok tapadóképesége is csökken [4], ezért a megfelelő kémiai felületkezelés számottevő módon megnövelheti a fából készült tárgyak élettartamát. Famintáink nedvesíthetőségét szililezéssel csökkentettük. A vízlepergető hatást a peremszögek (a folyadékprofil szilárd felszínhez való illeszkedését jellemző szög; 1. ábra) értékeinek meghatározásával, és – amennyiben lehetséges – a fa felületi energiájának számításával jellemezzük [5].



1. ábra A peremszög (más néven kontaktszög) értelmezése (A) és a peremszögmérés geometriai elrendezése a famintákon (B).



Mohammedné Ziegler Ildikó 1996-ban végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyész-mérnöki Karán, ahol PhD-hallgatóként folytatta tanulmányait a Fizikai Kémia Tanszéken. 2000-ben védte meg PhD-értekezését, majd egy évet töltött a Luleåi Műszaki Egyetemen Svédországban, itt szintén 2000-ben védte meg a műszaki licenciatúsi értekezését (a diploma és a PhD között létező tudományos fokozat). Ezután három évig az MTA Kémiai Kutatóközpontjában, az IR és Raman Spektroszkópiai Laboratóriumban folytatta posztdoktori tanulmányait. Jelenleg a Richter Gedeon Rt. Minőségirányítási Főosztályán gyógyszer-analitikával foglalkozik.

Billes Ferenc 1957-ben végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyész-mérnöki Karán, azóta az egyetem Fizikai Kémia Tanszékén dolgozik. 1971-ben lett docens, 1994 óta egyetemi magántanár, 1969-ben kandidátusi, 1992-ben akadémiai doktori fokozatot szerzett. Végzése óta foglalkozik molekulaszpektroszkópiával, elsősorban rezgési spektroszkópiával: jelenleg elsősorban molekulák modellezésével és rezgési szinképek kvantumkémiai számításokkal alátámasztott értelmezésével foglalkozik. Oktatási tevékenysége során tanított és részben jelenleg is tanít fizikát, fizikai kémiát, mérés-technikát, kémiai anyagszerkezetet, rezgési spektroszkópiát és számítástechnikát.



Hórvölgyi Zoltán 1983-ban végzett az Eötvös Loránd Tudományegyetem Vegyész Szakán. 1990-ben egyetemi doktor, 1995-ben a kémiai tudomány kandidátusa fokozatot szerzett. 1992-ig az ELTE Kolloidkémiai és Kolloidtechnológia Tanszéken dolgozott, majd 1992-től a Budapest Műszaki Egyetem Fizikai Kémia Tanszékének munkatársa. 1994-től a Kolloidkémia Csoport vezetője, 1995-től docens, 2004-től oktatási ügyekért felelős tanszékvezető-helyettes. 2000–2003-ban Széchenyi professzori ösztöndíjas. Szűkebb tudományterülete: kolloidika, funkcionális nanorétegek, nedvesedés. 2005-ben elnyerte az Országos Tudományos Diákköri Tanács Mestertanár Aranyérmét.

A vízperemszögek 90° körüli vagy annál nagyobb értéke hidrofób felszínre utal, melyen jelentős vízlepergető hatás várható. A biológiai rendszerekben lévő határfelületek azonban különösen összetett és sajátos tulajdonságokat mutatnak, ezért ezek vizsgálatához fokozott figyelem szükséges. A fa porózus jellege miatt 90°-nál kisebb peremszögű folyadékok alkalmazása esetén számolni kell egy folyadékfelszívó hatással. A felületi érdekesség sem elhanyagolható, a nedvesíthetőség jobb a faszemek orientációjának irányában. További bonyolító tényező a felület kémiai heterogenitása. Ennek következménye, hogy a felület nem jellemezhető egyértelműen egyetlen egyensúlyi peremszögérték megadásával. Ezért nem elégedtünk meg pusztán a vízperemszög mérésével.

Vizsgálataink során hat európai (erdei fenyő, juhar, mogyoró, magas kóris, égerfa) és hat trópusi (guava, mandula, tíkfa, szegfűszeg, mangó, olvasószemfa) fafajtát kezeltünk klór-trimetil-szilánnal, oktadecil-triklór-szilánnal és trimetil-szilil-*N,N*-dimetil-karbamáttal [6]. A fafelületek felületi szabad energiáját (felületi feszültségét) különböző folyadékok (víz, formamid és dijudmetán) peremszögeiből számítottuk több elméleti modell (Lifshitz–van der Waals sav–bázis modellje, valamint Chang [7]) alapján is. Úgy találtuk – más kutatókkal [8] egyetértésben –, hogy a Lifshitz–van der Waals sav–bázis modell alkalmazása bizonyos esetekben elfogadhatatlan (irreális eredményeket szolgáltat), holott ma ez a leginkább elterjedt modell felületi szabad energia számítására a szakmai közéletben. Eredményeink [4,8] alapján úgy tűnik, a modell összetett biológiai rendszerek, így a fa felületi szabad energiájának számítására csak korlátozottan alkalmazható. Újabban alternatív elméleti modelleket is bevontunk kísérleti eredményeink értékelésébe [9–12].

A fa felületén kialakult molekuláris film szerkezeti jellemzőit az ún. gyengített, teljes reflexiós infravörös spektroszkópia (ATR–FTIR) alkalmazásával határoztuk meg [13]. Bizonyos mintákon röntgenfotoelektron-spektroszkópiás (XPS/ESCA) méréseket is végeztünk a felület atomi összetételének meghatározása céljából, hogy azután az így kapott analitikai információkat a kezelt fafelület nedvesedési tulajdonságaival összefüggésbe hozzuk.

Fafelületek szabad energiájának meghatározása kísérletileg mért peremszögekből

Közismert, hogy részleges nedvesítés esetén a folyadék csepp alakjában helyezkedik el a szilárd felszínen, és így a cseppkontúr szilárd felszínnel bezárt illeszkedési szöge (perem- vagy kontakt-szög) jellemzi a nedvesíthetőséget [7]. Az érintkező fázisok felületi szabad energiája (felületi feszültsége) és a csepp peremszöge közötti összefüggést a jól ismert Young-egyenlet írja le:

$$\gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (1)$$

ahol θ az egyensúlyi peremszög, γ_{lv} és γ_{sv} a folyadék/gőz és a szilárd/gőz határfelületet jellemző szabad energia, és γ_{sl} a szilárd/folyadék határfelület szabad energiája. Ebből az egyenletből a szilárd felületet jellemző γ_{sl} és γ_{sv} közvetlenül nem határozható meg, mert kísérletileg csak γ_{lv} és a peremszög mérhető. Az algebrailag szükséges második egyenletet a nedvesedélméletben ismert, különféle modellek más-más feltevések alapján különféleképpen írják fel. Ezek közül az egyik legismertebb az általunk is alkalmazott Lifshitz–van der Waals-féle sav–bázis elmélet (a továbbiakban LW-AB elmélet), mely szerint, a molekuláris kölcsönhatások alapján a felületi szabad energia két részre bontható: az ún. Lifshitz–van der Waals (diszperziós, γ^{LW}) és a sav–bázis (γ^{AB}) komponensekre:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (2)$$

A sav–bázis komponens egy elektronakceptor (γ^+) és egy -donor (γ^-) részre bontható az alábbi kifejezés szerint:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (3)$$

Szilárd–folyadék határfelületre általánosan felírható a (4) és (5) egyenlet, melyeket a komponensekre vonatkozó heurisztikus (2) és (3) egyenlet Young-egyenletbe helyettesítésével kapunk:

$$\gamma_{sl}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_{lv}^{LW}} - \sqrt{\gamma_{sv}^{LW}} \right)^2 \quad (4)$$

$$\gamma_{sl}^{AB} = 2 \left(\sqrt{\gamma_{sv}^+ \gamma_{sv}^-} + \sqrt{\gamma_{lv}^+ \gamma_{lv}^-} - \sqrt{\gamma_{sv}^+ \gamma_{lv}^-} - \sqrt{\gamma_{sv}^- \gamma_{lv}^+} \right) \quad (5)$$

ahol az *s*, *l* és *v* index a szilárd-, folyadék- és a gőzfázist jelöli. A γ^+ szimbolizálja a felületi szabad energia savas (akceptor) és γ^- a bázikus (donor)

részét. A (3), (4), (5) és az (1) kifejezés egybevetéséből a következő összefüggés vezethető le:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_{lv} = 2(\sqrt{\gamma_{sv}^{LW} \gamma_{lv}^{LW}} + \sqrt{\gamma_{sv}^+ \gamma_{lv}^-} + \sqrt{\gamma_{sv}^- \gamma_{lv}^+}) \quad (6)$$

Ez az egyenlet három ismeretlent tartalmaz, ezért három tesztfolyadék ugyanazon szilárd felületen mért egyensúlyi peremszögét kell ismernünk kiszámításához. (Meg kell jegyeznünk, hogy a szilárd-gőz határfelület három felületifeszültségkomponense csak akkor nem ismeretlen, ha függetlenek az alkalmazott folyadékok – gőzeik – minőségétől, amint azt fel is tételezzük ennél a kiértékelési módszernél.) A tapasztalatok azt mutatják, hogy a folyadékok közül egynek apolárisnak, a másik kettőnek polárisnak kell lennie; a folyadékok nem megfelelő megválasztása hibás, irreális felületi szabadenergia-értékeket eredményez [14]. A Lifshitz–van der Waals komponenst ebben az esetben közvetlenül számíthatjuk az apoláris folyadék peremszögéből, amely – az elterjedt gyakorlatnak megfelelően – esetünkben is a dijód-metán (j). Mivel az apoláris folyadékoknak csak diszperziós (Lifshitz–van der Waals) komponenst van, a (6) egyenlet a következőképpen egyszerűsödik:

$$\gamma_{sv}^{LW} = 0,25 \gamma_{jv}^{LW} (1 + \cos \theta_j)^2 \quad (7)$$

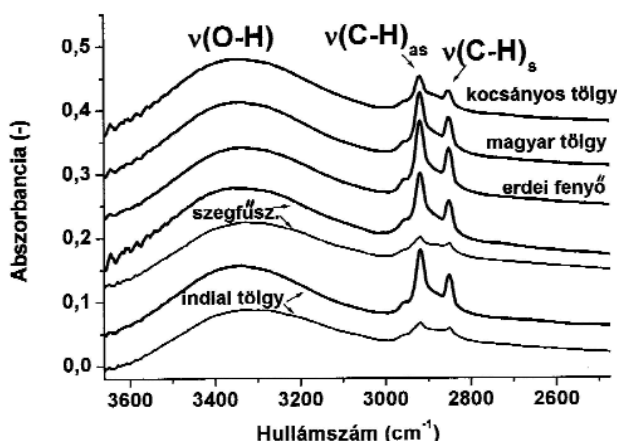
A mérésekhez felhasznált tesztfolyadékok néhány fizikai állandóját a I. táblázat tartalmazza.

Faminták felületmódosítása több szililezőszer egymást követő alkalmazásával

A vizsgálatokhoz három európai és két trópusi famintát választottunk ki: az erdei fenyőt (*Pinus sylvestris* L., Észak-Svédországból), a kocsányos tölgyet (*Quercus robur* L., Dél-Svédországból) és a magyar tölgyet (*Quercus frainetto* Ten., Magyarországról), továbbá az indiai tölgyet (*Factona grandis*) és a szegfűszeget (*Eugenia aromatica*) (a két utóbbi Zanzibárból, Tanzániából származik). A kémiai felületmódosítások hatékonysága a „független felületi hatások elve” [15] alapján magyarázható. Eszerint a felületnek a tömbfázis anyagától eltérő kémiai összetételű, akár monomolekulás vastagságú réteggel történő bevonása a rétegre jellemző felületi (pl. nedvesedési) viselkedést eredményez. Hidrofobizálás esetén a nagy felületi szabad energiáért felelős csoportokat (pl. hidroxilcsoportokat) kicseréljük, illetve lefedjük kis felületi

energiát biztosító csoportokkal (pl. alkilcsoportokkal). Szililezőskor a protikus természetű OH-csoportok reagálnak az alkilcsoportokat tartalmazó szililezőszer molekuláival. Munkánk során a következő vegyszereket használtuk. Szililezőszerek: dimetil-diklór-szilán (DDS) (Fluka, >98%), trimetilklór-szilán (CTMS) (Merck, >99%) és oktadecil-triklór-szilán (OTS) (Merck, 98%). Oldószer és nedvesedési tesztfolyadékok: *n*-hexán (Merck, 99%), formamid (Aldrich, 99%), dijód-metán (Sigma, 99%), ioncserélt desztillált víz (Millipore). A peremszögek méréséhez egy házilag összeállított videooptikai leképező rendszert használtunk. A szililezést a szakirodalomban leírt eljárás [16] szerint hajtottuk végre.

A mintákat első lépésben OTS (vagy DDS) 1%-os hexános oldatával 5 percig szilileztük. A szililezés után a mintákat szárítottuk, majd mértük a peremszögeket. A minták másik részét CTMS 1%-os hexános oldatával is szilileztük, hogy ezzel az egyfunkciós szililezőszerrel lezárjuk a trifunkciós szililezőszer aktív (továbbépíthető) láncvégeit (azaz az esetlegesen megmaradt klóratomokat vagy a hidrolízissel keletkező OH-csoportokat apoláris, a hidrofobitást okozó alkilcsoportokkal cseréljük ki). A klórszilánok a fában található hidroxilcsoportokkal reagálnak úgy, hogy először a legreaktívabb, szabadon elérhető csoportokat fogyasztják el, amelyek az extraktív vegyületekben találhatók főleg, és még valamennyi a fa ligninjén. A cellulóz hidroxilcsoportjaival a reakció nem hatékony, mivel ezek nagyon erős hidrogénkötésben vannak a cellulózzrostokban, azaz ezen OH-csoportok nem reaktívak. A szililezés és/vagy szorpció megtörténtét ATR-FTIR méréssel is igazolni tudtuk, ugyanis a szililezéssel a felületre bevitt alkilcsoportok metilcsoportjainak vegyértékrezgése az infravörös színképen megjelenik (2. ábra, szimmetrikus és aszimmetrikus C-H rezgési sávok: $\nu(\text{C-H})_s$, $\nu(\text{C-H})_{as}$). A peremszögmérés elrendezését az 1b ábra szemlélteti. A peremszöget az 1a ábrán bejelölt geometriai adatokból (a, 2b) trigonometriai összefüggés alapján számíthatjuk ki, feltéve, hogy a felületen ülő csepp gömbszelet alakú, azaz a gravitáció csepp alakra gyakorolt hatása elhanyagolható, mely az alkalmazott cseppméreteknél (15–20 μl) teljesül. A vizuális csepptapadási vizsgálatok során jellegzetes különbségek mutatkoztak az ülőcseppek alakjában, például az oktadecil-triklór-



2. ábra Kezelt fafelületek ATR-FTIR felvételei és a legfontosabb rezgési sávok hozzárendelése a 3650–2500 cm^{-1} frekvenciatartományban; vékony vonal: kezeletlen fa, vastag vonal: oktadecil-triklór-szilánnal szililezett minta.

szilánnal, majd klór-trimetil-szilánnal két lépésben kezelt indiai tölgyön elhelyezkedő vízcsepp, valamint a hasonló kétlépéses kémiai hidrofób felületmódosításnak alávetett fenyőmintán elhelyezkedő dijud-metán-csepp peremszögében.

A három mintasorozatra kapott eredményeket és a belőlük számított felületi szabadenergia-komponenseket a II. táblázatban tüntettük fel. A táblázat adataiból látható, hogy – várakozásainknak megfelelően – az OTS erősebben hidrofobizálja a felületet, mint a DDS, és hogy az OTS és a CTMS együttes alkalmazásával a vízlepergető hatás további erősödését érthetjük el. Szórást mutat a szegfűszegfa, amely kevésbé szilileződött DDS reagenssel, mint a többi minta, viszont erősebben vízlepergető, vagyis kisebb felületi szabad energiájú a felülete OTS reagenssel kezelve, mint a többi mintának. Ez utóbbi tapasztalat összhangban van a kloroformos oldatból történő szililezési eredményekkel is [5]. Érdekes az indiai tölgy viselkedése, amelynél, bár rajta a vízperemszög értéke hasonló a többi mintán mérthez, mégis meglepően magas a felületi szabad energia értéke. Ennek oka minden bizonnyal az, hogy a tesztfolyadékok egy része (pl. a dijud-metán) speciális kölcsönhatásba léphet a kezelt felülettel [5]. A jelenség hátterét jelenleg is kutatjuk. Ez egyúttal arra is rávilágít, hogy egyetlen vízperemszögérték még önmagában nem jellemzi egyértelműen a felületek nedvesedési tulajdonságait, és kiemeli a sokoldalú nedvesedési vizsgálatok szükségességét.

Itt kell megemlítenünk azokat az anomáliákat, amelyeket – irodalmi adatokkal [7,17] egyezően – esetünkben a faminták felületi szabad energiájának meghatározásánál tapasztaltunk. A minták felületi szabad energiájának számításánál de Meijer és mtsai [8] módszerét követtük, vagyis ahol az egyenlet megoldása negatív értéknek adódott, ott a felületiszabadenergia-komponenst negatív hozzájárulásként vettük figyelembe. Erre azért volt szükség, mert a (6) és (7) egyenletbe a tesztfolyadékok irodalmi felületiszabadenergia-értékeit (I. táblázat) és a mért peremszögértékeket behelyettesítve lineáris egyenletrendszer kapunk, amelynek megoldása a felületiszabadenergia-komponensek négyzetgyökeit adja. Elméletileg azonban a felületi szabad energia csak pozitív lehet [7], és így annak négyzetgyöke is csak pozitív értéket vehet fel. Az irodalomban [8] a jelenséget azzal magyarázták, hogy a vízperemszögértékek nagyon magasak voltak erősen hidrofób felületeken, s ez összefüggésben áll a felületi érdességgel is. Alkalmazva a negatív hozzájárulás figyelembevételét, reális felületiszabadenergia-értékeket kapunk a vizsgált famintákra. A helyzet tovább bonyolódik a még erősebben kezelt felületeknél, esetünkben az OTS és CTMS egymás utáni alkalmazásával készített mintáknál, ahol még így sem tudtuk kiszámítani a kezelt faminták felületi szabad energiáját. A jelenség magyarázatát még keressük.

Perspektívák

Hosszú távú tervünk, hogy a gombaölő hatóanyaggal történő impregnációt és a vízlepergető bevonat képzését kombináljuk, az így kapott gombaölő hatást mikrobiológiai tesztelésnek vessük alá néhány elterjedt vörös és fehér rothasztó gombafajjal szemben. A két módszer kombinált alkalmazásának legnagyobb kihívása, hogy míg az extraktum gombaölő hatású vegyületeinek fungicid hatását a hidroxilcsoportok jelenlétével hozzák összefüggésbe [18], addig a vízlepergető felület kialakításánál alkalmazott szililezési eljárások során a hidroxilcsoportokat „elfogyasztjuk”, azaz apoláris csoportokra cseréljük ki. Ennek megoldására eljárást kell kidolgozni: elképzelhető, hogy a hidrofobizált fafelület alatt ki kell majd alakítani egy gombaölő hatású, faextraktummal impregnált réteget.

I. táblázat A méréshez használt folyadékok néhány jellemző fizikai adata és felületiszabadenergia-komponense

Folyadék	Sűrűség (kg/m ³)	Viszkozitás (mPa.s)	Felületi szabad energia (mJ/m ²) (LW-AB elmélet)				
			γ_{lv}^{LW}	γ_{lv}^*	γ_{lv}	γ_{lv}^{AB}	γ_{lv}
víz	1000	1,00	21,8	25,5	25,5	51,0	72,8
formamid	799	1,02	39	2,28	39,6	19	58
dijód-metán	3325	2,80	50,8	0	0	0	50,8

II. táblázat Különböző tesztfolyadékokkal kapott peremszögértékek és a Lifshitz–van der Waals sav–bázis modell alapján számított felületiszabadenergia-komponensek

Faminták	Peremszög (fok)			Felületi szabad energia (mJ/m ²)			
	víz	formamid	dijód-metán	γ_{sv}^{LW}	γ_{sv}^*	γ_{sv}	γ_{tot}
1% dimetil-diklór-szilán							
erdei fenyő	129±3	104±1	66±2	25,11	(-),1,75	(-),0,41	25,8
kocsányos tölgy	108±3	92±3	70±3	22,86	(-),0,32	1,26	22,5
magyar tölgy	125±2	101±2	71±1	22,30	(-),0,71	(-),0,20	22,4
szegfűszegfa	124±1	87±2	38±2	40,56	(-),1,15	2,69	43,6
indiai tölgy	129±2	108±2	72±1	21,75	(-),1,89	(-),0,07	21,9
1% oktadecil-triklór-szilán							
erdei fenyő	134±2	113±2	68±2	23,97	(-),3,84	(-),0,13	24,5
kocsányos tölgy	133±2	97±2	73±1	21,20	(-),0,00	(-),3,62	21,2
magyar tölgy	135±1	102±2	61±1	27,97	(-),1,49	(-),2,43	31,6
szegfűszegfa	127±1	100±2	81±2	16,97	(-),0,00	(-),0,76	17,0
indiai tölgy	132±1	113±1	25±2	46,12	(-),15,51	0,00	46,1
1% oktadecil-triklór-szilán + 1% klór-trimetil-szilán							
erdei fenyő	140±2	128±3	94±2	3,25	5,28	(-),5,08	?
kocsányos tölgy	131±2	117±2	67±3	(-),125,8	192,7	(-),1,00	?
magyar tölgy	135±4	126±2	81±2	(-),106,1	150,3	(-),0,35	?
szegfűszegfa	136±1	118±1	80±2	(-),61,49	110,57	1,47	?
indiai tölgy	141±2	125±2	77±1	(-),120,7	174,44	(-),2,01	?

Köszönetnyilvánítás

Ezt a munkát részben az OTKA támogatta (T049156 és T037643). M. Z. I. köszönetét fejezi ki a Sigma-Aldrich Kft.-nek a Sigma Díj III. helyezéseért (2005).

Irodalomjegyzék:

- Hingston, J. A., Collins, C. D., Murphy, R. J., Lester, J. N. (2001) Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: A review. *Environ. Pollut.*, **111**: 53–66.
- Saarela, K.-E., Harju, L., Lill, J.-O., Rajander, J., Lindroos, A., Heselius, S.-J. (1999) Thick-target PIXE analysis of chromium, copper and arsenic impregnated lumber. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, **150**: 234–239.
- Mohammedné Ziegler I., Billes F., Hörvölgyi Z. (2006) Ökotechnológia megalapozása fafelületek gombásodás elleni védelmére az alap kutatások szintjén. I. Rezgési spektroszkópiai vizsgálatok. *Biokémia*, **XXX**: 15–18.
- Jenney, C. R., Anderson, J. M. (1999) Alkylsilane-modified surfaces: Inhibition of human macrophage adhesion and foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**: 11–21.
- Mohammed-Ziegler I., Oszlanczi Á., Somfai B., Hörvölgyi Z., Pászli L., Holmgren, A., Forsling, W. (2004) Hydrophobicity of natural and surface modified tropical and european wood species. *J. Adhesion Sci. Technol.*, **18**: 687–713.
- Knausz D., Meszticzky A., Szakács L., Csákvári B., Ujszászy K. (1983) Trimethylsilylated N-alkyl-substituted carbamates. I. Preparation and some reactions. *J. Organomet. Chem.*, **265**: 11–21.
- Lyklema, J. (2000) Fundamentals of interface and colloid science, Vol. III, (Academic Press: San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo) Chapter 1.
- de Meijer, M., Haemers, S., Cobben, W., Militz, H. (2000) Surface energy determinations of wood: Comparison of methods and wood species. *Langmuir*, **16**: 9352–9359.
- Pászli, I. (1987) A sztatikus kapilláris jelenségek paraméteres elmélete, Kandidátusi Értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
- Pászli, I., Mohammedné Ziegler, I. (2005) A peremszögmérések alternatív értelmezéséről. *Magy. Kém. Foly.*, **111**: 79–82.
- Pászli, I., László, K. (2004) Individual variables in capillarity. *Colloid Polym. Sci.*, **282**: 243–249.
- Pászli, I., Hörvölgyi, Z., Mohammed-Ziegler, I. (2005) Novel approach(es) to determine the surface free energies of surface modified wood species of technological interest. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies. (Marosi G., Czigány, T., Eds.), (European Polymer Federation, Budapest).
- Mohammed-Ziegler, I., Marosi, Gy., Matkó, Sz., Hörvölgyi, Z., Tóth, A. (2003) Silylation of wood for potential protection against biodegradation. An ATR-FTIR, contact angle and XPS study. *Polymers Adv. Technol.*, **14**: 790–795.
- Wälinder, M. E. P., Gardner, D. J. (2002) Acid-base characterization of wood and selected thermoplastics. *J. Adhesion Sci. Technol.*, **16**: 1625–1649.
- Langmuir, I. (1925) Colloid symposium monograph. (The Chemical Catalog Company, New York) p. 48.
- Hörvölgyi, Z., Kiss, É., Pintér, J. (1986) Különböző nedvesedésű, szililezett üvegfelületek előállítására és vizsgálata. *Magy. Kém. Foly.*, **92**: 488–494.
- Barsberg, S., Thygesen, L. G. (2001) Nonequilibrium phenomena influencing the wetting behavior of plant fibers. *J. Colloid Interface Sci.*, **234**: 59–67.
- Rajon, A. M., Enjalberg, L. (1973) The antiseptics (classification and choice) [Les antiseptiques (au sujet de leur classification et de leur choix)]. *Rev. Med. Toulouse*, **9**: 811–816.

Bioanalitika: elméleti mechanizmusvizsgálatoktól a környezeti és egészségügyi alkalmazásokig

Megalakult a Magyar Kémikusok Egyesülete Bioanalitikai Szakcsoportja



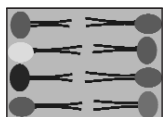
A nagyszerű elméletek gyakorlati megvalósításának akadálya nemegyszer a megfelelő kísérletes metodika hiánya. Ez a hiány vagy csak látens hiány számtalanszor keserítette már meg az egyszeri biokémikus életét. Ugyanakkor gyakran hallani analitikai kémiával, fizikával foglalkozó emberektől, hogy bár újszerű analitikai eljárás birtokában vannak, de a célközönség, az eljárást esetlegesen felhasználó biokémikus, biológus nem ismeri azt, vagy akár létezéséről sem tud.

Ezen kettős igényt felmérve a Magyar Kémikusok Egyesülete Analitikai Szakosztályának elnöke, Horvai György elhatározta, hogy segíti a módszerfejlesztők és a potenciális felhasználók egymásra találását, és indítványozta a szakosztályon belül a Bioanalitikai Szakcsoport megalakítását. A szakcsoport szervezőbizottsága (Gyurcsányi Róbert BME Általános és Analitikai Kémia Tanszék, Puskás László SzBK Funkcionális Genomika Labor, Szarka András BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék) 2006. január 31-ére hívta össze a szakcsoport megalakuló ülését. A rendezvényen több tudományterület és a határtudományok képviselői vettek részt, különféle egyetemekről (Borgulya Gábor – Semmelweis Egyetem, II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Gyurcsányi Róbert – BME Általános és Analitikai Kémia Tanszék, Horvai György – BME Általános és Analitikai Kémia Tanszék, Horváth Viola – BME Általános és Analitikai

Kémia Tanszék, Mészáros Tamás – BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Szarka András – BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Vonderviszt Ferenc – Veszprémi Egyetem, Nanotechnológia Tanszék), kutatóintézetekből (Adányiné Kisbocskói Nóra – Központi Élelmiszertudományi Kutatóintézet, Fürjes Péter – Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet, Kurunczi Sándor – MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutató Intézet, Lőrincz Zsolt – MTA SZBK Enzimológiai Intézet, Puskás László – MTA Szegedi Biológiai Központ, Székács András – MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Széll Márta – MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport) és kémiai/biokémiai cégektől (Farkas Uzonka – 77 Elektronika Kft., Micsinai Adrienn – BIOMI Kft., Rass Péter – Sigma-Aldrich Kft., Tolokán Antal – Dr. E. Wessling Kémiai Laboratórium Kft., Tóth Károly – Roche Magyarország Kft.). A résztvevők röviden bemutatták kutatási területüket, valamint meghatározták a szakcsoport további tennivalóinak körét. A szakcsoport általános célkitűzései között a következőket jelölték meg: (1) előadás-sorozatok/konferenciák szervezése; (2) konzorciumi pályázatok, szakmai együttműködések háttérének biztosítása; (3) bioanalitikai szakképzés/továbbképzés kialakítása.

Az első bioanalitikai előadás-sorozat idén ősszel kerül megrendezésre. A szakcsoport szervezői örömmel vesznek minden érdeklődést.

Szarka András



9th International Congress on Phospholipids

September 8-10, 2006, Pécs, Hungary

The International Lecithin and Phospholipid Society (ILPS) organizes its 9th Congress

"Phospholipids for Health"

with the focus on nutrition and biochemistry of phospholipids. Highly qualified experts will present in 4 sessions 20+ papers with latest research topics. Each session will have 5-6 speakers, who are leading experts in their fields of phospholipid science. The program gives time for meeting experts and communication with colleagues.

Organizers: Michael Schneider (ILPS Pecs2006 Congress Program Director), Willem van Nieuwenhuyzen (ILPS Executive Director), László Víg (HAS Biological Research Center), Zoltán Kóta (HAS Biological Research Center)

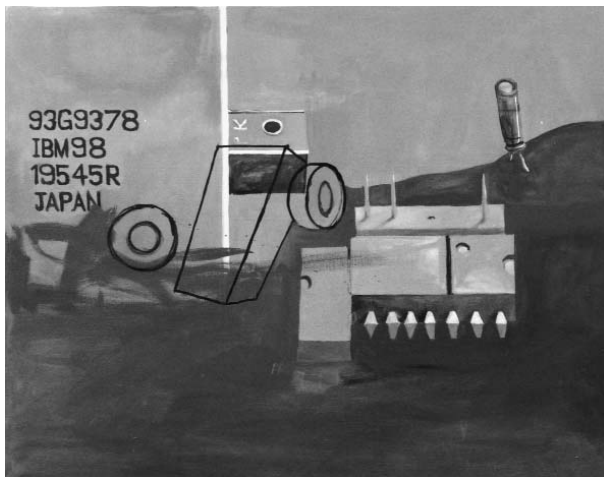
Web: <http://www.ilps.org>

E-mail: ilps@lecipro.nl



Utcai Dávid, *Háború* (2003), olaj-vászon

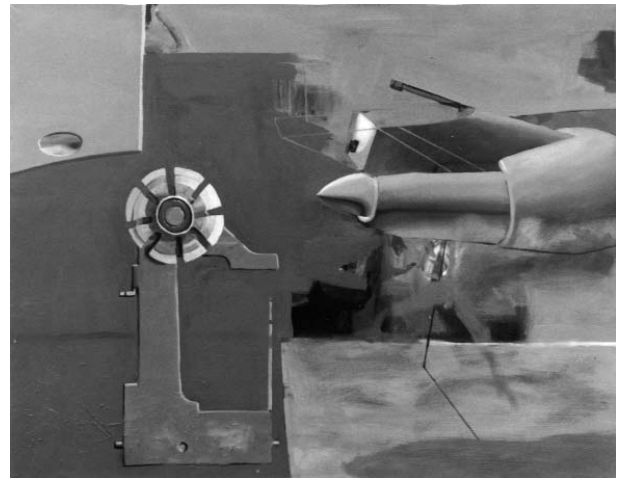
Utcai Dávid 1978-ban született Újvidéken, az akkori Jugoszláviában. Az újvidéki formatervezői középiskolát befejezve, a budapesti Magyar Nyelvi Intézet nulladik évfolyamán folytatta tanulmányait. Ott művészettörténetet tanult, de párhuzamosan a Budai Művelődési Központba (BMK) is eljárt rajzolni Üveges Gábor festőművész csoportjába, akitől – saját bevallása szerint – igen sokat tanult. 1998-ban felvették a Magyar Képzőművészeti Egyetem festő szakára, Károlyi Zsigmond (aki oktatási programjában fotómontázs-, önarckép-, „tárgy”-ábrázolási, portré- és tükrökép-technikákat, valamint szintanulmányokat egyaránt szerepeltetett) osztályába, ahol 2003-ban diplomázott. Az elmúlt tíz év során több művésztelepen vett részt, leginkább Délvidéken, de Magyarországon is, s önálló és csoportos kiállításokon szerepelt úgy Magyarországon (Budapesten és Esztergomban), mint a Délvidéken (Temerinben, Újvidéken, Szabadkán és Óbecsén). Aktívan részt vesz a vajdasági kulturális életben: 2004-ben a Dombos Fest vajdasági kulturális fesztiválon állított ki, 2005-ben a Temerin és Esztergom városok közötti kulturális együttműködés jegyében az Esztergomi Vármúzeum Rondella Galériájában mutatta be képeit. A Temerini Alkotóműhely és Képzőművészeti Tábor és a Pázmány Péter Diákklub által fiatalok számára szer-



Utcai Dávid, *Japán* (2003), olaj-vászon

vezett történelmi, irodalmi és képzőművészeti tábor művészeti vezetője (Milinszki Árpád, Matuska Ferenc és Szervas Sándor mellett).

Alkalmazott festészeti technikája gyakran hagyományos (olaj-vászon), kifejezőmódja korántsem: dinamikus, absztrakt képeket fest, melyek mind figuratív erővel, mind élénk színkezelésükkel megragadják a szemlélőt. Munkásságáról így ír: „Az egyetemi évek alatt sok, különféle stílus hatott rám, aminek következtében meglehetősen sokféle festményt készítettem. Még diplomázásom évében szükségét éreztem annak, hogy összefoglaljam az addig tapasztaltakat a festészetben. Az itt látható képek is ilyen összefoglalások, fúziók. Tapasztalatcsokrok. ... A képeimről nem tudok sok mindent írni. Még nem forrta ki magát a szemé-



Utcai Dávid, *Vektorok* (2003), olaj-vászon



Utcai Dávid, *Csodálkozó gyermek*, (2002–2003), olaj-vászon

lyiségem, ha lehet ilyet mondani. Adalékul az önéletrajzhoz még annyit fűznék, hogy Sinkovics Ede az, akinek igazán sokat köszönhetek a festészetben. ... Az egyetem befejezte óta ismét a szülőföldemen élek, Temerinben. Van egy műtermem, ahol a személyiségemen dolgozom a festészet által egy őszinte és sajátos kifejezőmód érdekében.”

Készüljön a kánikulára!

ULT130 személyi fagyasztóláda

bevezető ár

2990,- Euro*

Teljesen új mélyfagyasztó technológia

A dán Tenac világújdonsága az ULT130 személyi fagyasztóláda

- 130 L hasznos térfogat akár 8400 db 2 mL-es fagyasztócső tárolására
- nagy hőmérséklet kijelző
- beállítható hőmérséklet tartomány -85°-tól -60°-ig
- környezeti (üzemeltetési) hőmérséklet: 10-30 °C
- hőmérséklet stabilitás: ±0,5°C
- saját áramellátású, akusztikus riasztás
- bemenet CO₂ biztonsági rendszernek
- kilinccsel záródó tető
- egyszerű leolvasztás: olvadékvíz elvezető nyílás
- erős gurítókerék
- egyfázisú Danfoss® kompresszor
- energiatakarékos

Jelen hirdetés nem minősül ajánlatnak, a változtatás jogát fenntartjuk. A forintos árak az Euro forint-árfolyam 280 Ft/Euro szintjének meghaladásáig ill. az akció végéig érvényesek. Az akciós árak 2006. augusztus 31-ig érvényesek. A feltüntetett árak nem tartalmazzák az áfát.

* Nem tartalmazza a házhozszállítást költségét

** A hűtődoboz ára a készlet erejéig érvényes.



A kép illusztráció!



ZENON Bio Kft. 6721 Szeged, Maros u. 40.
Telefon: (62) 424-290 Tel/fax: (62) 476-558
E-mail: info@zenonbio.hu
honlap: www.zenonbio.hu

WPA Biowave II

Bio fotométer

Új!

Akció!

*Hűtőblokk
25 db 0,5 ml
36 db 1,5 ml cső
befogadására.
Mintáit több mint fél
óraig nulla, több mint
egy óráig 4°C alatt
tartja!*

most csak**

~~44500~~ **8990,- Ft**

bevezető ár

~~1-204-750,-~~

999 990,- Ft

Egyszerűen kezelhető fotométer, nagy energiájú Xenon fényforrással, villámgyors spektrum szkenneléssel, beépített biokémiai módszerekkel.

Nagy méretű kijelzője grafikus. Szoftvere több hullámhosszon mérő módszerekre, kinetikai vizsgálatokra, több sztenderdes kalibrálásra felkészített. Beépített módszerei:

- nukleinsav mennyiségi meghatározás (DNS, RNS, oligo), tisztaságellenőrzés - A260/A280 arány, RNS minták ellenőrzése 230 nm-en
- fehérje meghatározó módszerek (BCA, Biuret, Bradford & Lowry)
- sejtdenzitás mérés

Használható mikro- és ultramikro- küvetákkal is. Max fényúthossz 40 mm.

Optikai rendszere két csatornás, monokromátoros, mozgó alakrészt nem tartalmazó hosszú élettartamú Gifford optika.

Hullámhossztartomány: 190 - 1100 nm Sáv szélesség: 5 nm

A vezeték nélküli Bluetooth tartozékkal távoli, vagy a beépített USB porton keresztül közvetlen adatgyűjtő számítógéphez csatlakoztatható.

Nyomatató opció.

2006. augusztus végéig akciós áron!



SZKARABEUSZ

Szkarabeusz Környezetvédelmi és Kereskedelmi Kft.; Pécs, Nagy Imre u.148.
Vegyszerbolt, raktár: Pécs, Verseny u.17. Tel.: 72/532-828, Fax.: 72/532-829
skarab@axelero.hu • www.szkarabeusz.hu

SERVA
Electrophoresis

Fine Biochemicals

- Gyógyszerkönyvi minőségű anyagok: antibiotikumok, aminosavak,
- Antibiotikumok: Cerulenin, Geldanancin, Nigericin, Rapamycin, Trichostatin A, Vancomycin
- Elektronmikroszkópia: SPURR Embedding Kit
- Fehérjekémia: 50 különböző Proteáz inhibitor, inhibitor mixek
- Jelátvitel: 6 új Protein kináz

Electrophoresis

- SERVALYTE Blank PRECOTES
- NetFix technológia; PreNets géll
- SDS PreNets blotting kit
- dialízishez: DiaEx Midi Kit
- Protein Concentration Kit
- Festékek
- Fehérje: Standardok, Proteome Markers
- Nukleinsav elektroforézis, Native PreNets
- Submarine Electrophoresis
- Software: Digital Image Analysis System, Cell explorer

Life Sciences

- DNase, RNase mentes reagensek, vegyszerek
- Nukleotidok és keverékek
- Protoplazst fúzió: Funculase

Collagenase

- Collagenase NB szövettani felhasználásra

Ion exchange media

- Serdolit, DOWEX, Servacel

Enzimek/koenzimek/inhibitorok

Panreac

Panreac Química S.A.

Finomvegyszerek, reagensek

- *Műszeres analízishez szükséges termékek*
- HPLC oldószerek: GG, isokratikus, prep.
- Ion-pár reagensek, oldószerek peszticid szermaradvány analízishez
- Spektroszkópiás oldószerek (UV, IR)
- GC standardok
- *Vízmentes, szárított oldószerek*

- *Deuterizált anyagok NMR analízishez*

- *Nyomelem-analízishez reagensek*

Analpur (szennyezőanyag csak ppb tart.)
Hiperpur (szenny.a. **kevesebb**, mint 1 ppb)
Hiperpurplus (szenny.a. **kevesebb**, mint 100 ppt)
Alacsony Hg-tartalmú reagensek
AAS standardok, ICP standardok

- Nagytisztaságú oldószerek: n-Hexán, Acetonitril, Aceton, Diklórmetán, Metilalkohol stb.
- Nagytisztaságú savak, reagensek: HCl, HNO₃

CULTIMED Mikrobiológiai termékek

CODEX: Gyógyszerkönyvi minőségű alapanyagok

ADITIO: Élelmiszer-ipari minőségű alapanyagok

(antioxidánsok, stabilizátorok, pH-szabályozók, ásványi sók stb.)



In memoriam Simoncsits András

2006. április 23-án Triesztben meghalt kollégánk, Simoncsits András. A molekuláris biológiának a hetvenes-nyolcvanas években végbement korszakváltását megalapozó nukleinsav-technikák egyik úttörője távozott közülünk.

1949. március 4-én született Lébényben. 1972-ben szerzett vegyészdiplomát Szegeden, a József Attila Tudományegyetemen. Kutatói pályáját az akkor induló Szegedi Biológiai Központban, Tomasz Jenő nukleotidkémiai foglalkozó laboratóriumában kezdte. Egyetemi doktori értekezésének tárgya egy regulációs funkcióval rendelkező nukleotid-anhidrid, a ppGpp első és egyben szerkezetigazoló szintézise volt [1]. A nukleotidkémia területén elért eredményeiből kiemelendő a nukleozid-foszfodiimidátok szintézise és jellemzése [2], majd ezek felhasználása α -amido-trifoszfátok szintézisére [3].

1976–77-ben egy évet töltött Angliában, Cambridge-ben, ahol G. G. Brownlee csoportjában kidolgozta az első nagy teljesítőképességű RNS-szekvenciameghatározási módszert. Ez a technika – hasonlóan a Maxam-Gilbert-féle DNS-szekvenciameghatározáshoz – a radioaktívan végjelölt molekula részlegesen degradált formáinak gél-elektroforetikus elválasztásán nyugszik, de a bázisspecifikus hasítást nem kémiai reagensekkel, hanem enzimekkel éri el [4, 5].

A nyolcvanas években a kémiai DNS-szintézis módszereit adaptálva és továbbfejlesztve [6] az SZBK-ban létrehozta az első magyarországi DNS-szintetizáló laboratóriumot. Munkatársaival, elsősorban Kálmán Miklóssal és Cserpán Imrével, kémiai szintézissel előállították a humán szérumalbumin génjét (1761 bázispár). Ez a teljesítmény (máig az SZBK egyik büszkesége) évekig világrekordnak számított a szintézissel előállított génhossz tekintetében. A siker nem kis részben egy módszertani újításuknak volt köszönhető: csak az egyik szálát szintetizálták kémiailag, a másikat egy szellemes technikával enzimatikusan másolták-klónozták hozzá [7].

1988-tól külföldön dolgozott, előbb a Stockholmi Egyetemen, majd 1993-tól haláláig a trieszti ICGBB intézetben. Itt a DNS-fehérje kölcsönhatások szerkezeti alapjaival kezdett foglalkozni. Megtervezte az első mesterséges „single-chain” represszormolekulát [8], melyben a kovalensen összekötött alegységek lehetővé tették a kötőfelület tetszés szerinti mutációját. Ezt az elvet később restriktív enzimek tervezésénél, és – már súlyos betegen – a DNS-kötő fehérjekomplexek specifikus felépülésének tanulmányozásában használta fel.

Kedves, szerény, önzetlen kolléga, jó barát volt. Tudományszeretete, emberi alakja, a betegséggel az utolsó hetekig dacoló munkakedve példa marad valamennyiünk számára, akik ismertük.

Irodalomjegyzék

- [1] Simoncsits, A., Tomasz, J. (1974) Chemical synthesis of ppGpp. *Biochim. Biophys. Acta*, **340**: 509–515.
- [2] Simoncsits, A., Tomasz, J. (1975) Nucleoside 5'-phosphordiimidates, synthesis and some properties. *Nucleic Acids Res.*, **2**: 1223–1233.
- [3] Simoncsits, A., Tomasz, J. (1976) New type of nucleoside 5'-triphosphate analog – p-1-(nucleoside 5'-) p-1-amino-triphosphates. *Tetrahedron Lett.*, **44**: 3995–3998.
- [4] Simoncsits, A., Brownlee, G. G., Brown, R. S., Rubin, J. R., Guilley, H. (1977) New rapid gel sequencing method for RNA. *Nature*, **269**: 833–836.
- [5] Székely, M. (1977) Triple overlapping genes. *Nature*, **269**: 754–755.
- [6] Simoncsits, A. (1991) Fully protected deoxyribonucleotides. Building blocks of chemical DNA synthesis by the phosphoric triester approach. In: *Nucleic Acid Chemistry: Improved and New Synthetic Procedures, Methods and Techniques*. Vol. 4 (Townsend, L. B., Tipson, R. S., Eds.) (Wiley & Sons, New York) pp. 363–369.
- [7] Kálmán, M., Cserpán, I., Bajszár, G., Dobi, A., Horváth, E., Pázmán, C., Simoncsits, A. (1990) Synthesis of a gene for human serum albumin and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6075–6081.
- [8] Percipalle, P., Simoncsits, A., Zakhariyev, S., Guarnaccia, C., Sanchez, R., Pongor, S. (1995) Rationally designed helix-turn-helix proteins and their conformational-changes upon DNA-binding. *EMBO J.*, **14**: 3200–3205.

Kiss Antal, Pongor Sándor, Venetianer Pál

47th International Conference on the Bioscience of Lipids



ICBL – ELIFE – ILPS
Joint Meeting

5–10 September, 2006
Pécs, Hungary



Lipidomics * Membrane microdomains: lipid rafts and caveolae * Lipids and Stress *
Gene regulation by nucleus-targeted lipid signaling systems * What are "healthy" lipids? *
Metabolism and function of lipids in the brain * Sphingolipids

Speakers:

Ben de Kruijff
Gerd Schmitz
Gerhard Schütz
Pablo Escriba
John Harwood
Folkert Kuipers
Bengt Vessby

Norman Salem
László Puskás
Gábor Tigyi
Markus Wenk
Michael Trauner
Akihiro Kusumi
John Zehmer
Ibolya Horváth

Niko Marx
Ingeborg Brouwer
Thomas Brenna
Tony Futterman
Howard Riezman
Edward A. Dennis
János Szöllősi
Gerrit van Meer

Michael Schlame
George M. Carman
Paul Grimaldi
Alexandra Richardson
Sylvie Chalon
Sen-ichiroh Hakomori
Yasuyuki Igarashi

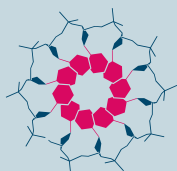
and others ...

Chairman: László Vígh

Web: <http://www.icbl2006.hu> E-mail: icbl@icbl2006.hu

Az immár 30. évfolyamába lépett **BIOKÉMIA** folyóirat olvasótábora a Magyar Biokémiai Egyesület tagsága, a biokémiai kutatás, az ipari és tudományos élet szereplői, valamint a gazdaság különböző területein dolgozó biokémikusok. Az újság eljut az ország valamennyi biokémiai intézetébe és kutatóhelyére, ahol a tudományterület különféle ágazataival, így agrár- és élelmiszer-biokémiával, analitikai, fehérje-, gyógyszer-, környezet-, membrán-, neuro- és pathobiokémiával, biotechnológiával és molekuláris biológiával, valamint proteomikával vagy genomikával foglalkoznak.

Témakörei és olvasótábora folytán kedvező csatornát biztosít a legkülönbözőbb termelő, illetve kereskedelmi szolgáltató cégek számára termékeik ismertetésére, hirdetésére, népszerűsítésére. A folyóiratba várjuk biokémiai cégek, a kutatás-fejlesztés területén érdekelt vállalkozások szakmai vagy közéleti hirdetéseit, régi és új megrendelőink hirdetési anyagait, melyhez a folyóiratban fekete-fehér és színes hirdetési felületet egyaránt biztosítunk.



MAGYAR
BIOKÉMIAI
EGYESÜLET

Dr. Székács András, főszerkesztő
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete
1525 Budapest, Pf. 102
Tel.: 391-8610 · Fax: 487-7555
E-mail: biokemia@nki.hu

PhusionTM

High-Fidelity DNA Polymerase

Csak ínyenc
Pfu-felhasználóknak!

Ez nem Pfu,
ez jobb!

Extreme
fidelity
and speed

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: info@kvalitex.hu

 **FINNZYMES**
PRODUCTS FOR PCR AND MOLECULAR BIOLOGY