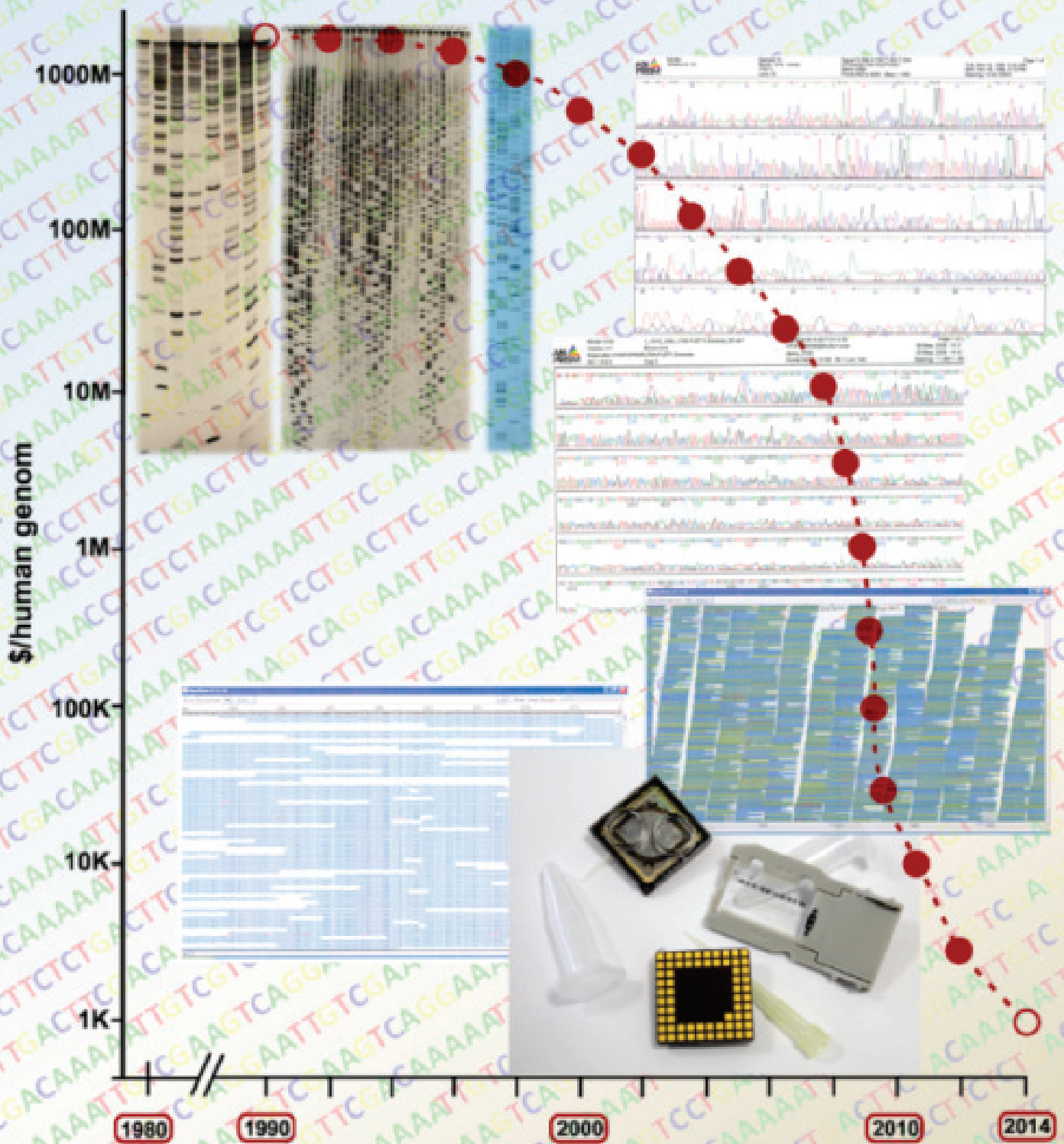


BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XXXVIII. évfolyam 1. szám

2014. március



BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Geiszt Miklós,
Kiricsi Mónika (titkár), Maksay Gábor, Nyitray László, Sarkadi Balázs,
Székács András, Szondy Zsuzsa

Főszerkesztő:

Szűcs Mária

szucs.maria@brc.mta.hu

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter

berdipeter@gmail.com

XXXVIII. ÉVFOLYAM 1. SZÁM

2014. március

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: Egy humán genomszekvenálás költségének változása 1990 és 2014 között (lásd Boros Imre írását 21. oldal)

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak 3.
Ifj. Gallyas Ferenc „Distinguished service award in cardiovascular science, medicine and surgery” díjat kapott 4.

REVIEW

Mones Letif, Fuxreiter Mónika: Fehérjeszerkezetektől a gyógyszertervezésig; gondolatok a 2013-as kémiai Nobel-díj kapcsán 8.
Boros Imre: Új DNS szekvenálási módszerek I. 20.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY

Szakács Dávid és Beinrohr László: A XII-es faktor újrafelfedezése gyulladáscsökkentőjeként: élettani szerepe és egy új kutatási projekt előzetes eredményei 32.

A 2013. ÉVBEN MEGJELENT KIEMELKEDŐ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA 44.

NAGY ELŐDEINK

Száz éve született Straub F. Brunó - Venetianer Pál, Patthy László és Mandl József írásai 51.
Elhunyt Bajusz Sándor - Medzihradzsky Kálmán 62.
Kucsman Árpád emléktábla avatás - Medzihradzskyné Schweiger Hedvig 65.

KONFERENCIA HÍREK

FEBS-EMBO jubileumi konferencia, Párizs, 2014 67.
Az MBKE 2014. évi vándorgyűlése, Debrecen 68.

FELHÍVÁSOK

Straub Örökség Alapítvány 69.
Bio-Science Kft. pályázat 70.

SZERKESZTŐI ROVAT

Új szerkesztőbizottsági tagok bemutatkozása 71.
Fórum újraindítása 72.

TUDOMÁNY ÉS MŰVÉSZET

Nyitrai Miklós: Mesés tájak, emberek – Afrika 73.

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület

4012 Debrecen, Pf. 6. | <http://www.mbkegy.hu>

Felelős kiadó: Dr. Fésűs László | Az engedély száma: III/SZI/397/1977

HU ISSN 2060 8152 (Online) | HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI 2013. DECEMBER 15. - 2014. MÁRCIUS 15. KÖZÖTT

Mandl József, kutatóorvos, az MTA rendes tagja, a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetének tanára **Széchenyi-díjat** kapott a májműködés- és gyógyszeranyagcsere-kutatások terén elért nemzetközi szintű tudományos eredményeiért, valamint iskolateremtő egyetemi oktatói és tudományos közéleti tevékenysége elismeréseként.

A Magyar Érdemrend középkereszt kitüntetésben részesült **Dux László**, az SZTE ÁOK Biokémiai Intézet tanszékvezető egyetemi tanára tudományos érdemei, professzori munkája, közéleti szerepvállalása, valamint a felsőoktatási törvény kidolgozásában kifejtett szakmai tevékenysége elismeréseként.

Akadémiai Ifjúsági Díjban részesült **Lázár Viktória**, az MTA SZBK Biokémiai Intézet tudományos munkatársa „A rezisztens baktériumok „Achilles-sarka”: az antibiotikum-hiperszenzitivitás térképe” és **Róna Gergely**, az MTA TTK Enzimológiai Intézet tudományos segédmunkatársa „A humán dUTPáz magi transzportjának szabályozása” című pályamunkájáért.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

IFJ. GALLYAS FERENC „DISTINGUISHED SERVICE AWARD IN CARDIOVASCULAR SCIENCE, MEDICINE AND SURGERY” DÍJAT KAPOTT



Hogy kerül a csizma az asztalra, kérdezhetjük jogosan a címre pillantva. Milyen alapon kapott díjat egy vegyész végzettségű biokémikus cardiovascular medicine-ért és különösen surgery-ért? A válasz roppant egyszerű. Némi internetes kutakodással könnyen kideríthető, hogy a fenti díjat általában el szokta nyerni az, aki az International Academy of Cardiovascular Sciences (Winnipeg, Canada) társaság égisze alá tartozó konferenciát szervez. Nekem a tavaly szeptember végén Pécssett megrendezésre került VII. International Symposium on Myocardial Cytoprotection konferencia kapcsán volt szerencsém ezt a presztízses díjat megkapni. Természetesen a kardiovaszkuláris kutatásokhoz a konferenciaszervezésen felül is van azért közöm; ebben a témában 11 zsűrizett közleményben voltam társ-, köztük háromban utolsó szerző.

A biológiai és orvosi problémák iránti vonzódásom családi eredetű. Édesapám, szintén ELTE vegyész végzettséggel, agyi hisztokémiai felfedezései következtében lett méltán nemzetközi hírű kutató. Nem véletlen tehát, hogy az ELTE vegyész szakon biokémiára specializálódtam, élettant hallgattam választható tantárgyként, és szakmai gyakorlatom helyszínéül az MTA SzBK Enzimológiai Intézetben Friedrich Péter laboratóriumát választottam. Nyilván nem az én tisztem Péter kutatói és emberi nagyságának méltatása, azt viszont nyugodtan állíthatom, hogy egyike voltam azoknak a szerencsés keveseknek, akik tőle tanulták meg a tudományos gondolkodás alapjait, a szakma szabályait. Diplomamunkámat a tanulás génexpressziós hatásainak kimutatására szolgáló módszer beállításából írtam, ebből későbbi folyamodványaként cikk is született.

Akkori fiatal kutatóként nyilván összehasonlíthatatlanul könnyebb helyzetben voltunk, mint édesapám generációja. El sem tudtuk volna képzelni, hogy kutatásainkhoz gyakorlatilag csak a hazai forrásból beszerezhető vegyszereket, eszközöket kell használnunk, a cikkeink ábráit magunk rajzoljuk csőtollal pauszpapírra, vagy, hogy csak szocialista országban kibocsátott tudományos folyóiratban közölhetünk. Az én generációm az első, amelyik a munkájához

már számítógépet használt (noha a diplomamunkámat még írógépen írtam). Viszont nem volt még internet, így nagyon sok időt kellett a könyvtárban eltölteni hivatkozások, cikkek kikeresésével és olvasással. Volt ennek egy igen nagy előnye; ha az ember a kezébe vett egy folyóiratot, hogy elolvassa az őt éppen akutan érdeklő cikket, óhatatlanul meglátott és elolvasott más érdekes cikkeket is, így elég széles látókörre lehetett szert tenni. Amiatt pedig, hogy a mai korról összehasonlítva ingerszegény környezetben élünk, nem igazán jelentett problémát, hogy napunk nagy részét a laboratóriumban töltöttük.

Az Enzimológiai Intézetben nem volt üresedés, így a Richter Gedeon Rt. (akkori Kőbányai Gyógyszeráru Gyár) Farmakológiai Kutató Intézetébe kerültem Kiss Béla laborjába, ahol a neurotranszmitter-felszabadulás szabályozó mechanizmusait tanulmányoztam. Az itt tanultaknak igen nagy hasznát vettem; az itt elsajátított metodikai ismereteim alapján választott ki Takeshi Tabira a National Institute of Neuroscience (Tokyo, Japan) intézetbe szóló két éves Science and Technology Agency ösztöndíjra. A kiválasztásomhoz vezető másik fontos faktor az volt, hogy a Tabira professzor által kutatott és csak a Távol-Keleten előforduló Baló-féle koncentrikus szklerózist Baló egyetlen eset, egy valahogyan a Távol-Keletre keveredő, ott megbetegedő, majd hazatérő I. világháborús hadifogoly alapján írta le, amiből Tabira professzor azt a következtetést vontta le, hogy minden magyar zseni. Zseninek ugyan nem bizonyultam, de az immortalizált idegsejtvonalak neurokémiai karakterizálásával eltöltött idő elég sikeres volt ahhoz, hogy több közös közleményünk szülessen, három évvel később visszamenjek újból másfél évre, és közben, meg utána is összesen öt magyar kerüljön Tabira professzor laborjába.

Közben két, a mai fiatalok számára szintén ismeretlen faktor arra készítetett, hogy Kiss Béla laborjában eltöltött három nagyon hasznos év után szülővárosomban folytassam pályámat. Az egyik a kötelező katonai szolgálat elodázhatatlanná válása, a másik a budapesti lakáshoz jutás kilátástalansága volt. Nagy szerencsémre, az akkori POTE Biokémiai Intézetébe kerültem Sümegi Balázs munkacsoportjába. Balázs akkor még adjunktus volt, és helyette keresett arra az időre, amíg ő Dallasba ment két éves tanulmányútra. Szinte azonnal én is kereshettem helyette, hogy első japán tanulmányutamra kimehessek, így eleinte nem találkoztunk. A japán utam előtt még megírtam egyetemi doktori disszertációm a Richterben és az Enzimológiai Intézetben végzett munkákból. Ezt, a visszatérésem után nem sokkal, a különböző feltételek teljesítése alapján átminősítették az akkor bevezetett Ph.D. fokozattá. Mivel akkorra már Balázs

szívvel, mitokondriummal és oxidatív stresszel foglalkozott, szakítanom kellett az idegtudományi vonallal. Japánban szerzett ismereteimet csak annyiban kamatoztathattam, hogy motorja voltam az intézet sejt kultúrák facilitása létrehozásának.

Csoportunk igen szerencsés időszakban kezdett el a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimmel foglalkozni. A 90-es évek előtt a PARP egyetlen érdekessége az volt, hogy a kaszpáz-3 mediálta hasadását apoptotikus markerként lehetett használni. Ehhez képest a PARP ma az egyik legperspektivikusabb gyógyszer-célpont. Feltételezett felhasználási területe a szív- és érrendszeri, agyi érrendszeri, neurodegeneratív, valamint inflammatorikus betegségeken át a tumor mono- és kombinációs terápiáig terjed. Nekünk számos tekintetben sikerült a PARP mediálta folyamatokra vonatkozó ismeretekhez jelentősen hozzájárulni, amivel bekerültünk a terület 5 vezető munkacsoportja közé. Elsőként írtuk le a PARP aktiváció és a citoprotektív foszfatidilinozitol-3 kináz/Akt útvonal kapcsolatát. Mostanra felderítettük a kapcsolat molekuláris hátterét is. Szintén elsőként azonosítottuk a PARP aktiváció mitogén aktivált protein kinázokra gyakorolt hatásának mechanizmusát. Emellett, a sejthalál mechanizmusainak kutatása kapcsán felfedeztünk egy új humán kis hősök fehérjét (HspB11), egy új galektint (galektin-13), egy pro-nekrotikus BH3 domén fehérjét (SOUL), karakterizáltuk a TIP47 fehérje sejthalálra gyakorolt hatását és számos, a mitokondriális permeabilitás tranzíciót befolyásoló vegyületet fejlesztettünk ki.

Közben, 2002-ben lehetőségem nyílt visszatérni az idegtudományhoz két évre egy a Wellcome Trust által finanszírozott, az MRC Centre for Synaptic Plasticity, University of Bristol, UK intézetbe szóló ösztöndíjjal. Itt együtt dolgoztam (és időnként együtt fociztam) a hosszú-távú potenciózás felfedezőjével, Graham Collingridge-dzsel. Az eltöltött idő nemcsak a kainát receptor sejt felszíni expresszióját szabályozó mechanizmust leíró cikkekben hasznosult, de lökést adott ahhoz, hogy az idegtudományi vonalat is bevegyük az intézet portfóliójába. Ennek során születtek a PARP-gátlók sclerosis multiplex-ben, illetve krónikus hipoperfúziós károsodásokban kifejtett pozitív hatását leíró cikkek. MTA doktori disszertációm 2008-ban, az intézeti profilnak megfelelően nagy populációt érintő nem fertőző megbetegedések pathomechanizmusainak vizsgálata témából írtam, azóta is a sejthalál folyamatainak tanulmányozásával foglalkozom.

Legfontosabb feladatomban azonban a megfelelő szintű utánpótlás nevelését tartom. Több mint 20 éve oktatok biokémiát, sokáig a tárgy felelőse is voltam. Az

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola törzstagja és programvezetője, az Egészségtudományi Doktori Iskola témavezetője vagyok. Eddig nyolc Ph.D. hallgatóm szerzett fokozatot, és jelenleg is háromnak vagyok témavezetője. A tudományos közéletben bírálói és szakértői tevékenységgel, konferenciák szervezésével, hat magyar és három nemzetközi társaság tagjaként, illetve a Biokémia és a PLoS One folyóiratok szerkesztőbizottsági tagjaként veszek részt. Aktívan sportolok; heti négyszer tollaslabdázok, heti rendszerességgel focizok, évi 5-10 napot síelek, nyáron két hétig szélből függően vitorlázok, windsurf-özök. Maradék szabadidőmben szépirodalmat olvasok, többnyire angol nyelven.

ifj. Gallyas Ferenc
egyetemi tanár
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet
ferenc.gallyas@aok.pte.hu
72-536-279

FEHÉRJESZERKEZETEKTŐL A GYÓGYSZERTERVEZÉSIG; GONDOLATOK A 2013-AS KÉMIAI NOBEL-DÍJ KAPCSÁN

Mones Letif¹, Fuxreiter Mónika²

¹University of Cambridge, Department of Engineering;

²MTA-DE Lendület Fehérjedinamikai Kutatócsoport,
Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

A szervezetben lejátszódó folyamatok molekuláris mechanizmusainak feltárása előfeltétele annak, hogy megérthessük a betegségek kialakulásának okait és hatékonyan beavatkozhatunk. A biokémiai reakciók atomi szintű leírásának első lépése a fehérjék háromdimenziós szerkezetének megismerése volt. Max Perutz és John Kendrew úttörő munkája nyomán – melyet 1962-ben Nobel-díjjal jutalmaztak – napjainkra csaknem 100 000 fehérje struktúráját határoztak meg. A globuláris, vízoldható fehérjék molekuláiban az aminosavak egymással szoros érintkezésben vannak. Már a hemoglobin szerkezetének elemzésekor kiderült, hogy molekuláris oxigén felvételéhez a fehérje oldalláncainak elmozdulására van szükség, hogy a hem csoporthoz az út szabaddá váljon. Ez a példa rámutat arra, hogy a fehérjék szerkezet-funkció összefüggésének vizsgálata a struktúra dinamikájának ismeretét is szükségessé teszi. A kísérleti módszereken túl komplex elméleti eljárások tették lehetővé, hogy ma már kémiai reakciók pontos mechanizmusát és energetikáját mind oldatfázisban, mind enzimátikus környezetben feltérképezzük. Martin Karplus, Michael Levitt és Arieh Warshel ezen módszerek kidolgozásában játszott meghatározó szerepért kapott 2013-ban kémiai Nobel-díjat. A hivatalos indoklás szerint az elismerés a komplex kémiai rendszerekre alkalmazható többszáljű módszerek kifejlesztéséért járt, melyből az alábbiakban a biokémiai vonatkozású eredményeket részletezzük.

A kezdetek

A kitüntetett három kutató a fehérjék strukturális szerveződésének és működési elveinek vizsgálatához 4 területen tett alapvető lépéseket.

Fizikai modell kifejlesztése. Az első fehérjeszerkezetek meghatározása kristályos állapotban történt, mely az egyes régiók flexibilitásáról kevés információt szolgáltatott. Fontossá vált egy fizikai modell kidolgozása, mellyel a fehérjék felépítése, stabil konformációi értelmezhetővé és kiszámíthatóvá váltak. Ez egy olyan energiafüggvényt, ún. erőteret igényelt, amely kapcsolatot teremtett a fehérje atomjainak térbeli elhelyezkedése és potenciális energiája között. Az első konzisztens erőteret Shneior Lifson és doktorandusza, Arieh Warshel dolgozta ki 1968-ban az izraeli Weizmann Intézetben [1]. Egy tipikus erőter általános alakját az 1. egyenlet mutatja:

$$U = \sum_b \frac{1}{2} k_b (r_b - r_b^0)^2 + \sum_a \frac{1}{2} k_a (\theta_a - \theta_a^0)^2 + \sum_d k_d [1 - \cos(n\varphi_d + \delta_d)] + \sum_{i \neq j} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i \neq j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (1)$$

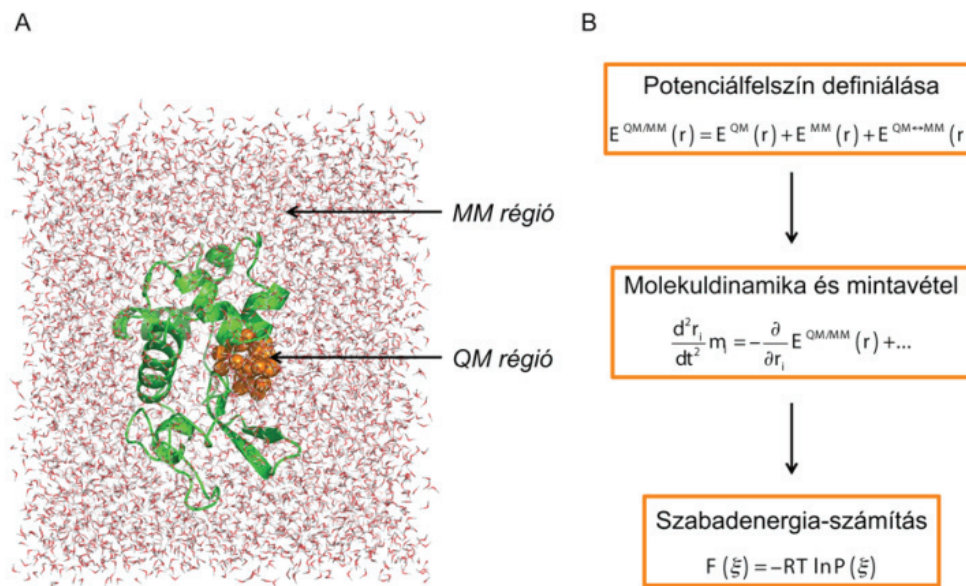
A makromolekula energiája a kovalensen kötött atomok kötés-nyújtására (1. tag), hajlítására (2. tag) és forgatására (3. tag) vonatkozó tagokból és a kovalensen nem kötött atomok van der Waals (4. tag) és elektrosztatikus (5. tag) kölcsönhatásainak energiájából áll. A molekulamechanikai (MM) erőterek paraméterei (pl. erőkonstansok és egyensúlyi paraméterek) függnnek az adott kölcsönhatást leíró tagban szereplő atomok minőségétől és a kémiai környezettől (atomtípusok). Konkrét értéküket részben *ab initio* kvantummechanikai számításokból, részben kísérleti adatokból nyerik. Az erőterek lényeges eleme a transzferálhatóság, tehát ugyanazon atomtípusra vonatkozó paraméterek különböző rendszerek között átvihetők.

Konformációk feltérképezése. A következő feladat az így nyert energiafelszínen meghatározni a molekula stabil geometriáját és felderíteni lehetséges átalakulásainak útvonalait. Ehhez az energiafelszín matematikai feltérképezése szükséges. Az első ún. energiaminimalizálást Michael Levitt végezte 1969-ben a Weizmann Intézetben, szintén Shneior Lifson irányításával [2]. Ezt a módszert használták fehérjék röntgendiffrakcióval meghatározott térszerkezetének finomítására, melyet először a lizozimra és a mioglobinra alkalmaztak. Ennek során az energiafelszínen a molekula adott konformációjához legközelebb eső stabil állapotot – lokális energiaminimumot – találták meg. Termodinamikai rendszer lévén azonban a metastabil állapotok vizsgálatához képest sokkal lényegesebb információhoz juthatunk az egyensúlyi sokaság feltérképezése által. Szimulációs szempontból ekkor a molekula egy adott hőmérsékletnek megfelelő hőmozgási energia segítségével az energiafelszínen „mozog” a Newtoni egyenleteknek megfelelően [3]. Ez az ún. molekuladinamika [4], mellyel ma már akár μ -os időskálán követhetők a fehérjék szerkezetváltozásai [5, 6].

A fehérjék feltekeredésének (folding) vizsgálata. A szerkezeti biológia egyik legizgalmasabb kérdése, hogy egy adott szekvenciájú fehérje milyen struktúrában válik működőképesé. Ez a konformációváltozásoknál jóval nagyobb skálájú átalakulás: a le- és feltekeredett (natív) állapotok közötti átmenet vizsgálatát igényli [7]. Ennek molekuladinamikai szimulációkkal történő atomi szintű vizsgálata még a mai számítógépek teljesítményével is nehézségekbe ütközik. Michael Levitt és Arieh Warshel 1975-ben tettek javaslatot egy ún. alacsony felbontású (coarse-grained) erőtér használatára, melyben a fehérje minden oldallánca külön egységet képez [8]. Ez az energiafelszínen nagyobb léptékű mozgásokat tett lehetővé, melyet a hasnyálmirigy eredetű tripszin inhibitor (BPTI) feltekeredésének leírásával igazoltak.

Enzimatis reakciók vizsgálata. A fehérjeszerkezetek vizsgálatánál használt ún. molekulamechanikai módszerek nem alkalmasak elektronszerkezeti változásokkal járó folyamatok tanulmányozására [9]. Ezen átrendeződések leírása kvantummechanikai (*ab initio*) módszereket igényel, melyek azonban még napjainkban is csak néhány száz atomra, pl. a fehérje aktív centrumára alkalmazhatóak. Az enzimekben lejátszódó reakciók energetikáját – és sokszor mechanizmusát is – lényegesen befolyásolja a fehérjekörnyezet. 1976-ban Arieh Warshel és Michel Levitt a reakciók leírására ún. hibrid módszer alkalmazását javasolta [10] (1. ábra). Ebben a vizsgálni kívánt rendszert két részre osztjuk:

a reakcióban résztvevő csoportokat kvantummechanikai (QM), a környezetüket molekulamechanikai (MM) modellel írjuk le és ezek kölcsönhatását is számítjuk. Ez a látszólag egyszerű felosztás megteremtette az enzimek reakcióinak modellezését, a racionális gyógyszertervezésnek és az *in silico* enzimtervezésnek a lehetőségét.



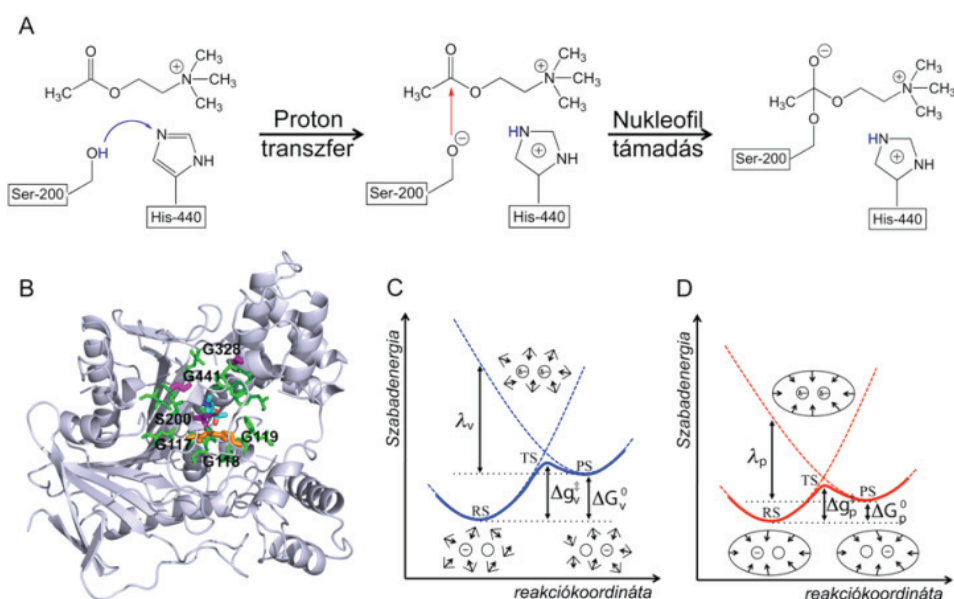
1. ábra. Enzimreakciók energetikájának *in silico* számítása. A) a QM/MM modell definiálása: az aktív centrum kvantummechanikai leírása (narancssárga) és a környezet (fehérje, oldószer) molekulamechanikai kezelése. B) a számítás menete: a modell alapján definiált potenciális energiefelszín számítása, majd irányított mintavételezés a potenciálfelszínen molekuladinamika segítségével, végül a reakcióprofil számítása.

Napjaink szimulációi

Arieh Warshel, Michael Levitt és Martin Karplus mintegy 40 éve tették le a felsorolt módszertani alapköveket, elindítva ezzel a biomolekulák számítógépes szimulációjának tudományát. Munkásságuk nyomán megismerhettük a fehérjék feltekeredésének alapelveit, betekintést nyerhettünk funkcionálisan fontos fehérje-mozgásokba [11] és részletes képet kaphattunk az enzimekben lejátszódó reakciók atomi történéseiről. Az alábbiakban ez utóbbi témához kapcsolódó eredményeket mutatunk be, melyek kiszámítása többszálú, hibrid módszereket igényelt (ezek kifejlesztését ismerték el Nobel-díjjal).

Enzimkatalízis értelmezése. Az enzimek hatékonyságának magyarázatára sokféle, egymásnak ellentmondó elmélet született [12, 13]. Ezek közül néhányat sorolunk fel: a reaktánsok térbeli közelségének köszönhető entrópiacsökkenés [14]; a reaktánsokra ható szterikus kényszer [15]; a reaktánsok reakcióra optimált konformációja [16]; dinamikus effektusok [17]; alagúteffektus [18]; általános sav-bázis katalízis, valamint a vákuumhoz hasonlatos enzimmagkörnyezet (deszolvatáció) [19]. Ezekkel szemben áll Linus Pauling 1948-ban tett javaslata, mely szerint az enzimek stabilizálják a reakció átmeneti állapotát [20]. Ezen modellek kvantitatív vizsgálatához szükség volt a pontos reakciómechanizmus meghatározására és olyan magas energiájú állapotok jellemzésére, melyet kísérleti módszerekkel nem lehetett megvalósítani. Arieh Warshel 1980-ban dolgozta ki

azt a kémiai gondolkodásunkkal összhangban lévő ún. Empirikus Vegyértékkötés Módszert (Empirical Valence Bond, EVB) [21], mely a 30 évvel ezelőtti számítógépkapacitás mellett is alkalmas volt enzimatikus reakciók követésére. A módszer a reakció releváns állapotaihoz (pl. reaktáns, intermedier, termék) rendel energiatáblázatokat, és a közöttük lévő átmeneteket szimulációval állítja elő. Az 1. ábrán bemutatott lépések alapján a számítás a reakció adott lépésének aktiválási energiáját eredményezi. Meghatározható továbbá az egyes oldalláncok hozzájárulása az aktiválási gát csökkenéséhez az azonos mechanizmusú vizes oldatban lejátszódó reakcióhoz képest. Ilyen szimulációk alkalmasak arra, hogy a felsorolt katalitikus effektusok (pl. szterikus kényszer) hatását számszerűsítsék. Egy ilyen hibrid módszerrel történő szimuláció eredményét mutatja a 2. ábra.



2. ábra. Az enzimatikus katalitikus hatás bemutatása az acetilkolin-észteráz példáján keresztül. A) reakciómechanizmus az acetilkolin-észteráz aktív centrumában. B) az acetilkolin-észteráz aktív centruma: hidrofób környezet (zöld), katalitikusan stabilizáló oldalláncok (magenta) és a 3 glicin oldallánc (narancssárga), amelyek a szubsztráttal alkotott hidrogénkötés révén különösen nagy katalitikus hozzájárulással bírnak. Végül a sebességhatározó reakciólépés szabadenergia-profiljainak sematikus ábrázolása a nemkatalizált vizes közegben (C) és enzimatikus környezetben (D). Az ábrákon feltüntettük a profilokat jellemző mennyiségeket (ΔG^\ddagger aktiválási gát, ΔG^0 a reakciólépés szabadenergia-változása és λ reorganizációs energia) és sematikusan a környezet dipólusmomentumainak átrendeződését a reakció végbemenetele során [23].

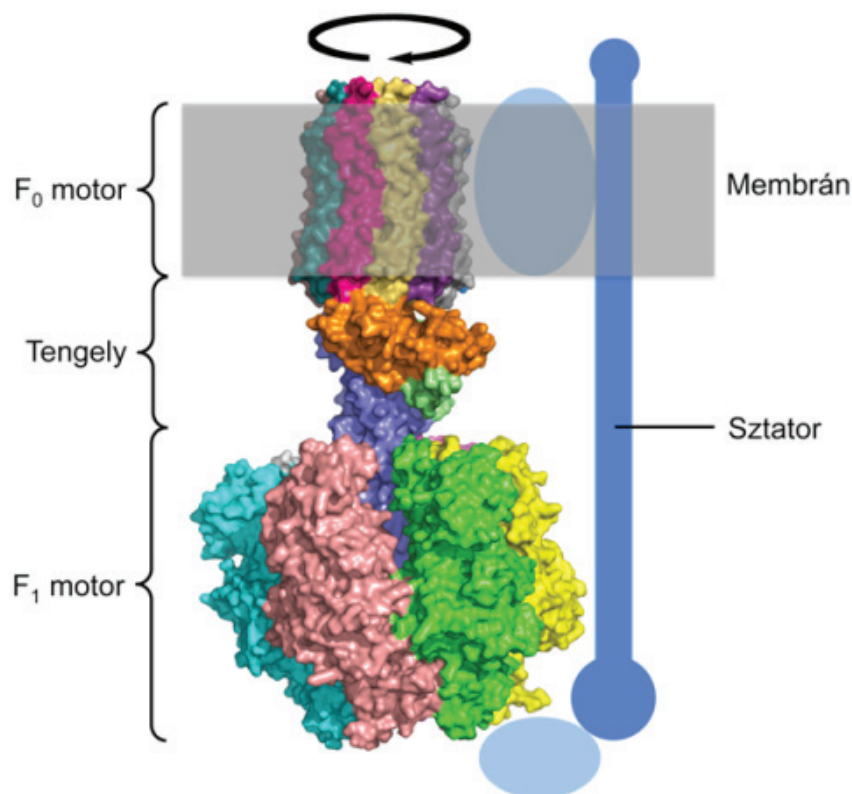
Az acetilkolin-észteráz (AChE) a neurotranszmitter acetilkolin molekulát hidrolizálja. Az enzim hatékonysága kiemelkedő ($k_{\text{cat}}/K_M = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), közelíti a diffúzió kontrollált limitet. Az enzim térszerkezetét a 90-es évek elején határozták meg [22]. A térszerkezet azonban a hatékonyság molekuláris okainak feltárása helyett újabb rejtélyeket vetett fel. Az aktív hely meglepő módon egy hosszú, 20 Å hosszú vájat végén helyezkedett el és döntően konzervált hidrofób oldalláncokból állt. Ez alapján született az a javaslat, hogy az AChE katalízisének eredményessége az apoláros környezetnek és a desolvatációnak köszönhető. Warshel és mtsai számítógépes szimulációkat alkalmaztak annak eldöntésére, hogy milyen hatásoknak köszönhető az enzim eredményessége

[23]. A teljes enzimet és annak szerkezeti változásait figyelembe vevő hibrid módszerrel számított reakciógát jó egyezést mutatott a kísérletekkel. Az egyes aminosavaknak a reakció átmeneti állapotának stabilizálásához történő hozzájárulását meghatározva kiderült, hogy a leginkább jelentős katalitikus hatás három, egymással szomszédos glicinnek tulajdonítható. Ez azt jelzi, hogy a főlánc-dipólusok is jelentős szereppel bírhatnak a reakciók meggyorsításában. Ennek értelmezésére a következő számítógépes kísérletet végezték el. Előállítottak egy hipotetikus, apoláros enzimet és ebben is meghatározták a reakció energiagátját. Ebben az esetben azonban az enzim aktiválási energiája 11,4 kcal/mól-lal magasabb volt, mint az oldalfázisban lejátszódó reakcióé. Ily módon rávilágítottak, hogy a deszolvatációs modell anti-katalízishez vezet.

Honnan ered akkor az enzimek katalitikus hatása? A destabilizációs elméletek érvényességét többskálájú módszerrel végzett (ún. QM/MM) szimulációkkal cáfolták [24]. Számos enzimreakció kvantitatív analízise rámutatott arra, hogy a fő katalitikus hatás az enzim dipólusainak irányított szerveződése oly módon, hogy a reakció átmeneti állapotát stabilizálják [25]. Ezt reorganizációs hatásnak hívják, ugyanis az enzimnek lényegesen kevesebb munkát kell befektetnie, hogy dipólusai elrendeződése a reakció során történő töltésátrendeződéseket kövesse, mint a vizes oldat dipólusainak (2. ábra). Az acetilkolin-észteráz esetén ezt az effektust a Marcus elmélet [26] alapján sikerült kiszámítani: az aktiválási gát 15 kcal/mól-os csökkentéséhez a reorganizációs effektus 10 kcal/mól-lal járul hozzá.

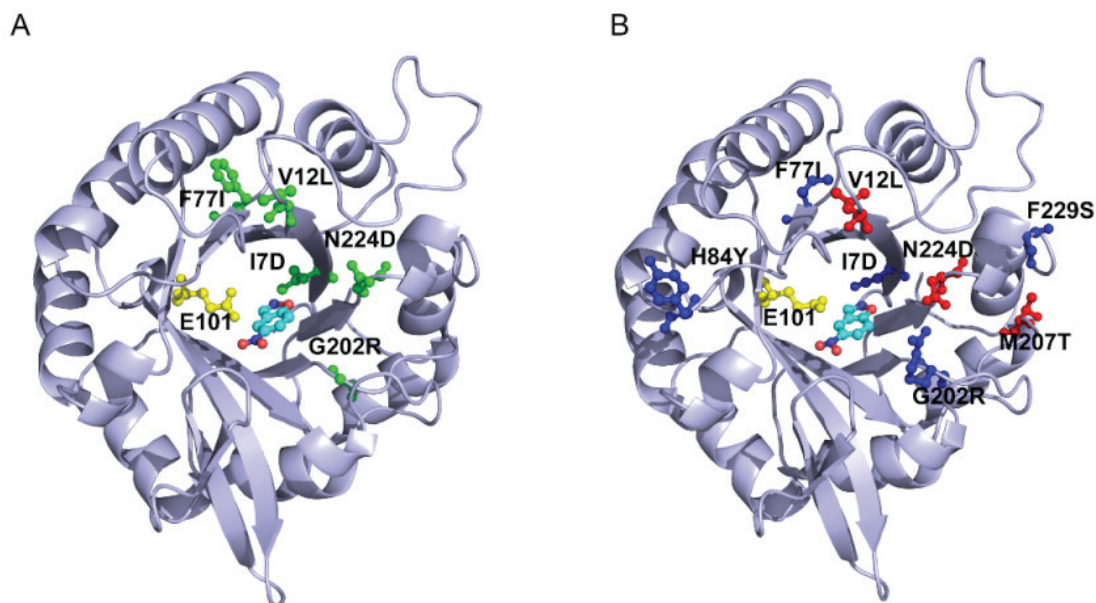
Az ehhez hasonló hibrid szimulációk ma már a számítógépek teljesítőkétségének növekedésével akár MDalton-os méretű molekulákban lejátszódó folyamatokra is használhatóak [27]. Az eljárások természetesen egyre finomodnak, lehetővé téve magasabb szintű kvantumkémiai módszerek alkalmazását is biomolekulákra [28]. A mintavételezés hatékonyságának növekedésével a hibrid módszerek a reakciómechanizmusok szimulációján túl egyre bonyolultabb problémákra kerülnek alkalmazásra. Ezek közül kiemelendő a kémiai energia mechanikai energiává alakítása pl. az ATP szintáz esetén [29, 30] (3. ábra), vagy a fehérje feltekeredéséhez kapcsolt reakciók hatékonyságának vizsgálata pl. a korizmát mutáz esetén [31]. A módszerek hatékonyságát mutatja, hogy az ATP szintáz esetében az ATP szintézis szabadenergia-profilját sikerült különböző konformációs állapotokban kiszámítani, és ezek alapján az F_1 -ATPázra egy szerkezet-funkció összefüggést felállítani [29, 30].

In silico enzimtervezés. A gyakorlati hasznosíthatóság szempontjából fontos a többskálájú módszerek használata enzimek tervezésére. Ez elsősorban nem *de novo* enzimek előállítását jelenti, hanem irányított mutációk bevitelét, melyekkel ezimek hatékonysága növelhető [32]. A QM/MM eljárások hibahatára lehetővé teszi, hogy mutációk hatását becsülni lehessen. Az aktiválási energia változásait ráadásul könnyebb meghatározni a vad típusú enzimhez viszonyítva mint vizes oldathoz képest. Ez lehetővé teszi egyedi mutációk széles skálán történő szűrését is [33]. Meg kell jegyezni azonban, hogy hatékonyabb néhány mutánson hibrid módszerrel nyert adatok alapján lineáris szabadenergia összefüggést felállítani és ennek alapján becsülni különböző mutánsok hatékonyságát [34].



3. ábra. Az ATP szintáz molekuláris szerkezete (PDB kód: 2 wpd). A nyíl a membránba ágyazott F_0 motor forgási irányát jelöli [29, 30].

A számítógépes molekulatervezésnek egy nagyon izgalmas, új vonulata az olyan enzimek tervezése, melyek a természetben nem létező folyamatokat katalizálnak. Ilyen mesterséges enzimeket használnak pl. gyógyszermolekulák környezetbarát módon történő előállítására vagy környezeti szennyezések (pl. permetezőanyagok, rovarirtószerek) lebontására [35]. Adott aktivitású enzimek létrehozása kétféleképpen lehetséges: vagy már létező enzimek másodlagos aktivitását kell felerősíteni, vagy teljesen új biomolekulát kell létrehozni. A hibrid modellek alkalmazása különösen az első esetben hasznos, mikor a másodlagos aktivitás kezdetben igen gyenge, kísérletileg nehezen követhető. *De novo* enzimtervezésnél a hibrid eljárásokat a kívánt reakció mechanizmusának kiszámítására és az átmeneti állapot geometriájának meghatározására használják [36]. Ilyen esetekben a QM/MM módszerek pontosabb eredményeket, hatékonyabb variánsokat eredményeznek, mint az *ab initio* (QM) módszerekkel meghatározott aktív hely modellek, melyek csak a reakciócentrum közvetlen környezetét veszik figyelembe. *De novo* enzimtervezésnél az enzim vázának létrehozása bioinformatikai eljárásokkal, kiválasztása alacsony felbontású erőterekkel számított kötési energiák alapján történik [37]. Mindkét esetben kísérletileg, ún. irányított laboratóriumi evolúciós kísérletekkel optimalják a választott modellt [38]. A jelenleg előállított mesterséges enzimek aktivitása azonban jóval (több nagyságrenddel) elmarad a természetben található enzimek hatékonyságától. A probléma megoldására szintén QM/MM módszereket alkalmaznak, hogy a mesterséges enzimekből hiányzó katalitikus tényezőket meghatározzák (4. ábra). [39, 40]



4. ábra. Oldalláncok hozzájárulása a katalitikus hatáshoz a Kemp elimináz tervezett és evolált KE07 variánsában. A) prediktált mutációk a reorganizációs energiához való hozzájárulás alapján (zöld), amelyek bekövetkeztek a KE07 evolált mutánsban. B) Az irányított evolúció során mutálódott oldalláncok katalitikus hozzájárulása a KE07 variánsban (stabilizáló – kék, destabilizáló – piros) [41]. A szubsztrátot (atomi színezés) és az általános bázisként szolgáló Glu101-t (citromsárga) mindkét esetben jelöltük.

Figyelemre méltó, hogy tervezett enzim-modellek laboratóriumi evolúciója során éppen az a reorganizációs energia optimalódik, mely elméleti számítások szerint (lásd fentebb) a legnagyobb katalitikus hatást adja [41].

Jövőbeli perspektívák

Annak ellenére, hogy a számítógépes eljárások elveinek kidolgozása nagyrészt befejeződött, számos megoldásra váró probléma maradt. A szimulációk kulcseleme az erőter (1. egyenlet), mely a molekula mozgásterét meghatározza. Az utóbbi években világossá vált, hogy számos fontos elem, pl. a polarizáció figyelembe vétele lényeges a szerkezetek reprodukálása és a megfelelő kölcsönhatási energiák számítása szempontjából. Megbízható, polarizálható erőterek kifejlesztése a jövő feladata. A számított szabadenergia jellegű mennyiségek (szubsztrát affinitások és aktiválási energiák) konvergenciája szempontjából kritikus a megfelelő mintavételezés. A hatékonyabb technikák kifejlesztése folyamatosan zajlik, részben irányított mintavételezéssel, részben parallel szimulációk közötti információ-kicserélődés alapján. Ezek nemcsak pontosabbá tehetik a kísérlettel összevethető mennyiségek meghatározását, de 1-2 nagyságrenddel rövidíthetik a számítási időt. Az egyre nagyobb rendszerek iránti érdeklődés (pl. molekuláris gépezetek, riboszóma) nyomán elterjedt az alacsony felbontású erőterek használata [42, 43]. A többskálájú eljárások itt is használatosak, ilyen esetekben a minden atomot figyelembe vevő (all-atom) modellt kombinálják az alacsony felbontású erőterrel. Ilyen eljárásokkal lehet modellezni pl. a DNS letekeredését a nukleoszómáról [44].

Meg kell jegyezni azonban, hogy néhány elvi probléma is megoldásra vár még. Ilyen a hibrid módszerekben (1. ábra) a különböző modellekkel leírt részek határfelületének kezelése [45]. A jelenleg használt módszerek általában nem teszik lehetővé a felosztás változtatását a szimuláció során akkor sem, ha azt az adott folyamat indokolná. Ilyen eset például, ha a reakció során vízmolekula vándorol az aktív centrumba. Hasonló probléma vetődik fel ioncsatornák működésének leírásakor is. Szintén elvi kérdés, hogy a vegyértékkötés módszer hogyan építhető be magas szintű *ab initio* számításokba. Ennek egy lehetséges megoldására néhány éve javaslatot tettünk [46].

A többszáljús módszerek legfontosabb problémája azonban az, hogy egyes reakciók energiagátjának számítása előre definiált reakciómodellre igényel. Azaz, ha különböző mechanizmusokat, koreográfiákat kívánunk összehasonlítani, külön számítást kell minden esetben végezni. Olyan módszerekre lenne szükség, melyeket ún. feketedoboz-szerűen használhatnánk, tehát előre történő feltételezés nélkül a reaktánsok a legkedvezőbb utat választanák. Ebben az irányban is történnek előrelépések [47], jelenleg a megfelelő reakciókoordináta definiálása és a mintavételezés jelent gondot.

Minden probléma és jövőben megoldandó feladat ellenére közel 40 év alatt lehetővé vált komplex kémiai és biokémiai folyamatok atomi szintű leírása, fehérjeszerkezetek jóslása és molekuláris mozgások jellemzése. A számítógépek teljesítőképességének növelésével egyre nagyobb rendszerek, egyre összetettebb, kapcsolt problémák vizsgálata vált lehetségessé. A jelen és a jövő feladata, hogy a számítások pontosságát és hatékonyságát növelje, hogy ezek a gyógyszerkutatásban gyakorlatilag is hasznosíthatóvá váljanak.

Személyes megjegyzések

Az egyik szerző (F.M.) posztdoktori munkáját részben Arieh Warshel laboratóriumában végezte, és azóta is több közös projektben vettek részt. A hibrid módszerek ötlete alapvetően Warshel és Levitt nevéhez kötődik, kidolgozását Arieh Warshel végezte. Úttörő munkáját sokáig a tudományos közösség meglehetősen értetlenséggel, sőt ellenérzéssel fogadta. Ehhez hozzájárult Warshel személyes konfliktusa posztdoktori témavezetőjével (Martin Karplus). Ez a szembenállás sokáig megosztotta az amerikai biofizikus közösséget is, nemcsak elvben, hanem metodikai értelemben is. A terület Nobel-díjjal történő elismerése remélhetőleg nemcsak a megbékélést hozza el, hanem egyesített erőfeszítésekkel elősegíti a fentebb vázolt problémák megoldását és gyakorlatban hasznosítható módszerek kidolgozását is.

Ez az áttekintés a biomolekulák számítógépes szimulációinak egy igen szűk szegmensére korlátozódott. Martin Karplus, Michael Levitt és Arieh Warshel által kidolgozott 4 alapvető elem (fizikai modell, konformációk feltérképezése, fehérje folding és reakciók vizsgálata) jelentős mértékben segítette a fehérjeszerkezetek meghatározását, elemzését, becslését és szerkezet-funkció összefüggések felállítását is. A módszerekről részletesebb leírás Dr. Fogarasi Géza cikkében található [48].

Irodalomjegyzék

- [1] Lifson, S., Warshel, A. (1968) Consistent Force Field for Calculations of Conformations, Vibrational Spectra and Enthalpies of cycloalkane and n-alkane molecules. *J Chem Phys*, **49**: 5116.
- [2] Levitt, M., Lifson, S. (1969) Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure. *J Mol Biol*, **46**: 269-79.
- [3] Elber, R., Karplus, M. (1987) Multiple conformational states of proteins: a molecular dynamics analysis of myoglobin. *Science*, **235**: 318-21.
- [4] Levitt, M., Sharon, R. (1988) Accurate simulation of protein dynamics in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 7557-61.
- [5] Karplus, M., Petsko, G. A. (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, **347**: 631-9.
- [6] Daggett, V., Levitt, M. (1992) A model of the molten globule state from molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 5142-6.
- [7] Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M., Karplus, M. (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci*, **25**: 331-9.
- [8] Levitt, M., Warshel, A. (1975) Computer simulation of protein folding. *Nature*, **253**: 694-8.
- [9] Warshel, A., Karplus, M. (1974) Calculation of pi-pi excited state conformations and vibronic structure of retinal and related molecules. *J Am Chem Soc*, **96**: 5677-89.
- [10] Warshel, A., Levitt, M. (1976) Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J Mol Biol*, **103**: 227-49.
- [11] Maragakis, P., Karplus, M. (2005) Large amplitude conformational change in proteins explored with a plastic network model: adenylate kinase. *J Mol Biol*, **352**: 807-22.
- [12] Wolfenden, R., Snider, M. J. (2001) The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, **34**: 938-45.
- [13] Garcia-Viloca, M., Gao, J., Karplus, M., Truhlar, D. G. (2004) How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, **303**: 186-95.
- [14] Page, M. I., Jencks, W. P. (1971) Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the chelate effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**: 1678-83.
- [15] Blake, C. C., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., Sarma, V. R. (1967) Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **167**: 378-88.
- [16] Hur, S., Bruice, T. C. (2003) The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 12015-20.
- [17] Cameron, C. E., Benkovic, S. J. (1997) Evidence for a functional role of the dynamics of glycine-121 of Escherichia coli dihydrofolate reductase obtained from kinetic analysis of a site-directed mutant. *Biochemistry*, **36**: 15792-800.

- [18] Cui, Q., Karplus, M. (2002) Quantum mechanics/molecular mechanics studies of triosephosphate isomerase-catalyzed reactions: effect of geometry and tunneling on proton-transfer rate constants. *J Am Chem Soc*, **124**: 3093-124.
- [19] Lee, J. K., Houk, K. N. (1997) A proficient enzyme revisited: the predicted mechanism for orotidine monophosphate decarboxylase. *Science*, **276**: 942-5.
- [20] Pauling, L. (1948) Chemical achievement and hope for the future. *American scientist*, **36**: 51-8.
- [21] Warshel, A., Weiss, R. M. (1980) An empirical valence bond approach for comparing reactions in solutions and in enzymes. *J Am Chem Soc*, **102**: 6218-6226.
- [22] Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **253**: 872-9.
- [23] Fuxreiter, M., Warshel, A. (1998) Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase. Computer simulation studies. *J Am Chem Soc*, **120**: 183-194.
- [24] Warshel, A. (1991) Computer modeling of chemical reactions in enzymes and solutions. (John Wiley & Sons, New York).
- [25] Warshel, A., Sharma, P. K., Kato, M., Xiang, Y., Liu, H., Olsson, M. H. (2006) Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chem Rev*, **106**: 3210-35.
- [26] Marcus, R. A. (1956) On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. *J Phys Chem*, **24**: 966.
- [27] Rychkova, A., Mukherjee, S., Bora, R. P., Warshel, A. (2013) Simulating the pulling of stalled elongated peptide from the ribosome by the translocon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 10195-200.
- [28] Hong, G., Rosta, E., Warshel, A. (2006) Using the constrained DFT approach in generating diabatic surfaces and off diagonal empirical valence bond terms for modeling reactions in condensed phases. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*, **110**: 19570-4.
- [29] Strajbl, M., Shurki, A., Warshel, A. (2003) Converting conformational changes to electrostatic energy in molecular motors: The energetics of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 14834-9.
- [30] Mukherjee, S., Warshel, A. (2011) Electrostatic origin of the mechanochemical rotary mechanism and the catalytic dwell of F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 20550-5.
- [31] Roca, M., Messer, B., Hilvert, D., Warshel, A. (2008) On the relationship between folding and chemical landscapes in enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 13877-82.
- [32] Warshel, A., Sussman, F. (1986) Toward computer-aided site-directed mutagenesis of enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**: 3806-10.
- [33] Roca, M., Vardi-Kilshtain, A., Warshel, A. (2009) Toward accurate screening in computer-aided enzyme design. *Biochemistry*, **48**: 3046-56.
- [34] Schweins, T., Geyer, M., Kalbitzer, H. R., Wittinghofer, A., Warshel, A. (1996) Linear free energy relationships in the intrinsic and GTPase activating protein-stimulated guanosine 5'-triphosphate hydrolysis of p21ras. *Biochemistry*, **35**: 14225-31.

- [35] Hilvert, D. (2013) Design of protein catalysts. *Ann Rev Biochem*, **82**: 447-70.
- [36] Kiss, G., Rothlisberger, D., Baker, D., Houk, K. N. (2010) Evaluation and ranking of enzyme designs. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **19**: 1760-73.
- [37] Baker, D. (2010) An exciting but challenging road ahead for computational enzyme design. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **19**: 1817-9.
- [38] Jackel, C., Kast, P., Hilvert, D. (2008) Protein design by directed evolution. *Ann Rev Biophysics*, **37**: 153-73.
- [39] Frushicheva, M. P., Cao, J., Chu, Z. T., Warshel, A. (2010) Exploring challenges in rational enzyme design by simulating the catalysis in artificial kemp eliminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 16869-74.
- [40] Frushicheva, M. P., Cao, J., Warshel, A. (2011) Challenges and advances in validating enzyme design proposals: the case of kemp eliminase catalysis. *Biochemistry*, **50**: 3849-58.
- [41] Labas, A., Szabo, E., Mones, L., Fuxreiter, M. (2013) Optimization of reorganization energy drives evolution of the designed Kemp eliminase KE07. *Biochim Biophys Acta*, **1834**: 908-17.
- [42] Tama, F., Valle, M., Frank, J., Brooks, C. L., 3rd (2003) Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 9319-23.
- [43] Schroder, G. F., Levitt, M., Brunger, A. T. (2010) Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data. *Nature*, **464**: 1218-22.
- [44] Voltz, K., Trylska, J., Tozzini, V., Kurkal-Siebert, V., Langowski, J., Smith, J. (2008) Coarse-grained force field for the nucleosome from self-consistent multiscaling. *J Comput Chem*, **29**: 1429-39.
- [45] Solt, I., Kulhanek, P., Simon, I., Winfield, S., Payne, M. C., Csanyi, G., Fuxreiter, M. (2009) Evaluating boundary dependent errors in QM/MM simulations. *J Phys Chem B*, **113**: 5728-35.
- [46] Mones, L., Kulhanek, P., Simon, I., Laio, A., Fuxreiter, M. (2009) The energy gap as a universal reaction coordinate for the simulation of chemical reactions. *J Phys Chem B*, **113**: 7867-73.
- [47] Laio, A., Parrinello, M. (2002) Escaping free-energy minima. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 12562-6.
- [48] Fogarasi, G. (2014) Kémiai kutatás számítógéppel? *Magyar Kémikusok Lapja*, **LXIX**: 38-41.



Mones Letif diplomáját az ELTE vegyész szakán szerezte 2007-ben. P.h.D. tanulmányait 2008 és 2011 között az ELTE Kémiai Doktori Iskola Elméleti és fizikai kémia, anyagszerkezet-kutatás program keretében végezte az Enzimológiai Intézettel közös szervezésben. Témavezetői Fuxreiter Mónika és Túri László voltak. 2011 óta dolgozik a Cambridge-i Egyetem (University of Cambridge) Mérnöki Tanszékén. Fő kutatási területe QM/MM és szabadenergia-számítási módszerek fejlesztése, valamint a mintavétel hatékonyságának növelése.



Fuxreiter Mónika az ELTE vegyész szakán diplomázott 1993-ban. 1996-ban Ph.D. fokozatot szerzett; dolgozatát fehérjék röntgenkristallográfiával történő szerkezet meghatározásából és enzimreakciók elméleti számításából készítette Náray-Szabó Gábor laboratóriumában. 1996-2000 között posztdoktori kutatásait az USA-ban végezte. Arieh Warshel csoportjában (USC, Los Angeles) az enzimkatalízis elméleti alapjait vizsgálta, majd a NYU Mount Sinai School of Medicine Biofizika tanszékén DNS-t javító enzimek mechanizmusát kutatta. 2000-2010 között az MTA Enzimológiai Kutatóintézetében dolgozott, Simon István csoportjában, ahol szimulációs módszerfejlesztés mellett elkezdett rendezetlen fehérjék felismerési mechanizmusaival foglalkozni. 2010-11 között az izraeli Weizmann Intézetben, azt követően a Cambridge-i Egyetemen és az MRC Laboratory of Molecular Biology-ban vendégkutató. 2012-től a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének docense. 2012-ben pályázatot nyert az MTA Lendület programjában. 2013-ban megszerezte az MTA doktori címet. Jelenleg az MTA-DE Fehérjedinamikai Kutatócsoportot vezeti a Debreceni Egyetemen, ahol a fehérjedinamika szerepét vizsgálja a sejt folyamataiban.

ÚJ DNS SZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK I.

Boros Imre

**SZTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék; SZBK Biokémiai Intézet
Szeged**

borosi@bio.u-szeged.hu

Gyakran elhangzó megállapítás, hogy valamely tudományterület vagy technológia forradalmi gyorsasággal fejlődik. Legtöbbször ez jóindulatú túlzás, a nukleinsav elsődleges szerkezetéről szóló ismeretek bővülésének jellemzésékor azonban bizonyosan nem az. DNS szekvenálási módszerek új nemzedékei jelennek meg és rendszeresek a szenzációs hírek új DNS vizsgálati módszerekről, valamint az alkalmazásukkal elért eredményekről. A technika terjedésének legutóbbi, média figyelmet (is) kapott hírei: A tömeges szekvenálás bevonul a napi klinikai gyakorlatba, miután az FDA első alkalommal engedélyt adott NGS (next generation sequencing) berendezés diagnosztikai célú alkalmazására (2013. november). Piacra kerül a DNS szekvenálásban „hangsebesség határt áttörő” készülék, amellyel a humán genomszekvencia meghatározás „demokratizálódik”, mert 1000 USD költségen megvalósítható (2014. január). Sikeres próbakísérleteket végeznek egyetlen molekula vizsgálatával szekvenciát leolvasó készülékkel, amelynek fejlesztői a másik álomhatárt, az 1000 USD készülék árat célozták meg (2014. február). Egy soha nem látott iramú technikai fejlődés lépései ezek, aminek eredményeként az egységnyi idő alatt nyerhető DNS szekvencia adat és az egységnyi adatmennyiség megszerzésének költsége öt nagyságrenddel változott néhány év során. Természetesen ellentétes irányba. A fejlődés, aminek üteme meghaladja a komputer számítási kapacitásának kétévenkénti duplázódását, a biokémia, elektronika, informatika, optika, nanotechnológia és számos más tudományterületek közös gyümölcse. Olyan gyors, hogy még elnevezésével is elmaradásban vagyunk. Egyszer a DNS szekvenálási módszerek következő generációjáról beszélünk, máskor már a DNS szekvenálási technikák második, harmadik, sőt negyedik nemzedékéről.

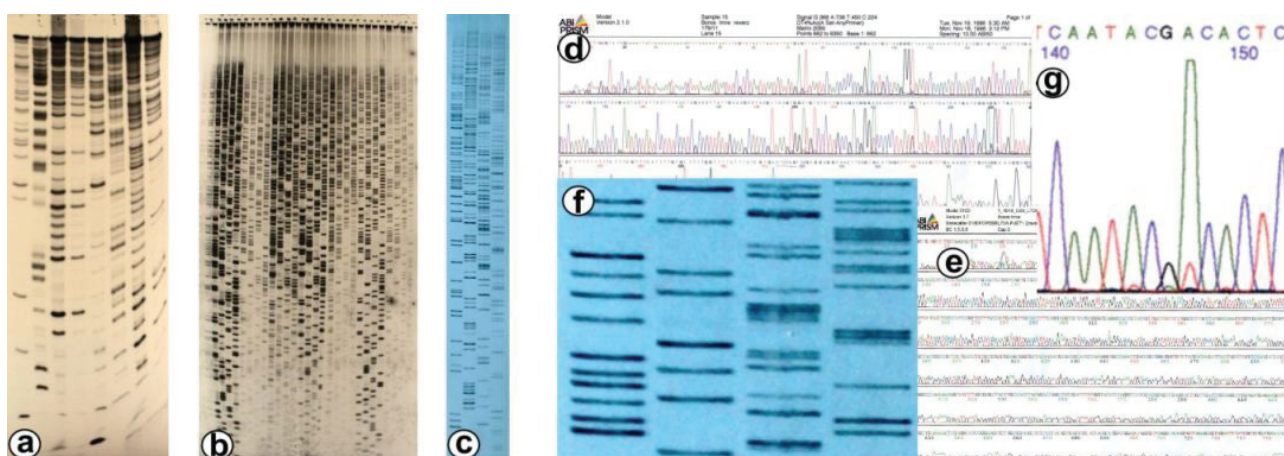
Az összefoglalóban áttekintem, hogy honnan indult és milyen irányba fejlődik a DNS szekvencia analízis. Személyes apropó az áttekintéshez, hogy a 70-es évek második felében közreműködtem, amikor az első hazai szekvenálási eredmények születtek, a 80-as évek végén az NIH-ban közlelő hallottam a vitát arról, hogy a humán genomra szánt 3 milliárd dollár jó befektetés-e vagy kidobott pénz, 2013 végén pedig örömmel asszisztálhattam NGS készülék beüzemelésénél a vezetésemmel dolgozó munkacsoportban.

1. ábra (lásd címlap). Egy humán genomszekvenálás költségének változása 1990 és 2014 között. A genomszekvenálás gondolata a nyolcvanas évek végén került komolyan szóba, akkor a várható költséget 3 milliárd dollárra becsülték. A költségek csökkenése már a genomprojekt alatt elkezdődött, az NGS technikák terjedésével pedig zuhanásszerűvé vált. Várakozás szerint 2014-ben valóban teljesül az 1000 USD/genom cél.

Nukleinsavak primer szerkezetének meghatározásáról az első közlemények az 1960-as években jelentek meg. Ma meglepőnek tűnhet, hogy először RNS szekvenálásban született több eredmény. Ezt könnyen megérthetjük, tudva, hogy az abban az időben rendelkezésre álló módszerekkel kis DNS darabokat nem lehetett reprodukálhatóan előállítani és elkülöníteni, ellentétben a „kezelhető” méretű kisebb RNS molekulaféleségekkel. Az első teljes DNS genom, aminek nukleotidsorrendjét meghatározták, a θ X174 bakteriofágé volt. Az 5375bp szekvenciát Sanger és munkatársai közölték 1977-ben. Ez jelentős győzelem volt a DNS nukleotidsorrend-meghatározás akkor használt két módszerének versenyében. A Maxam és Gilbert által kidolgozott technikával kémiai reagenseket használva hoztak létre bázisspecifikus lánctöréseket radioaktív izotóppal jelzett DNS fragmentumban. A módszer fejlesztésével számos reakciótypust használtak. Közös jellemzőjük volt, hogy a bázismódosítást báziseltávolítás, majd lánchasítás követte, és hogy a reakciót korlátozni kellett fragmentumonként egy vagy csak néhány lánctörés elérésére. A leggyakrabban használt reagensek és reakciók a következők voltak: dimetilszulfát (purinok metilálása), hidrazin (pirimidin nukleotidok bontása), piperidin (cukor-foszfát lánchasítása). A négy (rendszerint G, A+C, T+C, C) elkülönített reakció termékeit 6M ureát tartalmazó akrilamid gélen választották el. A szekvenciát a gélről készült autoradiográfiáról lehetett leolvasni a fragmentumok elmozdulása alapján. A szekvenáláshoz viszonylag nagy mennyiségű (mikrogrammnyi) tisztított, csak egyik végen radioaktív jelet hordozó fragmentumok mintáin kellett reakciókat végezni. Ezekben esetenként radioaktív mintákat kellett forró vízfürdőben tartani, bepárolni, géleket beszárítani. Röviden: ma riasztónak hangzó manipulációk sorozatát kellett végezni. Egy-egy többnapos kísérlet eredménye néhányszor tíz, maximum pár száz nukleotidnyi leolvasható szekvencia volt.

A Sanger-féle módszer első változatát az előbbtől kissé korábban közölték. Ebben egyes-szálú DNS templáton végeztek korlátozott láncterminációt DNS polimeráz enzimmel. A szintézis négy mintában folyt. A négy reakcióban más-más DNS-alkotó nukleotid előfordulásakor történhetett lánctermináció. A módszer első változatában egy-egy dezoxinukleozid-trifoszfát limitált koncentrációban történő használatával értek el láncterminációt. Hamarosan tökéletesítették a módszert és az egyes mintákba kevert 2',3'-di-dezoxinukleozid-trifoszfát prekursorokkal

(ddTTP, ddCTP, ddATP, ddGTP) okoztak láncterminációt. Amikor egy ilyen nukleotid épül be - a normál dezoxinukleozid-trifoszfátokhoz viszonyított előfordulási aránya által meghatározott gyakorisággal, a polinukleotidláncban véletlenszerűen helyettesíti a megfelelő nukleotidípust -, 3'OH hiányában a szintézis nem folytatható. Az előzőhöz hasonlóan ebben a módszerben is a reakciókat a képződött fragmentumok méret szerinti elválasztása követte gélelektroforézissel, majd a gélről autográfia készítése és a filmről a szekvencia leolvasása alulról felfelé haladva.



2. ábra. A DNS szekvenálási módszerek első nemzedékét jellemző képek.

a, b, c) Autoradiogramok a hőskorból (1979-1993).

a) Maxam-Gilbert módszerrel készült szekvenálás. C, A+C, T+C és G specifikus reakciókból származó ^{32}P -jelölt fragmentumok 6M urea-20% akrilamid gélen elválasztva. A kémiai reakciók és a vastag gélek feloldóképességének korlátai miatt néhányszor tíz nukleotid szekvencia olvasható. (Csordás-Tóth Éva kísérlete).

b) Sanger-féle szekvenálás elektroforézisének autoradiogramja 1990-ből. A fragmentumok jelölése ebben az esetben is ^{32}P volt, a vékonyabb gél jobb felbontást eredményezett, de a béta bomlás nagy energiája miatt vastagok a csíkok, ami korlátozza a hosszú leolvasást.

c) A kisebb energiával bomló ^{35}S jelzés és ultravékony (0,2 mm), hűtött gélek használatával a gélelektroforézist használó láncterminációs módszer elérte teljesítése határát (1993).

d, e) Az első nemzedék felnőtt korát jelentették a gélelektroforézist, majd kapilláris elektroforézist használó szekvenáló automaták (1996 és 2004-ben ABI PRISM készülékkel készített szekvenálások). A négy eltérően fluoreszkáló láncterminátort használó készülékek szolgáltatták a referencia szekvenciák többsége is.

e, f) Az első nemzedékre jellemző gél- és kapilláris-elektroforézis csak korlátozottan teszi lehetővé a ritka szekvencia variánsok felismerését.

A két szekvenálási módszert csak rövid ideig használták egymás mellett. A Sanger-féle technika fejleszhető volt és hamarosan egyeduralmukodóvá vált. Egyszerűbb a hozzá használható templát készítése, sőt ssDNS fág-vektorokat használva klónozáshoz közvetlenül izolálható a templát. Az oligonukleotid-szintézis fejlődése könnyen megvalósíthatóvá tette primerek szintetikus előállítását. Az enzimmel végzett reakció pedig kevesebb manipulációt követelt és megbízhatóbban működött, mint a bázis-specifikus kémiai lánctörések. A Sanger

módszer további fejlesztésének legfontosabb lépései voltak, hogy a nukleotidok megkülönböztetésére radioaktív jelzés helyett, amire előbb ^{32}P , később ^{35}S jelzést alkalmaztak, fluoreszkáló csoporttal jelzett prekursorokat kezdtek használni. A fluoreszkáló jelet előbb a primerre, majd a termináló nukleotidokra helyezték. Az áteresztőképesség növelésére a reakciókat és a poliakrilamid gélelektroforézist automatával végeztették, majd a gélelektroforézist kapilláris elektroforézissel váltották fel. A Sanger-féle szekvenálási módszer előnye az is, hogy alkalmas vektorba építve a szekvenálandó fragmentumokat ugyanolyan (univerzális) primerek használhatók tetszőleges DNS darabok nukleotidsorrendjének a meghatározásához. Ilyen esetekben az inszerciót határoló részek szolgálnak primer kapcsolódási helynek. A módszer utolsó változatában a négy láncterminációs szintézist egy reakcióban végzik hőstabil polimerázzal, spektrálisan megkülönböztethetően fluoreszkáló di-dezoxinukleozid-trifoszfátokat használva. A nukleotid-specifikusan terminálódott termékeket kapilláris-elektroforézissel választják el és lézerrel gerjesztve azonosítják őket. Ezzel a DNS szekvenálás technikája elérte azt a színvonalat, amivel 1997-2002 között sikerült meghatározni a legfontosabb modellorganizmusok (élesztő 1997, fonalféreg 1998, muslica 2000, lúdfű 2000, egér 2002) és a humán genom (2001) nukleotidsorrendjét. Az automatákban végzett Sanger-féle láncterminációs szekvenálások során 600-800 nukleotidos leolvasások végezhetők kis hibaszázalékkal. Erre a technikára, mint **első generációs szekvenálási módszer** hivatkoznak. Az ezt követő „**next-generation sequencing**” (NGS) technikák 2005-től kezdtek elterjedni. A módszerek egy részében a Sanger-féle technika tovább él, de vannak alapvetően új megközelítést alkalmazók is, amelyek képesek egyedi molekulák alapján nukleotidsorrendet meghatározni. E technikák – amelyeket egyes összefoglalók a szekvencia-meghatározási módszerek harmadik és negyedik nemzedékének említenek – rövid ismertetése előtt emlékezzünk meg Sanger munkásságáról és tekintsünk vissza a DNS szekvenálás hazai kezdetére is.

Frederick Sanger kétségtelenül a legjelentősebb hozzájárulást tette mind fehérjék, mind nukleinsavak tekintetében az elsődleges szerkezet meghatározására alkalmas módszerek kifejlesztésében. Sanger 2013 novemberében halt meg, 92 éves korában. Két alkalommal kapott Nobel-díjat, az egyiket a fehérje szekvenálási módszer (1958, inzulin szekvencia), a másikat a láncterminációs DNS szekvenálási módszer kifejlesztésért (1980).

Magyarországon *in vitro* DNS rekombinációs kísérleteket először az SZBK Biokémiai Intézetben, a Venetianer Pál vezetésével működő Nukleinsav

Csoportban végeztek a 70-es évek közepén. Ez volt világszerte is a technika születésének időszaka. Restriktív endonukleáz alkalmazás, rekombináns DNS előállítás és DNS nukleotidsorrend meghatározás is ekkor történt először hazánkban az SZBK 4. emeleti laboratóriumaiban. DNS szekvenálást Csordás-Tóth Éva végzett a Maxam-Gilbert módszerrel. Klónozott riboszomális RNS gén promoter és lambda fág kromoszómába épülési hely nukleotidsorrendjét határozta meg. Az eredmények két Nucleic Acids Research közleményben jelentek meg 1979 őszén. Jellemző, hogy akkor természetes volt egy-egy szekvenciárészlet meghatározásához készült autoradiogram képét a közlemény ábrájaként bemutatni.

A nukleinsav-szekvenálás legnagyobb publicitást kapott teljesítménye a humán genomszekvencia meghatározása volt, amit 2001-ben nyilvánítottak elkészültnek. Ekkorra ugyanis még csak az ún. *draft* szekvencia volt kész, ami számos lyukat tartalmazott. A *finished grade* szekvenciák minőségi jellemzői (lefedettség, hiba előfordulás) lényegesen jobbak. A humán genom szekvenálása közel három milliárd nukleotid sorrendjének a meghatározását jelentette. A projekt indításakor ekkora összegre becsülték (dollárban) a várható költségeket is. Az egész vállalkozás története érdekes és színes, de ennek az áttekintésnek nem témája¹. A jelen írás szempontjából legfontosabb, hogy eredményeként született meg az ún. humán genom referencia szekvencia.

A humán genomszekvencia teljes egészében első generációs szekvenálási technikával, négy szín fluoreszcens Sanger-féle láncterminációs módszerrel készült (a módszert nevezik ciklikus vagy reverzibilis láncterminációs módszernek is). Meghatározásában ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Inc.) készülékek és továbbfejlesztett típusaik játszottak főszerepet. Egyidejűleg már lázas sebességgel folyt újabb szekvenáló módszerek fejlesztése és nem sokkal a humán genom szekvencia elkészülése után megjelentek és terjedni kezdtek az NGS módszerek. Az új módszereket több szempont szerint csoportosíthatjuk, bár nehéz osztályokba sorolni őket. A rendkívül gyors technikai fejlődés gyorsan devalválja a teljesítmény, sebesség, költség összevetéseket. A továbbiakban az NGS módszerek közös jellemzőit és a szekvenálás új nemzedékének legfontosabbnak vélt sajátosságait tekintem át. NGS megvalósítására alkalmas eszközökről és a módszerek specifikusabb jellemzőiről egy következő részben fogok rövid áttekintést adni.

¹ A témáról bővebben olvasható Venetianer Pál Az emberi genom című írásában, *Biokémia* XXXVII/3.2013. szeptember, 22-28. oldal (a szerkesztőbizottság megjegyzése).

Érdeemes tisztázni, hogyan definiálhatunk szekvenálókészülék és módszer nemzedéket. Erről nincs egységes vélemény a szakirodalomban.

A klasszikus Sanger-féle módszert követő szekvenálási technikák egyik legjelentősebb újdonsága, hogy fragmentumok halmazait tudják egyidejűleg kezelni. Sanger-féle szekvenáláshoz a DNS fragmentumokat klónozással vagy PCR-t alkalmazva felszaporítják. Az eljárás során, ha nem is tudják, hogy melyik DNS darab honnan származik, és minek felel meg, a manipuláció valamelyik lépésében mégis minden egyes DNS fragmentum fizikailag is elkülönített, ha kell, akár kézbe is vehető. Ehhez képest az NGS módszerek fragmentumok halmazán végeznek amplifikációt (ha szükség van a fragmentumok megsokszorozására) olyan elrendezésben, hogy egy-egy fragmentum minden másolata ugyanabban a térrészben (emulzió cseppben, szilárd felületen rögzítve), más fragmentumoktól elkülönítve helyezkedik el. Tekinthejtük ezt, a fragmentumokat egy halmazként kezelő, de a fragmentumokat felszaporítva vizsgáló technikát **második generációs** szekvenálási módszernek. Ilyet használ a kereskedelmi forgalomban beszerezhető készülékek többsége (Roche, SOLiD, Illumina, Ion Torrent). Ezekhez képest jelentős előrelépés az, amikor a szekvenciameghatározás nem felszaporított fragmentumokon, hanem egyedi DNS molekulák analízisével történik. Ez kiküszöböli az amplifikáció során fellépő hibákat. Már vannak olyan készülékek, amelyekkel egy molekula vizsgálata alapján lehet nukleotidsorrendet meghatározni (Pacific Biosciences PacBio, Oxford Nanopore MinION). Ezeket tekinthejtük a következő, **harmadik generációt** jelentő szekvenáló berendezéseknek. A negyedik generációt talán azok az eljárások képviselhetik, amelyek egyetlen molekula többszörös letapogatására lesznek képesek.

Az NGS módszerek mindegyikére jellemző, hogy az alkalmazás bonyolult, specifikus és költséges eszközt és értékelő software-t igényel. A nagy teljesítőképesség, a költséges készülék és a komoly kihívást jelentő értékelő informatika hármasa miatt ezért NGS készülékek a legtöbb esetben szakosodott vagy intézeti szolgáltató laboratóriumokban (core facility) működnek. A kisebb laboratóriumok számára is elérhető változatokként az utóbbi években kerültek piacra három cég készülékeinek bench-top változatai (Roche GS Junior, Life Technologies PGM és Illumina MiSeq). Ezek 100 ezer euró körüli vagy az alatti áron beszerezhetők, ennek megfelelően egyedi laboratóriumokban is terjednek. Az Illumina MiSeq egy variánsa 2013 novemberében FDA engedélyt kapott klinikai alkalmazásra az USA-ban, így várhatóan nőni fog alkalmazása klinikai környezetben is.

Bár a különböző NGS módszerek lényegesen eltérnek, többé-kevésbé közös jellemzőjük a három következő munkafázis: (1) minta előkészítés (templát készítés), (2) szekvencia olvasás és rögzítés, (3) adatanalízis. A minták lehetnek amplifikációval előállított molekulahalmazok vagy egyedi DNS molekulák. Templát készítéséhez a mintából olyan fragmentum halmazt (könyvtár, library) hoznak létre, amelyik lehetővé teszi a fragmentumok elkülönített megsokszorozását, az egy-egy mintából származó fragmentumok későbbi azonosítását és segít a leolvasott nukleotidsorrendek összerendezésében. Ehhez adaptor és azonosító (barcode) részekből álló oligonukleotidokat kapcsolnak a fragmentumokhoz. Attól függően, hogy az oligonukleotidokat milyen hosszú DNS-darabokhoz, milyen trükköket használva ligálják, létrehozhatók specifikus könyvtárak, amelyek egymáshoz közelebbi vagy távolabbi helyzetű részek szekvenálását teszik lehetővé. Az ún. „mate-pair” technikával hosszabb fragmentumok végeiről nyerhető szekvencia adat, mert a könyvtár készítésekor előbb egy oligonukleotiddal körre zárják a fragmentumokat, majd feldarabolva őket, az oligonukleotidon át összekapcsolódott részekon végeznek szekvenálást. Ezzel az eredetileg egymástól távolabb fekvő részekről nyerhető szekvencia információ, ami segít a nehezen szekvenálható, ismétlődő részek áthidalásában. A hibridizációt és ligálást használó szekvenálási módszerekben is adaptor kapcsolási trükkökkel érik el azt, hogy egy-egy fragmentum több pontján is olvashatók legyenek rövid szekvencia részek.

Az adaptorok segítik a minta molekuláinak elkülönítését, mert velük kapcsolhatók a fragmentumok egyenként szilárd felülethez. Ezt az adaptorok és a szilárd felülethez rögzített komplementer oligonukleotidok közötti hibridizáció biztosítja. A fragmentumok sokszorozása PCR amplifikációval történik emulzióban vagy szilárd fázison rögzített templáton, és egy molekula több ezer-százezer másolatát eredményezi az emulzió egyetlen cseppjében, vagy a szilárd fázis közeli pontjain rögzítve. A szekvenálás alapulhat templát alapján végzett szintézisen, templát felszínen összeilleszkedő oligonukleotidok összekapcsolásán ligázzal és valami más elven, ami rendszerint a nukleotid bázisok eltérő méretét használja ki azonosításukra. A szintézist használó szekvenáló reakciók ciklikusan megfordíthatók láncterminációval (CRT), nukleotidok egyenként történő beépítésével (SNA), vagy folyamatos nukleotid beépítéseket valós időben követve történnek. Az adatrögzítés pedig leggyakrabban lumineszcencia jel, négy színű fluoreszcencia jel, protonkoncentráció vagy ionáram-változás mérése. Az egyes munkafázisok jellemzőire itt nem térek ki, mert azok eszköz-specifikusak.

A szekvenálás eredményével és minőségével kapcsolatos néhány fogalmat érdemes azonban áttekinteni. NGS módszerekkel a szerkezetre vonatkozó, minőségi jellegű adaton kívül, amit a nukleotidsorrend jelent, mennyiségi adatokat is nyerünk egy-egy nukleotidsorrend előfordulási gyakoriságáról a vizsgált mintában. A hagyományos technikával ez nem teljesül, mert az alacsony arányban jelenlevő szekvenciavariánsok nem észlelhetők gél- és kapilláris-elektroforézissel. Az NGS technikákban a könyvtár fragmentumai külön-külön szolgáltatnak szekvencia-adatot, ezért megszámlálhatók. Ha vannak ritka variánsok a mintában, akkor azok is kimutathatók, feltéve, hogy elég nagy volt a megszámlált fragmentumok száma, amit a szekvenálás mélysége („depth”) fejez ki. Természetesen feltétele a helyes eredménynek az is, hogy a könyvtár készítése során a fragmentumok eloszlási arányában ne történjen változás. Annak kifejezésére, hogy egy-egy ponton átlagosan hány leolvasás történt, a lefedettségi mutatót (coverage) is használják. Ez más esetekben azt jelzi, hogy a genom hány százalékáról nyertünk szekvencia adatot. A *coverage* tehát az előző értelemben a lefedés mélysége (vastagsága), a másodikban kiterjedése.

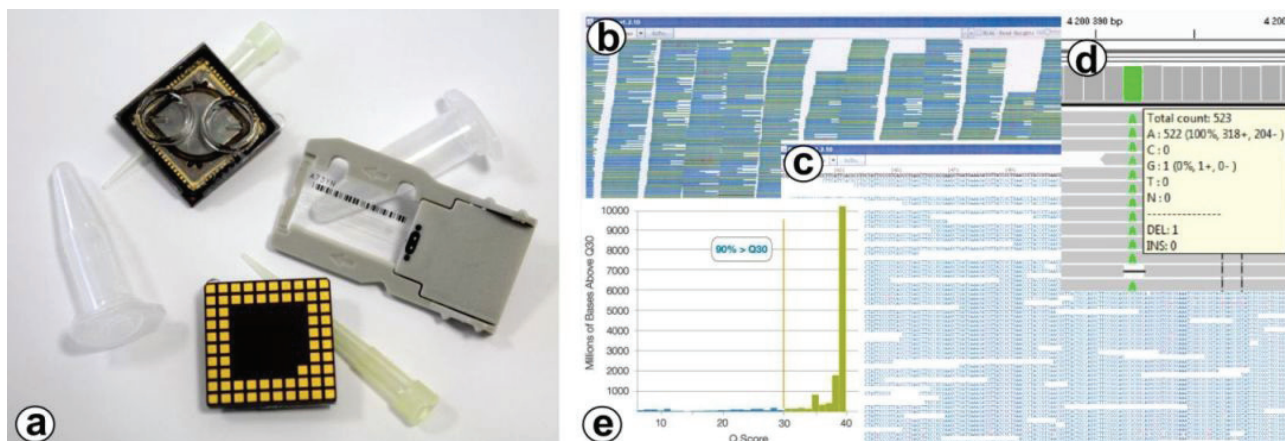
Amint egyes fragmentumainak mennyiségét kifejező információ alapkövetelmény transzkriptom analízisek és ChIP-seq alkalmazások során. Ezekben valójában ez az elsődlegesen keresett adat, a nukleotidsorrend a fragmentum azonosításához kell. Igény van mennyiségi adatokra más alkalmazások során is, pl. amikor szomatikus mutációk előfordulási gyakoriságát kell kideríteni. Ez gyakori kérdés a tumorok nagymértékű heterogenitása és változékonysága miatt, mert a mutációk előfordulásáról szóló információ fontos lehet célzott kezelési eljárások tervezéséhez. Szintén fontos a mennyiségi jellegű adat a metagenomikai alkalmazásokban, amikor egy adott mikroorganizmus-populáció összetevőinek mennyiségére a mintában jelenlevő szekvenciák arányai alapján következtetnek.

A kis arányban meglévő szekvencia-heterogenitás kimutathatósága a leolvasások számán kívül a meghatározási eljárás megbízhatóságának is függvénye. A megbízhatóság számszerűsítésére a Q érték szolgál. A Sanger-féle módszer hagyományos alkalmazásakor a szekvenáló reakciók és az adatrögzítés egymástól időben elválasztottak. Az egy szekvenálási reakcióból nyerhető információ mennyiség a gél felbontóképessége által meghatározott leolvasási hosszúság. A NGS eljárások többségében a szekvenálási reakció és az adatrögzítés ciklikusan ismétlődve történik. Ezért a jel és zaj arányának függvénye az, hogy az egymást követő reakciók hányszoros ismétlődés után eredményeznek még értékelhető adatot. Az ismétlések számának növelésével a jel-zaj arány

fokozatosan romlik. A NGS berendezések az érzékelt jelek nukleotidsorrendre fordításakor minden nukleotidra megbecsülik a leolvasás megbízhatóságát. A jel megfeleltetése nukleotidnak a bázis-azonosítás, „base call”. Ennek minősítéséhez a készülék programja értékeli a mért jel „jóságát”, összevetve a jelet jellemző értékeket (erősség, szélesség stb.) a már ismert szekvenciák leolvasása során nyert értékekkel. Az összevetés alapján minden leolvasott nukleotidhoz az olvasás megbízhatóságának valószínűségét tükröző számértéket rendel. Ebből származtatható a Q érték, ami a hibás azonosítás valószínűségével arányos. Q20 azt jelenti, hogy 100 alkalomból 1-szer várható hiba, Q30 esetén 1000-ben egy, Q40-nél 10.000 leolvasott nukleotidban egy tévedés várható. Tekintettel, hogy a leolvasások hossza rendszerint nem több mint néhány száz nukleotid, Q30 azt jelenti, hogy a leolvasások többsége hibátlan. Más szavakkal: Q30 értéknél a leolvasás pontossága 99,9%. Megjegyzendő, hogy természetesen Q értéket csak akkor lehet egy adott nukleotidhoz hozzárendelni, ha megtörtént a leolvasása.

A szekvenálás módszerétől függően különböző okokból származhatnak hibák. A hibák egy része eszköz, illetve módszer specifikus, más részük véletlen. Elmaradhat egy nukleotid érzékelése a fluoreszcens jel hiánya miatt, vagy egy védőcsoport eltávolítása nem történik meg, esetleg homopolimer részeknél nem megkülönböztethető az n és $n+1$ -es pozícióba történő beépülés. Általában az egy készülékre/módszerre jellemző hiba-spektrumot a hiba-modellben foglalják össze. A hibákat a készülékek programjai próbálják javítani. A programmal megvalósítható hibakorrekció sikere függ az egyes pozíciókban történt leolvasások számától, a szekvenálás mélységétől. Fontos észrevenni, hogy az amplifikációs lépéseket használó módszerek esetén a hibák korrekcióját tekintve lényeges különbséget jelent az, hogy melyik fázisban történt inszerció, delécio („indel”), helyettesítés vagy az arányokat megváltoztató szelektív sokszorozás. A könyvtár készítésekor fellépő hibák kiküszöbölésére más technikával létrehozott könyvtár, míg a rendszerhibák ellen más NGS eszközzel is végzett futtatás lehet hatásos.

Egy-egy szekvenáló projekt célja lehet *de novo* szekvencia-meghatározás, vagy a vizsgált minta már ismert szekvenciával történő összevetése, újraszekvenálása. A humán és a legfontosabb modell organizmus genomok *de novo* szekvenálása megtörtént a Sanger-féle módszerrel. A kapott eredmények képezik ezeknek az élőlényeknek a referencia-szekvenciáit (érdekes kérdés, hogy genomszekvenciák esetében mi a jó etalon). A *de novo* és az újraszekvenálás természetesen eltérő kihívást jelent, elsősorban az adatfeldolgozás tekintetében. Az előbbi esetében a szekvenciák összeillesztése, a lyukak befoltozása nehéz feladat.



3. ábra. Csoportkép a szekvenálási eljárások második nemzedékének jellemzőiről.

a) Az NGS berendezésekben a nanotechnológia és elektronika ötvöződik módosított enzimek korábban elképzelhetetlennek vélt alkalmazásával. Két IonTorrent chip és egy MiSeq átfolyó cella, az NGS készülékek két bench-top változatának fogyóeszközei. Ezek az apró eszközök 3-5 millió fragmentum egyidejű szekvenálását és 3-15 Gb leolvasását teszik lehetővé. Az NGS eredménye a könyvtár minden fragmentumának sok-sok alkalommal leolvasott nukleotid sorrendje. Elrendezve a fragmentumokat (b), jól látható az egyes részek sokszoros lefedettsége, nagyobb nagyítást használva pedig (c), hogy a fragmentumok többségének olvasása hibátlan. A készülékek kiszolgáló programja már a futás alatt megbízhatósági értéket rendel minden leolvasott nukleotidhoz (e). A futtatás követő analízis pedig megadja az eltérések helyét, gyakoriságát és a két irányból tett leolvasások számát (d).

A lyukak megszüntethetősége elsősorban a leolvasások hosszától függ (read length: a nukleotidszám, ami a szekvenálásban résztvevő fragmentumokból átlagosan meghatározható). Ez a mai NGS készülékekkel végzett szekvenálások esetén széles tartományban, néhányszor tíz nukleotidtól (ilyeneket eredményeznek a ligálást használó módszerek) néhányszor ezer nukleotidig terjedhet. Meglepő talán, hogy az igazán hosszú leolvasásokra az egyedi molekulák vizsgálatával szekvenciát szolgáltató berendezések képesek.

Az NGS platformok további jellemzői között fontosak azok, amelyek megadják egy-egy készülék teljesítményét (capacity, output), a szekvenálási folyamat idejét (ez néhány órától több napig eltarthat), az egyidejűleg kezelhető minták számát (multiplexing vagy barcoding), és természetesen nem elhanyagolható a készülékek beszerzésének és működtetésének költsége. Az ezeket jellemző értékek gyorsan változnak. Az árat tekintve jellemzően képviselheti a szélsőértékeket két 2014 elején bemutatott készülék: az Illumina HiSeq X Ten rendszer - ami értékelői szerint valóban megvalósítja majd a régen kitűzött 1000 dollár per genom célt - listaára 10 millió dollár. Az Oxford Nanopore MinION a másik véglet. Ezt készítői a mindenki számára elérhető, olcsó eszköznek szánják, 1000 dollár körüli áron. A magas eszköz beszerzési árak persze nem mindenhol jelentenek gátat. A Pekingi Genomikai Intézetben (BGI) 2011-ben többek között

137 db HiSeq 2000 és 27 SOLiD készülék működött. Persze szükség is van a nagy kapacitásra az ott folyó 3M projekt teljesítéséhez, ami 1 millió faj, 1 millió humán genom, és 1 millió metagenom/mikrobiom meghatározását tűzte ki célként. Az alábbi lista a DNS szekvenálás fejlődésének legjelentősebb technikai/módszertani lépéseit tartalmazza. Az áttekintés második részében a 2005-től kibontakozó második szekvenáló nemzedék már széleskörűen használt vagy előrehaladott fejlesztési fázisban lévő módszereinek és készülékeinek jellemzőit összegezem röviden, az alkalmazott szekvenálási eljárás szerint csoportosítva őket.

1975-1977	Láncterminációs és kémiai DNS szekvenálási módszerek közlése.
1986	Első fluoreszcens jelzést használó automata szekvenáló készülék.
1999	Kapilláris szekvenáló készülékek bevezetése.
2005-től	NGS készülékek megjelenése.
2009-től	Bench-top NGS készülékek megjelenése.
2013	FDA engedély NGS alkalmazásra klinikai diagnosztikában.

Az összefoglaló a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében nyert támogatással készült.

Irodalom

Az érdeklődő a szekvenálás korai és újabb módszereiről egyaránt könnyen találhat irodalmat. Az alábbi néhány közlemény közül néhány a korai időkből származik, a későbbi összefoglalók pedig referencia listájukkal is segíthetnek a további tájékozódásban.

Sanger, F., Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Molec Biol*, **94**: 441-448.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463-5467.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 560-564.

Csordás-Tóth, E., Boros, I., Venetianer, P. (1979a) Nucleotide sequence of a secondary attachment site for bacteriophage lambda on the Escherichia coli chromosome. *Nucleic Acids Res*, **7**: 1335-1341.

Csordás-Tóth, E., Boros, I., Venetianer, P. (1979b) Structure of the promoter region for the rrnB gene in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **7**: 2189-2197.

Franca, L.T.C., Carrilho, E., Kist, T.B.L. (2002) A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys*, **35**: 169–200.

Niedringhaus, T.P., Milanova, D., Kerby, M.B., Snyder, M.P., Barron, A.E. (2011) Landscape of Next-Generation Sequencing Technologies. *Anal Chem*, **83**: 4327–4341.

Mardis, E.R. (2013) Next-Generation Sequencing Platforms. *Annu Rev Anal. Chem*, **6**: 287–303.

Collins, F.S., Hamburg, M.A. (2013) First FDA authorization for next-generation sequencer. *N Engl J Med*, **369**: 2369–2371.



Boros Imre Miklós 1953-ban született Taktaharkányban. 1978-ben végzett a JATE biológus szakán. Ekkor már több éve diákkörös hallgatóként az SZBK-ban dolgozott Venetianer Pál csoportjában. 1985-ben szerzett kandidátusi fokozatot, 2000-ben MTA Doktora címet. Pályakezdésétől az SZBK Biokémiai Intézet munkatársa. 2002-től a Szegedi Egyetem egyetemi tanára, jelenleg a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék és a Biológus Tanszékcsoport vezetője. Több alkalommal dolgozott hosszabb időn át az Egyesült Államokban (1986-89 NIH Cancer Institute, 1992-95 Case Western University, Medical School). Cancer Institute Oncology Research Faculty Development Award, Széchenyi Ösztöndíj, Szentágothai Ösztöndíj, Straub plakett, Ipolyi Arnold Díj elismeréseket kapott. Érdeklődése a génműködés transzkripció szinten megvalósuló szabályozása, az utóbbi tíz évben munkacsoportja a kromatinszerkezet szerepét és epigenetikai hatásait vizsgálja.

A XII-ES FAKTOR ÚJRAFELFEDEZÉSE GYULLADÁSOK KÖZVETÍTŐJEKÉNT: ÉLETTANI SZEREPE ÉS EGY ÚJ KUTATÁSI PROJEKT ELŐZETES EREDMÉNYEI

Szakács Dávid^{1*} és Beinrohr László^{2*}

*egyenrangú szerzők

¹ **ELTE Biokémiai Tanszék, Budapest**
e-mail: szakacsdavid@caesar.elte.hu

² **MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Budapest**
e-mail: laszlo.beinrohr@ttk.mta.hu

Összefoglalás

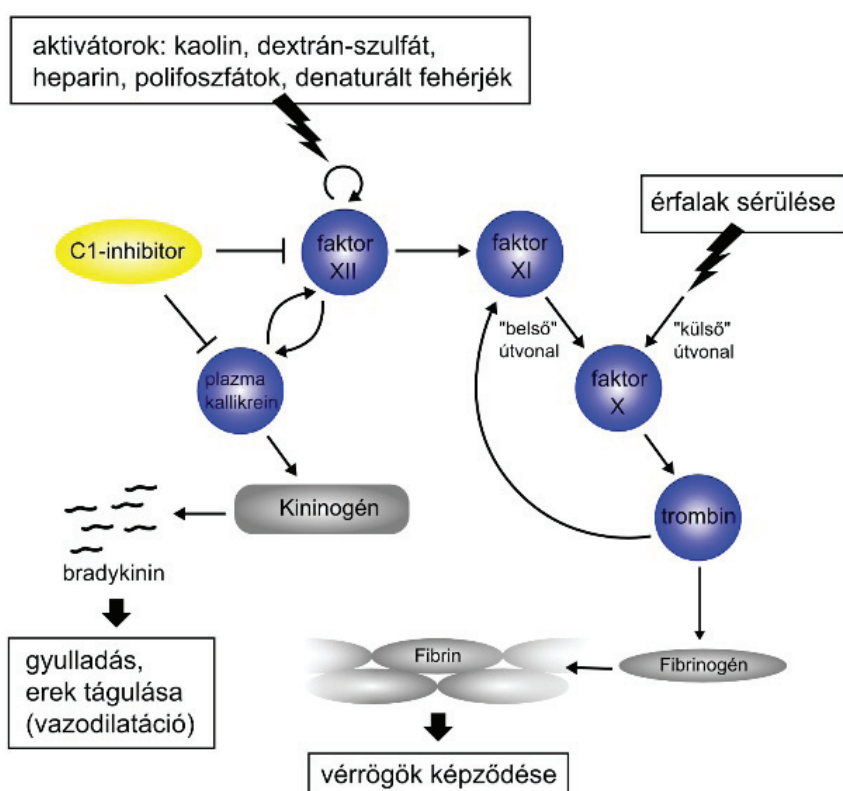
A véralvadás XII-es faktorának (fXII) *in vivo* szerepe, valamint működésének szabályozása a mai napig nem ismert részletesen. A fXII-t a véralvadás belső útvonalát elindító szerin proteáz enzimeként írták le [2]. Ugyanakkor korán felismerték, hogy hiánya mégsem okoz vérzékenységet. Az *in vitro* és *in vivo* tapasztalatok ellentmondása évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat. Az elmúlt évtizedben fXII deficiens egerekben kimutatták, hogy ezek az állatok védettek a szívinfarktusz és iszkémiás stroke kialakulásával szemben [3]. Egészen friss felismerés, hogy a fXII részt vesz a keletkező vérrög szerkezetének stabilizálásában [4]. Ez merevebb vérrögök kialakulásához vezet, amelyek képesek vérereket elzárni. Az utóbbi években a fXII szerepét feltárták a véralvadáshoz nem kapcsolódó folyamatokban is. A fXII a közelmúltban felismert fiziológiás aktivátorai, pl. polifoszfátok és heparin hatására aktiválja a kallikrein-kinin vagy kontakt rendszert [5, 6]. A kallikrein-kinin rendszer aktivitása bradykinin felszabadulásával jár. A bradykinin gyulladásszerű és allergiás folyamatok fontos mediátora, többek között egy potenciálisan halálos betegség, az örökletes angioödéma tüneteinek okozója is [7]. Ezek a megfigyelések ígéretes gyógyszercélpont molekulává teszik a fXII-t. Gátlásán keresztül lehetőség nyílna a kóros vérrögződést és gyulladásszerű folyamatokat megakadályozni úgy, hogy közben a véralvadás képessége nem sérül. Kutatócsoportjainkban rekombináns úton állítunk elő fXII konstrukciókat az aktiváció mechanizmusának feltárásához és irányított evolúciós megközelítéssel fejlesztettünk kanonikus szerin proteáz inhibitorokat. Az inhibitorok segítségével megismerhetjük a fXII aktiválódásának és szabályozásának szerkezeti hátterét, valamint hosszabb távon potenciális új terápiák bevezetésére is mód nyílna.

Bevezetés

A véralvadás XII-es faktora (fXII) több más véralvadási faktorhoz hasonlóan C-terminális szerin proteáz doménnel rendelkező többdoménes fehérje. A véralvadási rendszerről alkotott klasszikus ismeretek szerint a fXII a véralvadás belső vagy kontakt aktivációs útvonalának inicializáló enzime (1. ábra). Ismert, hogy a fXII akkor aktiválódik, amikor negatívan töltött mesterséges felszínnel (pl. kaolin vagy dextranszulfát) érintkezik. Az aktiválódott fXII (fXIIa) két legfontosabb szubsztrátjai maguk is szerin proteáz proenzimek (zimogének):

a prekallikrein és a véralvadás XI-es faktora (fXI). Az aktivált fXII-nek több formája létezik (2A. ábra). Az α fXIIa (aktivált teljes hosszúságú fXII) esetében az egy peptidkötés mentén történő proteolízissel aktiválódott szerin proteáz domént és az N-terminális doméneket még mindig összeköti egy diszulfidhíd. Ez a forma sokszor aktivátor felszínhez kötött, és hatékonyan képes aktiválni fXI-et és plazma kallikreint egyaránt. Az α fXIIa-t a plazma kallikrein képes más pozíciókban is elhasítani, aminek következtében β fXIIa (processzált aktív fXII) keletkezik. A β fXIIa már csak a szerin proteáz domént tartalmazza. A β fXIIa nem kötődik aktivátor felszínéhez és nem képes fXI aktiválására [8].

Az aktivált fXI a véralvadási kaszkád beindításáért felelős. A fXII hiánya a véralvadás belső útvonalának épségét jellemző tesztben kapott érték, az ún. aktivált parciális tromboplastin idő (APTT) megnövekedésével jár. Azaz a fXII aktivitása a belső útvonal aktiválásán keresztül – a teszt során alkalmazott körülmények között jelentősen – hozzájárul a fibrin képződéshez. Ezzel látszólag ellentmondásban van, hogy a fXII hiánya nem jár együtt vérzékenységgel. A jelenség magyarázata legalábbis részben az, hogy a fXI leghatékonyabb aktivátora *in vivo* a véralvadási kaszkád központi enzime, a trombin. A belső útvonal tehát nem elsősorban a véralvadás független útvonalaként működik, szerepe a véralvadásban inkább egy trombin által aktivált erősítő hurokként képzelhető el [9, 10].



1. ábra. A fXII a klasszikus ismeretek szerint a véralvadás belső útvonalát elindító enzim. A fXII szerepe a véralvadásban részleteiben máig tisztázatlan. A közelmúltban kimutatták, hogy felelős lehet a vérrögök stabilizálásáért és ezáltal artériás trombózissal összefüggő betegségek kialakulásáért. Az elmúlt években napvilágot látott eredmények alapján a fXII a kallikrein-kinin rendszer aktiválásán keresztül hozzájárul a gyulladásos mediátor bradykinin felszabadulásához és ezáltal gyulladásos és allergiás betegségek kialakulásához is. Ezek a megfigyelések a fXII-t potenciális gyógyszer célpont molekulává teszik.

Régóta célozzák kutatások a fXII *in vivo* szerepének minél pontosabb feltárását és a fXII aktiválására az élő szervezetben képes molekulák azonosítását. A közelmúltban fXII-/- egerekkel [3], kismolekulájú fXII inhibitorral [11], valamint egy, a csókospoloskából (*Triatoma infestans*) izolált inhibitor fehérjével [12, 13] végzett kísérletek során kimutatták, hogy a fXII aktivitása hozzájárul különböző artériás trombólózissal összefüggő betegségek kialakulásához. Ezek az eredmények a fXII-re, mint gyógyszer-célpont molekulára irányították a figyelmet. Kísérleteket főemlős modellen is végeztek már hasonló eredménnyel, de máig csak nagyon kevés állat bevonásával [14].

Az emberi vérplazmával és izolált vérrögökkel végzett kísérletekben azt mutatták ki, hogy a fXII a merevebb, sűrűbb fibrinhálójú vérrögök kialakulásához járul hozzá. Ezek a vérrögök képesek a vérereket elzárva trombotikus betegségeket okozni. Fontos, hogy ez a hatás nem függ a trombin jelenlététől, ugyanis olyan trombin mentes szérumban is megfigyelték, amiben a véralvadást kígyóméreg proteázzal indították el. Vagyis a fXII nem a belső útvonalon keresztül történő trombin aktiválás révén járul hozzá a vérrög képződéshez, hanem a keletkező vérrög szerkezetét modulálja [4]. Ez magyarázhatja, hogy miért jelenthet védettséget a fXII aktivitás hiánya az artériákban keletkező vérrögök által okozott betegségek kialakulásával szemben. Epidemiológiai vizsgálatok ugyanakkor azt találták, hogy a fXII-nek fontos szerepe van a szervezet védelmében. Egy közel 9000 embert követő tanulmány azt mutatta ki, hogy a szérumban mért fXII aktivitás és a túlélés (overall survival) között U-alakú összefüggés áll fenn. A fXII hiány és a nagyon alacsony (< 10%) fXII aktivitás előnyt jelenthet, azonban az átlagosnál alacsonyabb, de nem szélsőségesen alacsony szérumban mért fXII aktivitás inkább általános rizikófaktornak tekinthető [15].

A fXII-nek a véralvadás mellett szerepe van a gyulladáshoz vezető bradykinin peptidhormon felszabadításában is (1. ábra). A fXII által aktivált plazma kallikrein pozitív visszacsatolással további fXII-t aktivál. A plazma kallikrein nagy molekulatömegű kininogént hasít. A reakció terméke a gyulladáshoz vezető bradykinin peptid. Ez a három fehérje, a fXII, a plazma kallikrein és a nagy molekulatömegű kininogén alkotja az ún. kallikrein-kinin rendszert. A bradykinin hatása az endotélsejtek membránjába ágyazott bradykinin receptorokon keresztül érvényesül. A bradykinin receptorok (1-es és 2-es típusú bradykinin G-fehérje kapcsolt receptorok) gyulladáshoz vezető folyamatokért felelős jelátviteli útvonalakat aktiválnak, aminek következménye az erek tágulása, az érfal átjárhatóságának növekedése és neutrofil granulociták toborzása.

A bradykinin jelentősége megmutatkozik patológiás esetekben is. Az örökletes angioödéma (HAE) egy ödémás rohamokkal járó betegség, ami a duzzanat helyétől és mértékétől függően akár életveszélyes állapotot is előidézhet. A HAE hátterében minden esetben a kallikrein-kinin rendszer szabályozásának rendellenessége húzódik meg [16]. A kontakt rendszer aktiválódásakor a hibás szabályozás következtében nagy mennyiségű bradykinin keletkezik. A HAE I-es típusában csökkent mennyiségben van jelen a fXII és a plazma kallikrein gátlására képes inhibitor, a C1-inhibitor fehérje. A II-es típusban a C1-inhibitor mennyisége normális, de mutáció következtében nem képes a funkcióját hatékonyan ellátni

[7]. A közelmúltban kimutatták, hogy a női HAE betegek egy részénél a C1-inhibitor koncentrációja és működése is normális [17]. Ezeknél a betegeknél a tünetek általában magas ösztrogén szint esetén jelentkeznek, például terhesség alatt. Ismert, hogy az ösztrogén serkenti a fXII termelését. Ezek a betegek szinte kivétel nélkül a fXII-nek egy, a vadtypusnál nagyobb enzimatis aktivitással rendelkező változatát hordozzák [18, 19].

Az utóbbi idők egyik jelentősebb közleménye szerint a hízósejtek által közvetített allergiás és gyulladásos folyamatok előidézésében a hisztamin mellett a bradykinin is részt vesz. Az elmúlt években kimutatták, hogy a hízósejtek által termelt heparin *in vivo* is képes aktiválni a fXII-t, és általa a bradykinin felszabadulásáért felelős kontakt rendszert [6]. Ezzel összhangban van az a megfigyelés is, hogy az angioödémás rohamokat gyakran valamilyen allergénnel való érintkezés váltja ki [16]. A fXII tehát nem csak bizonyos trombotikus betegségek megelőzésében lehet gyógyszer-célpont molekula, hanem a HAE és bizonyos allergiás rohamok is kezelhetőek lehetnek fXII gátlásával.

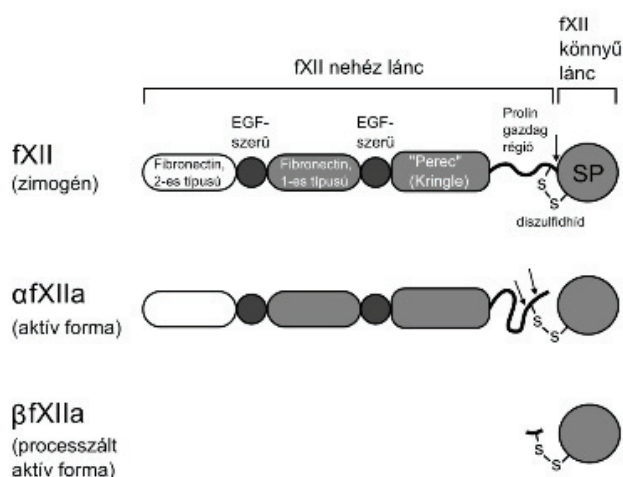
Az elmúlt években napvilágot látott több olyan eredmény is, ami a fXII és a kontakt rendszer részleteiben nem ismert, finom és bonyolult szabályozására utal. A kontakt rendszer aktiválása ugyanis sok esetben nem jár együtt a véralvadási kaskád beindításával. A kontakt rendszer aktiválódásával összefüggő allergiás és gyulladásos betegségek esetében nem írták le, hogy ezek megnövelnék a trombotikus betegségek kialakulásának valószínűségét. Különböző mesterséges fXII aktivációs felszínek vizsgálata során észlelték, hogy az alkalmazott felszín minőségétől függően tapasztalható csak a kontakt rendszer vagy a kontakt és a véralvadási rendszer együttes aktiválódása. A fXII szerin proteáz doménjének felismerésére fejlesztett ellenanyag fragmentumok segítségével kimutatták, hogy a fXII-nek az alkalmazott aktivációs felszíntől függően eltérő formái jelennek meg a szérumban [20]. Kimutatták azt is, hogy fehérje aggregátumok és amiloid peptidok képesek aktiválni a fXII-t anélkül, hogy ez a véralvadási kaskád beindításával járna [21]. Azaz az aktivációs felszín minősége befolyásolja, hogy milyen arányban keletkezik α fXIIa és β fXIIa a rendszerben.

A természetből több reverzibilis fXII inhibitor fehérje is ismert. Ezek közül kettő tekinthető igazán hatékonynak. Az ecotint az *Escherichia coli* baktérium termeli. Ez az inhibitor számos szerin proteáz hatékony gátlására képes, azaz nem specifikus a fXII-re [22]. Az infestin-4 a csókospoloskából (*Triatoma infestans*) származik. Ez nemcsak hatékony, de viszonylag specifikusnak is bizonyult a fXII-re [23]. A kutatási projekt céljaként azt tűztük ki, hogy fág bemutatás alkalmazásával feltárjuk a fXII gátlását lehetővé tevő aminosav mintázatot az SGPI-2 (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 2) kanonikus szerin proteáz inhibitorból kiindulva. Az SGPI-2 vázat felhasználva már számos jelentős eredmény született kutatócsoportjainkban. A feltárt mintázat rengeteg információt tartalmaz arról, hogy a fXII milyen aminosavakat preferál az inhibitor enzimmel kapcsolatban levő pozícióiban. A mintázat alapján újfajta fXII inhibitorok tervezésére és előállítására nyílik lehetőség, amelyek hatékonysága és specifitása ideális esetben vetekedhet az infestin-4 tulajdonságaival.

Kísérletes megközelítés és a kezdeti eredmények

A fXII zimogént 6 domén alkotja, amelyeket flexibilis linkerek kötnek össze (2A ábra). A negatív töltésű mesterséges felszínekkel érintkezve könnyen aktiválódik, és a szérumban jelen levő más proteázok több ponton hasíthatják. Ezenkívül, mint a vérben található fehérjék általában, a fXII poszttranszlációs glikozilálva van. A fXII prolin gazdag régiója különösen sűrűn van O-glikozilálva. Ezért teljes láncú formájában a szérumból tisztított fehérje szerkezetileg rendkívül heterogén.

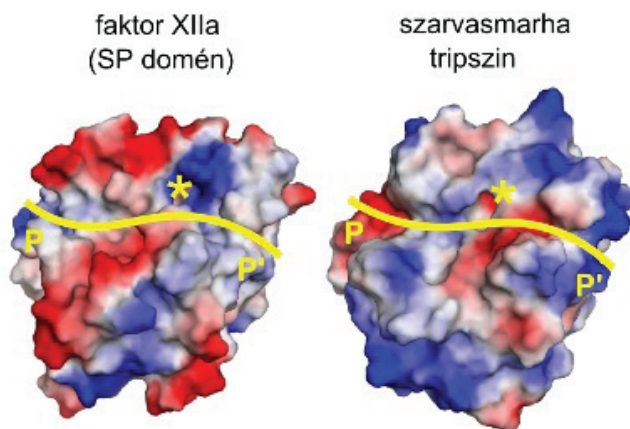
A



2. ábra. A zimogén fXII-t hat domén alkotja.

A) Az N-terminális felől rendre 2-es típusú fibronectin, EGF-szerű, 1-es típusú fibronectin, EGF-szerű, „perec” (kringle), majd egy hosszú prolin gazdag régiót követően a szerin proteáz domén (SP) következik. Az aktiváció első lépése során a szerin proteáz domén N-terminális végéhez közel hasad el egy peptid kötés. Az így keletkező aktív αfXIIa forma diszulfid híd által összekötve tartalmazza az öt N-terminális domént (nehéz lánc) és az immár aktív szerin proteáz domént (könnyű lánc). Az aktív plazma kallikrein képes a fXII prolin gazdag régiójában egy másik peptid kötés elhasítására is. Ez a hasítás βfXIIa-t eredményez, ami gyakorlatilag az aktív szerin proteáz doménnek felel meg. **B)** A fXII szerin proteáz domén és a szarvasmarha tripszin felszíni töltésmintázata. A fXII felszíne tagoltabb, a szubsztrátkötő árkot savas karakterű hurkok határolják. Az enzimek szubsztrát megkötése szempontjából kiemelt fontosságú S1 kötőzsebet csillaggal jelöltük. A szubsztrátkötő árkot sárga szalaggal kiemeltük.

B

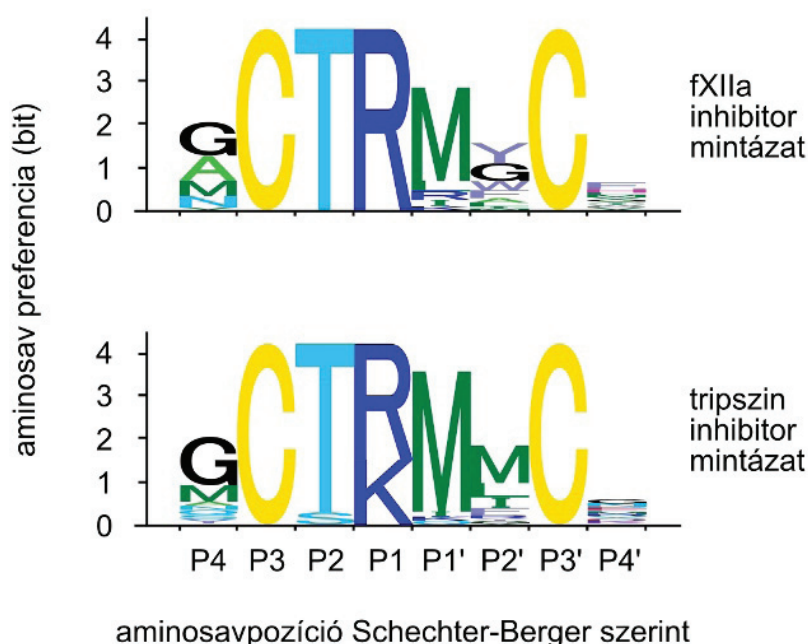


A heterogenitás problémáját a fXII rekombináns előállításával oldottuk meg. Első megközelítésben a minimális katalitikus egységet, a szerin proteáz domént fejeztük ki. A laboratóriumunkban fehérjék szerkezetmegoldáshoz való előállítására már sikeresen használt *Pichia pastoris* élesztő rendszert használtuk [1, 24, 25]. A *Pichia* rendszer eukarióta expressziós rendszer, így a bakteriális *Escherichia coli* rendszerrel szemben képes a fehérje aktivitásához szükséges poszttranszlációs módosítások végrehajtására. A fXII katalitikus doménje számos diszulfidhidat tartalmaz, amik szükségesek a szerkezet stabilitásához és a katalitikus aktivitáshoz.

A kutatásainkhoz elegendő mennyiséget kívántunk előállítani nemcsak fágbemutatáshoz, hanem a fXII szerkezetének röntgenkristallográfiás módszerrel való vizsgálatához is. A röntgenkristallográfia a fehérjepreparátum nagyfokú tisztasága mellett a minta konformációs homogenitását is igényli. Ezért a fXII-nek maltózkötő fehérjéhez (MBP) fuzionáltatott formáját fejeztük ki és amilóz affinitás kromatográfiával tisztítottuk > 95%-os tisztaságúra. A glikozilációs heterogenitást Endoglikozidáz H enzimes kezeléssel szüntettük meg. A fúziós fehérjét úgy terveztük meg, hogy a – fXII aktiválás során – hasadó kötés elé a DDDDK szekvenciát illesztettük be a természetes szekvencia helyett. Ezt a szekvenciát specifikusan hasítja a Lys után a kereskedelemben kapható enterokináz proteáz. A hasítás eredményeképpen aktivált fXII szerin proteáz domént kapunk. A természetes szekvenciát nem egyetlen helyen hasíthatják a szérumban jelen levő proteázok (lásd α és β fXII formák), így az enterokinázos hasítással a heterogenitás egy lehetséges forrását is megszüntettük. Végeredményben ~1-5 mg nagyságrendben tudtunk tisztított és homogén fXIIa preparátumot előállítani, ami elégségesnek bizonyult arra, hogy feltérképezzük a fXII gátlását lehetővé tevő aminosav mintázatot fág bemutatással és a mintázat alapján előállított fXII inhibitorok tulajdonságait meghatározzuk oldatfázisú aktivitásmérések során.

A fág bemutatás a legsikeresebben alkalmazott irányított evolúciós eljárás. Segítségével lehetőség nyílik nagy kölcsönható felszínek gyors feltérképezésére, valamint új interakciós partnerek kifejlesztésére [26]. A fág bemutatás alkalmazható proteáz inhibitor fehérjék fejlesztésére is [27]. A fXII inhibitor fejlesztés alapjául az SGPI-2 nevű kis kanonikus inhibitor fehérjét választottuk. Ebből a molekulából kiindulva korábban sikerült hatékony inhibitorokat fejlesztenünk a tripszin aktivitásának szabályozásáért felelős kimotripszin C [28], valamint a komplement rendszer lektin útjának beindításáért felelős MASP-1 és MASP-2 enzimekkel szemben [29, 30]. Az SGPI-2 esetében feltérképeztük a szarvasmarha tripszinhez és kimotripszinhez, valamint a sertés pankreatikus elasztázhoz való kötődést lehetővé tevő szekvencia mintázatot is.

Az inhibitornak az enzimmel kölcsönhatásba lépő központi régiójának összes lehetséges változatát reprezentáló fág-fehérje könyvtárat hoztunk létre. A könyvtárban az inhibitor Schechter-Berger nevezéktan [31] szerinti P4-P4' közti szakaszán minden pozícióban megengedtük az összes aminosav előfordulását. Ez alól kivételt képeztek a P3 és P3' pozíciókban található, a 3. ábrán sárga színnel feltüntetett ciszteinek. Ezek a ciszteinek az inhibitor hurok megfelelő szerkezetének kialakítása szempontjából nélkülözhetetlen diszulfid hidakat alkotnak. A könyvtárból kiválogattuk a fXIIa-hoz szelektíven kötő változatokat. A szelekció során rekombináns fXIIa szerin proteáz domént alkalmaztunk célpont fehérjeként. A szelekciót követően 52 egyedi fXIIa kötő fehérje variáns génjét szekvenáltuk, és a fXIIa kötés képességét az inhibitorok számára biztosító aminosav szekvencia mintázatot szekvencia logó formájában ábráztuk [32] (3. ábra).



3. ábra. A szekvencia logó egyes oszlopainak magassága azt tükrözi, hogy az adott oszlopban az aminosavak előfordulási gyakorisága milyen messze van az egyenletestől. A legegyszerűsebb eloszlás az, amikor egyetlen aminosav fordul elő egy pozícióban. Ezeknek az oszlopoknak maximális, bitekben kifejezve $\log_2 20$ a magassága. Ha egy pozícióban mind a 20 aminosav előfordul, ráadásul egyforma gyakorisággal, akkor tökéletesen egyenletes az eloszlás. Ebben az esetben az adott pozícióban az oszlop magassága nulla lenne. A magasabb oszlopokban tehát kevesebb féle aminosav fordul elő a megvizsgált klónokban, azaz itt komoly feltétele van a vizsgált enzimhez való kötésnek. Az egyes betűk magassága egy pozícióban az aminosavak előfordulási gyakoriságával arányos. A betűk színe az aminosavak kémiai karakterére utal: a hasonló karakterű aminosavak azonos színnel vannak feltüntetve.

Az 3. ábrán látható, hogy az SGPI-2 inhibitor vázon végzett szelekció hasonló mintázatot eredményezett a fXIIa (felső logó) és a szarvasmarha tripszin (alsó logó) esetében. A legfontosabb különbség, hogy a fXIIa az enzim-inhibitor kölcsönhatás szempontjából kiemelt jelentőségű P1 pozícióban arginin mellett köteleződétt el, míg a tripszin az arginint és a lizint egyaránt elfogadja. A tripszin emésztő enzim, feladata a táplálék fehérjéinek peptidekre történő hasítása. Ennek megfelelően szubsztrátkötő árka nyitott, szabadon hozzáférhető. Ezzel szemben a fXII felszíne - homológia modellezett szerkezet alapján - sokkal tagoltabb [1]. A szubsztrátkötő árkot savas karakterű felszíni hurkok leszűkítik, igaz, a modell alapján nem torlaszolják el azt (2B. ábra). A fentiek alapján mindenképpen váratlan eredmény, hogy a két enzim ennyire hasonló feltételeket támaszt az inhibitorokkal szemben. A jelenség háttérében meghúzódó szerkezeti okok felderítése a terveink között szerepel.

A szekvencia logó alapján előállítottunk három fXII inhibitor molekulát, és meghatároztuk ezek egyensúlyi inhibíciós állandó (K_i) értékeit a fXIIa szerin proteáz doménjével szemben (1. Táblázat). Mindhárom létrehozott inhibitor gátolja a fXIIa szerin proteáz doménjét, azonban hatékonyságuk elmarad az infestin-4-étől. Az irodalmi adatok szerint az infestin-4 K_i értéke a fXII-vel

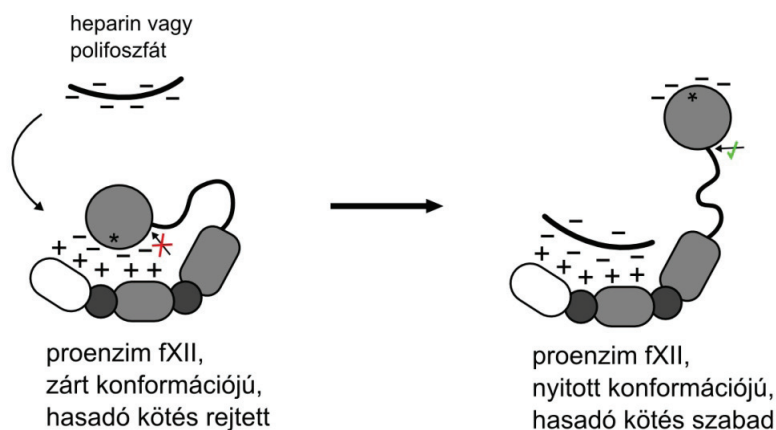
szemben 78 pM [33]. A leghatékonyabbnak bizonyult, a P4-P4' szakaszon ACTRMYCF szekvenciával rendelkező fXII inhibitor K_i értékét meghatároztuk szarvasmarha tripszinnel szemben is. Az inhibitor rendkívül hatékony tripszin inhibitornak bizonyult, a kölcsönhatás K_i értéke 10 pM-nál kisebb. A szekvencia mintázatok hasonlóságának fényében nem meglepő, hogy a fXII gátlására kifejlesztett inhibitorok a tripszint is hatékonyan gátolják.

1. táblázat. A létrehozott fXII inhibitorok K_i értékei.

P4-P4'	K_i (nM)	
	fXII	tripszin
GCTRMYCF	100	–
ACTRMYCF	25	<0,01
GCTRRFCF	100	–

Előretételezés – új munkahipotézis

A továbbiakban a fXII szerkezeti biokémiai módszerekkel történő vizsgálatát tervezzük. Mi lehet annak a szerkezeti oka, hogy a természetből ismert, illetve az irányított evolúcióval kifejlesztett fXII inhibitorok specifitása és hatékonysága ilyen nagy eltéréseket mutat? A fXII különböző rekombináns formáinak kristályosítását tervezzük apo állapotban, illetve különböző inhibitorokkal komplexben. A vizsgálatokba bevonjuk a pánspecifikus szerin proteáz inhibitor ecotint [22], valamint az infestin-4-et [23, 33] is. A megoldott kristályszerkezetektől reméljük, hogy segítségükkel fényt deríthetünk a fXII más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásainak szerkezeti hátterére, valamint az egyes inhibitorok eltérő tulajdonságainak szerkezeti okaira.



4. ábra. A zimogén fXII aktivációja során hasadó kötések aktivátor hiányában nem hozzáférhetőek. Az aktivátorral való kölcsönhatás eredményeképpen a fXII térszerkezete megváltozik és a hasadó kötés vagy kötések hozzáférhetővé válnak. A különböző aktivátorokkal a finom részletekben különböző kapcsolatokat alakíthat ki a fXII. Ennek következménye lehet, hogy a különböző aktivátorok hatása egymástól eltér. Bizonyos aktivátorok hatására stabil, a kallikrein-kinin rendszert és a véralvadást is hatékonyan aktiváló afXIIa keletkezik. Más aktivátorok hatására a keletkező afXIIa gyorsan β fXIIa-vá alakul. Ez a forma már csak a kallikrein-kinin rendszer aktiválására képes.

A fXII aktiváció szerkezeti hátterének részletekbe menő vizsgálatára is lehetőségünk nyíthat, ha sikerül teljes láncú zimogén fXII-t tiszta formában előállítani. Ebben az esetben vizsgálhatnánk, hogy a különböző aktivációs felszínek, szubsztrátok és más interakciós partnerek pontosan hogyan befolyásolják azt, hogy elsősorban α fXIIa vagy β fXIIa keletkezik, és ennek függvényében a kontakt rendszer mellett aktiválódik-e a véralvadás belső útvonala is. A zimogén fXII esetében feltételezhető, hogy a nagyméretű negatívan töltött felszínekkel rendelkező szerin proteáz domén az N-terminális domének pozitívan töltött felszíneire fekszik. A szintén negatívan töltött aktivátor felszínek leszoríthatják a szerin proteáz domént az N-terminális doménekről. A fXII finom részleteiben különböző kölcsönhatásokat alakíthat ki az eltérő aktivátor felszínekkel, aminek következtében a fXII aktiváció során hasadó kötések hozzáférhetősége is különbözhet. Ez magyarázhatná, hogy az interakció felszín minősége hogyan határozza meg, hogy milyen aktivált fXII forma jelenik meg a szérumban (4. ábra).

Az SGPI-2-ből kifejlesztett inhibitorok hatékonyságának és specifitásának növelésére is lehetőség van újabb irányított evolúciós kísérletekben. A megnövelt hatékonyságú inhibitorok vagy az infestin-4 alkalmazásával tervezzük olyan szérumban kísérletek elvégzését is, amelyek eredményei alapján jobban megérthetjük a fXII aktiválódásának molekuláris részleteit az élő szervezetben, illetve megismerhetjük a fXII más folyamatok elindításában és szabályozásában betöltött szerepének jelentőségét.

Irodalomjegyzék

- [1] Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lőrincz, Z., Gál, P., Závodszy, P. (2007) C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*, **282**: 21100–9.
- [2] Ratnoff, O.D., Colopy, J.E. (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma 1. *J Clin Invest*, **34**: 602–13.
- [3] Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.-U., Burfeind, P., Gailani, D., Nieswandt, D. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*, **202**:271–81.
- [4] Konings, J., Govers-Riemslog, J.W.P., Philippou, H., Mutch, N.J., Borissoff, J.I., Allan, P., Mohan, S., Tans, G., ten Cate, H., Ariëns, R.A.S. (2011) Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood*, **118**: 3942–51.
- [5] Müller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey J.H. Renné, T. (2009) Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*, **139**: 1143–56.

- [6] Oschatz, C., Maas, C., Lecher, B., Jansen, T., Björkqvist, J., Tradler, T., Sedlmeier, R., Burfeind, P., Cichon, S., Hammerschmidt, S., Müller-Esterl, W., Willemin, W.A., Nilsson, G., Renné, T. (2011) Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo. *Immunity*, **34**: 258–68.
- [7] Kaplan, A.P., Joseph, K. (2010) The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*, **104**: 193–204.
- [8] Revak, S.D., Cochrane, C.G., Bouma, B.N., Griffin, J.H. (1978) Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J Exp Med*, **147**: 719–29.
- [9] Gailani, D., Broze, G.J. Jr. (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*, **253**: 909–12.
- [10] Matafonov, A., Sarilla, S., Sun, M., Sheehan, J.P., Serebrov, V., Verhamme, I.M. Gailani, D. (2011) Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood*, **118**: 437–45.
- [11] Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.-U., Burfeind, P., Renné, C., Gailani, D., Nieswandt, B., Renné, T. (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med*, **203**: 513–8.
- [12] Hagedorn, I., Schmidbauer, S., Pleines, I., Kleinschnitz, C., Kronthaler, U., Stoll, G., Dickneite G., Nieswandt, B. (2010) Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation*, **121**: 1510–7.
- [13] Chen, J.W., Figueiredo, J.-L., Wojtkiewicz, G.R., Siegel, C., Iwamoto, Y., Kim, D.-E., Nolte, M.W., Dickneite, G., Weissleder, R., Nahrendorf, M., (2012) Selective factor XIIa inhibition attenuates silent brain ischemia: application of molecular imaging targeting coagulation pathway. *JACC Cardiovasc Imaging*, **5**: 1127–38.
- [14] Matafonov, A., Leung, P.Y., Gailani, A.E., Grach, S.L., Puy, C., Cheng, Q., Sun, M.-f., McCarty, O.J.T., Tucker, E.I., Kataoka, H., Renné, T., Morrissey, J.H., Gruber, A., Gailani, D., (2014) Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood*,
- [15] Endler, G., Marsik, C., Jilma, B., Schickbauer, T., Quehenberger, P., Mannhalter, C., (2007) Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost*, **5**: 1143–8.
- [16] Zuraw, B.L. (2008) Hereditary Angioedema. *N Engl J Med*, **59**: 1027–36.
- [17] Bork, K., Barnstedt, S.E., Koch, P., Traupe, H. (2000) Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet*, **356**: 213–7.
- [18] Cichon, S., Martin, L., Hennies, H.C., Muller, F., Van Driessche, K., Karpushova, A., Stevens, W., Colombo, R., Renné, T., Drouet, C., Bork, K., Nöthen, M.M. (2006) Increased Activity of Coagulation Factor XII (Hageman Factor) Causes Hereditary Angioedema Type III. *Am J Hum Genet*, **79**: 1098–104.
- [19] Bork, K., Wulff, K., Hardt, J., Witzke, G., Staubach, P. (2009) Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol*, **124**: 129–34.

- [20] De Maat, S., van Dooremalen, S., de Groot, P.G., Maas, C. (2013) A nanobody-based method for tracking factor XII activation in plasma. *Thromb Haemost*, **110**: 458–68.
- [21] Maas, C., Govers-Riemslog, J.W.P., Bouma, B., Schiks, B., Hazenberg, B.P.C., Lokhorst, H.M., Hammarström, P., ten Cate, H., de Groot, P.G., Bouma, B.N., Gebbink, M.F.B.G. (2008) Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest*, **118**: 3208–18.
- [22] Ulmer, J.S., Lindquist, R.N., Dennis, M.S., Lazarus, R.A. (1995) Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein. *FEBS Lett*, **365**: 159–63.
- [23] Campos, I.T.N., Tanaka-Azevedo, A.M., Tanaka, A.S. (2004) Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Letters*, **577**: 512–6.
- [24] Beinrohr, L. (2009) A C1-inhibitor specificitásának és deficienciájának atomi szintű magyarázata. Doktori értekezés, Szerkezeti biokémia doktori program, ELTE Biológia Doktori Iskola (http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2009/beinrohr_l1.pdf).
- [25] Beinrohr, L., Murray-Rust, T.A., Dyksterhuis, L., Závodszy, P., Gál, P., Pike, R.N., Wijeyewickrema, L.C. (2011) Serpins and the complement system. *Methods Enzymol*, **499**: 55–75.
- [26] Pál, G. (2008) Milliárdok versengése: Irányított evolúciós módszerek a fehérjetudományban. *Biokémia*, **32**: 82–85.
- [27] Zani, M.-L., Moreau, T. (2010) Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie*, **92**: 1689–704.
- [28] Szabó, A., Héja, D., Szakács, D., Zboray, K., Kékesi, K.A., Radisky, E.S., Sahin-Tóth, M., Pál, G., (2011) High affinity small protein inhibitors of human chymotrypsin C (CTRC) selected by phage display reveal unusual preference for P4' acidic residues. *J Biol Chem*, **286**: 22535–45.
- [29] Héja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobó, J., Kékesi, K.A., Závodszy, P., Gál, P., Pál, G. (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J Biol Chem*, **287**: 20290–300.
- [30] Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszy, P., Pál, G., Gál, P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci*, **109**: 10498–503.
- [31] Schechter, I., Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**: 157–62.
- [32] Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**: 1188–90.
- [33] Campos, I.T.N., Amino, R., Sampaio, C.A.M., Auerswald, .E.A, Friedrich, T., Lemaire, H.-G., Schenkman, S., Tanaka, A.S. (2002) Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol*, **32**: 991–7.



Szakács Dávid az ELTE Szerkezeti biokémia doktori programjának hallgatója. Doktori kutatását az ELTE Biokémiai Tanszékén, a Dr. Pál Gábor által vezetett Irányított fehérje-evolúció kutatócsoportban végzi. Munkája során érdekes biológiai funkcióval rendelkező szérumban proteázok hatékony és szelektív gátlására képes inhibitor fehérjét fejleszt. Ezek az inhibitorok lehetővé teszik a vizsgált enzimek fiziológiás szerepének részletetekbe menő tanulmányozását. A laboratórium kutatásait Dr. Pál Gábor OTKA NK 100769 projekt támogatja. Munkáját az elmúlt egy évben az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósuló TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt Apáczai Csere János doktoranduszi ösztöndíjjal támogatta.



Dr. Beinrohr László a MTA TTK tudományos munkatársa. Doktori munkája során meghatározta a humán C1-inhibitor röntgenszerkezetét, amivel a világon először magyarázta meg az örökletes angioödéma (HAE) betegség atomi hátterét [1]. Doktori dolgozatát a Qualitas Biologica Alapítvány díjazta. Kutatásaiért számos konferencián részesült elismerésben, és megkapta az Akadémiai Ifjúsági Díjat és a Bio-Science Díjat. Kutatásait Prof. Závodszy Péter és Dr. Gál Péter biofizikai kutatólaboratóriumában végzi. A laboratórium egyik szakterülete a vérben található proteolitikus kaszkádrendszerek tanulmányozása a rekombináns géntechnológia és szerkezeti biokémia eszközeivel. A laboratórium kutatásait Prof. Závodszy Péter és Dr. Gál Péter által vezetett OTKA NK 100834 és 108642 projektek támogatják.

**2013. ÉVBEN MEGJELENT
KIEMELKEDŐ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA**

Abrusán G., Szilágyi A., Zhang Y., Papp B. (2013) Turning gold into 'junk': transposable elements utilize central proteins of cellular networks. *Nucl. Acids Res.* 41:3190-3200. IF: 8,278

Antonioli L., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G. (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer* 13:842-857. IF: 35,000

Baloban M., Vanstraelen M., Tarayre S., Reuzeau C., Cultrone A., Mergaert P., Kondorosi É. (2013) Complementary and dose-dependent action of AtCCS52A isoforms in endoreduplication and plant size control. *New Phytol.* 198:1049-1059. IF: 6,736

Balogh G., Péter M., Glatz A., Gombos I., Török Z., Horváth I., Harwood J.L., Vígh L. (2013) Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Lett.* 587:1970-1980. IF: 3,582

Barabás O., Németh V., Bodor A., Perczel A., Rosta E., Kele Z., Zagyva I., Szabadka Z., Grolmusz V.I., Wilmanns M., Vértessy B.G. (2013) Catalytic mechanism of α -phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, ^{31}P -NMR spectroscopy and reaction path modelling. *Nucl. Acids Res.* 41(22):10542-55. IF: 8,278

Boratkó A., Csontos C. (2013) NHERF2 is crucial in ERM phosphorylation in pulmonary endothelial cells. *Cell Commun. Signal.* 11(99):1-10. IF: 5,093

Boratkó A., Gergely P., Csontos Cs. (2013) RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners. *Cell Commun. Signal.* 11(2):1-14. IF: 5,093

Bozoky B., Savchenko A., Csermely P., Korcsmaros T., Dul Z., Ponten F., Szekely L., Klein G. (2013) Novel signatures of cancer associated fibroblasts. *Int. J. Cancer* 133:286-293. IF: 6,198

Buljan M., Chalancon G., Dunker A.K., Bateman A., Balaji S., Fuxreiter M., Babu M.M. (2013) Alternative splicing of intrinsically disordered regions and rewiring of protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23:443-50. IF: 8,738

Bürkle A., Virág L. (2013) Poly(ADP-ribose) paradigms and paradoxes. *Mol. Aspects Med.* 34:1046-1065. IF: 10,375

Cantó C., Sauve A.A., Bai P. (2013) Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Mol. Aspects Med.* 34(6):1168-1201. IF: 10,375

Cilia E., Pancsa R., Tompa P., Lenaerts T., Vranken W.F. (2013) From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nat. Commun.* 4:2741. IF: 10,015

Cuaranta-Monroy I., Nagy L., (2013) PPAR γ needs a helping hand to make fat. *Cell Death Differ.* 20:1599-1600. IF: 8,71

Csermely P., Korcsmáros T., Kiss H.J.M., London G., Nussinov R. (2013) Structure and dynamics of biological networks: a novel paradigm of drug discovery. A comprehensive review. *Pharmacol. Therap.* 138:333-408. IF: 7,793

Csóka B., Koscsó B., Törő G., Kókai E., Virág L., Németh Z.H., Pacher P., Bai P., Haskó Gy. (2013) A2B adenosine receptors prevent adipose tissue inflammation and insulin resistance by maintaining alternative macrophage activation. *Diabetes* 63(3):850-66. IF: 7,895

Dobolyi A., Ostergaard E., Bagó A.G., Doczi J., Palkovits M., Gál A., Molnár M.J., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. (2013) Exclusive neuronal expression of SUCLA2 in the human brain. *Brain Struct. Funct.* ISSN: 1863-2653. IF: 7,837

Girija U.V., Gingras A.R., Marshall J.E., Panchal R., Sheikh M.A., Gál P., Schwaeble W.J., Mitchell D.A., Moody P.C.E., Wallis R. (2013) Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:13916-13920. IF: 9,737

Gógl G., Törő I., Reményi A. (2013) Protein-peptide complex crystallization: a case study on the ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(3):486-9. IF: 14,103

Gráczer É., Lionne C., Závodszky P., Chaloin L., Vas M. (2013) Transient kinetic studies reveal isomerization steps along the kinetic pathway of *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase. *FEBS J.* 280:1764-1772. IF: 4,250

Gyimesi M., Pires R. H., Billington N., Sarlós K., Kocsis Z.S., Módos K., Kellermayer M.S., Kovács M. (2013) Visualization of human Bloom's syndrome helicase molecules bound to homologous recombination intermediates. *FASEB J.* 27:4954-64. IF: 5,704

Gyongyosi A., Szatmari I., Pap A., Dezsó B., Pos Z., Szeles L., Varga T., Nagy L. (2013) RDH10, RALDH2 and CRABP2 are required components of PPAR γ -directed all-trans-retinoic acid synthesis and signaling in human dendritic cells. *J. Lipid Res.* 54(9):2458-2474. IF: 5,559

Gyurko D.M., Veres D.V., Módos D., Lenti K., Korcsmáros T., Csermely P. (2013) Adaptation and learning of molecular networks as a description of cancer development at the systems-level: Potential use in anti-cancer therapies. *Semin. Cancer Biol.* 23:262-269. IF: 7,436

Harami G.M., Gyimesi M., Kovács M. (2013) From keys to bulldozers: expanding roles for winged helix domains in nucleic acid-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 38:364-71. IF: 13,076

Hegedus K., Takáts S., Kovács A.L., Juhász G. (2013) Evolutionarily conserved role and physiological relevance of a STX17/Syx17 (syntaxin 17)-containing SNARE complex in autophagosome fusion with endosomes and lysosomes. *Review. Autophagy* 9(10). IF:12,042

Herbert C, Schieborr U, Saxena K, Juraszek J, De Smet F, Alcouffe C, Bianciotto M, Saladino G, Sibrac D, Kudlinzki D, Sreeramulu S, Brown A, Rigon P, Herault JP, Lassalle G, Blundell TL, Rousseau F, Gils A, Schymkowitz J, Tompa P, Herbert JM, Carmeliet P, Gervasio FL, Schwalbe H, Bono F. (2013) Molecular mechanism of SSR128129E, an extracellularly acting, small-molecule, allosteric inhibitor of FGF receptor signaling. *Cancer Cell*, 23(4):489-501 (2013) IF: 24,755

Kaarniranta K., Sinha D., Blasiak J., Kauppinen A., Veréb Z., Salminen A., Boulton M.E., Petrovski G. (2013) Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy* 9(7):973-984. IF: 12,042

Kerényi F., Wawer I., Sikorski P.J., Kufel J., Silhavy D. (2013) Phosphorylation of the N- and C-terminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay (NMD). *Plant J.* 76(5):836-48. IF. 6,582

Kiss A., Bécsi B., Kolozsvári B., Komáromi I., Kövér E.K., Erdődi F. (2013) Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS J.* 280:612-626. IF: 4,250

Kiss G., Konrad C., Doczi J., Starkov A.A., Kawamata H., Manfredi G., Zhang S.F., Gibson G.E., Beal M.F., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. (2013) The negative impact of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J.* 27(6):2392-2406. IF: 5,704

Kiss G.N., Lee S.C., Fells J.I., Liu J., Valentine W.J., Fujiwara Y., Thompson K.E., Yates C.R., Sümegi B., Tigyi G. (2013) Mitigation of radiation injury by selective stimulation of the LPA(2) receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831(1):117-25. IF: 5,269

Kiss M., Czimmerer Z., Nagy L. (2013) The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function - from physiology to pathology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132:264-286. IF: 12,047

Kondorosi É., Mergaert P., Kereszt A. (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:611-628. IF: 12,900

Korcsmaros T., Dunai Z.A., Vellai T., Csermely P. (2013). Teaching the bioinformatics of signaling networks - an integrated approach to facilitate multidisciplinary learning. *Brief. Bioinform.* 14:618-632. IF: 5,298

Kozma D., Simon I., Tusnády G.E. (2013) PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years. *Nucl. Acids Res.* 41:D524-9. IF: 8,278

Kubisch J., Türei D., Földvári-Nagy L., Dunai Z.A., Zsákai L., Varga M., Vellai T., Csermely P., Korcsmáros T. (2013) Complex regulation of autophagy in cancer – integrated approaches to discover the networks that hold a double-edged sword. *Semin. Cancer Biol.* 23:252-261. IF: 7,436

Kulcsár G., Gaál D., Kulcsár P.I., Schulcz Á., Czömpöly T. (2013) A mixture of amino acids and other small molecules present in the serum suppresses the growth of murine and human tumors in vivo. *Int. J. Cancer* 132:1213-1221. IF: 6,198

Lázár V., Singh G.P., Spohn R., Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R., Bogos B., Méhi O., Csörgő B., Pósfai G., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Papp B., Pál Cs. (2013) Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. (2013) Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol. Syst. Biol.* 9:700 IF: 11,340

Leveles I., Németh V., Szabó J.E., Harmat V., Nyíri K., Bendes Á.Á., Papp-Kádár V., Zagyva I., Róna G., Ozohanics O., Vékey K., Tóth J., Vértessy B.G. (2013) Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(12):2298-308. IF: 14,103

Maksay G. (2013) Asymmetric perturbations of pLGICs: action! *Trends Pharmacol. Sci.* 34:299-300. IF: 10,148

Masoudi N, Fancsalszky L, Pourkarimi E, Vellai T, Alexa A, Reményi A, Gartner A, Mehta A, Takács-Vellai K. (2013) The NM23-H1/H2 homolog NDK-1 is required for full activation of Ras signaling in *C. elegans*. *Development* 140(16):3486-95. IF: 6,200

Medzihradzky M., Bindics J., Ádám É., Viczián A., Klement É., Lorrain S., Gyula P., Mérai Z., Fankhauser C., Medzihradzky K.F., Kunkel T., Schafer E., Nagy F. (2013) Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25:535-544. IF: 9,251

Mérai Z., Benkovics A.H., Nyikó T., Debreczeny M., Hiripi L., Kerényi Z., Kondorosi É., Silhavy D. (2013) The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *Plant J.* 73:50-62. IF: 6,582

Molnár T., Vörös J., Szeder B., Takáts K., Kardos J., Katona G., Gráf L. (2013) Comparison of complexes formed by a crustacean and a vertebrate trypsin with bovine pancreatic trypsin inhibitor – the key to achieving extreme stability? *FEBS J.* 280(22):5750-63. IF: 4,250

Nagy G.N., Marton L., Krámos B., Oláh J., Révész Á., Vékey K., Delsuc F., Hunyadi-Gulyás É., Medzihradszky K.F., Lavigne M., Vial H., Cerdan R., Vértessy B.G. (2013) Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 280(13):3132-48. IF: 4,250

Nagy L. (2013) Nuclear hormone receptors are powerful regulators of stem cell maintenance, differentiation, metabolism and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24(10-12):669. IF: 6,202

Nagy P., Hegedus K., Piracs K., Varga A., Juhász G. (2013) Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 588(3):408-13. IF: 3,582

Nguyen M.T., Csermely P., Sóti C. (2013) Hsp90 chaperones PPAR γ and regulates differentiation and survival of 3T3-L1 adipocytes. *Cell Death Differ.* 20:1654-1663. IF: 8,371

Nussinov R., Ma B., Tsai C.-J., Csermely P. (2013) Allosteric conformational barcodes direct signaling in the cell. *Structure* 21:1509-1521. IF: 6,000

Nyikó T., Kerényi F., Szabadkai L., Benkovics H.A., Major P., Sonkoly B., Mérai Z., Barta E., Niemiec E., Kufel J., Silhavy D. (2013) Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucl. Acids Res.* 41(13):6715-28. IF: 8,278

Oates M.E., Romero P., Ishida T., Ghalwash M., Mizianty M.J., Xue B., Dosztányi Z., Uversky V.N., Obradovic Z., Kurgan L., Dunker A.K., Gough J. (2013) D²P²:database of disordered protein predictions. *Nucl. Acids Res.* 41(Database issue):D508-516. IF: 8,278

Pomozi V., Le Saux O., Brampton C.N., Apana A., Iliás A., Szeri F., Martin L., Monostory K., Paku S., Sarkadi B., Szakács G., Váradi A. (2013) ABCC6 is a basolateral plasma membrane protein. *Circ. Res.* 112(11):e148-51. IF: 11,861

Rigo G., Ayaydin F., Tietz O., Zsigmond L., Kovacs H., Pay A., Salchert K., Darula Z., Medzihradszky K.F., Szabados L., Palme K., Koncz C., Cseplo A. (2013) Inactivation of Plasma Membrane-Localized CDPK-RELATED KINASE5 Decelerates PIN2 Exocytosis and Root Gravitropic Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25:1592-1608. IF: 9,251

Róna G., Marfori M., Borsos M., Scheer I., Takács E., Tóth J., Babos F., Magyar A., Erdei A., Bozóky Z., Buday L., Kobe B., Vértessy B.G. (2013) Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69(Pt12):2495-505. IF: 14,103

Rovó P., Stráner P., Láng A., Bartha I., Huszár K., Nyitray L., Perczel A. (2013) Structural insights into the trp-cage folding intermediate formation. *Chemistry* 19(8):2628-40. IF: 5,831

Schad E., Kalmar L., Tompa P. (2013) Exon-phase symmetry and intrinsic structural disorder promote modular evolution in the human genome. *Nucl. Acids Res.* 41(8):4409-22. IF: 8,278

Simandi Z., Cuaranta-Monroy I., Nagy L. (2013) Nuclear receptors as regulators of stem cell and cancer stem cell metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24(10-12):716-723. IF: 6,202

Sinharoy S., Torres-Jerez I., Bandyopadhyay K., Kereszt A., Pislariu C.I., Nakashima J., Benedito V.A., Kondorosi É., Udvardi M.K. (2013) The C2H2 Transcription Factor Regulator of Symbiosome Differentiation Represses Transcription of the Secretory Pathway Gene *VAMP721a* and Promotes Symbiosome Development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 25:3584-3601. IF: 9,251

Szénási T., Kénesi E., Nagy A., Molnár A., Bálint B.L., Zvara A., Csabai Z., Deák F., Boros Oláh B., Mátés L., Nagy L., Puskás G.L., Kiss I., (2013) Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene promoter by Sox9 and L-Sox5/Sox6 in early steps of chondrogenesis *Biochim. Biophys. Acta* 1829:1075-1091. IF: 5,456

Szlama G., Trexler M., Patthy L. (2013) Latent myostatin has significant activity and this activity is controlled more efficiently by WFIKKN1 than by WFIKKN2. *FEBS J.* 280:3822-3839. IF: 4,250

Takáts S., Nagy P., Varga Á., Piracs K., Kárpáti M., Varga K., Kovács A.L., Hegedus K., Juhász G. (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 201(4):531-9. IF: 10,822

Timár C.I., Lorincz A.M., Csépanyi-Kömi R., Vályi-Nagy A., Nagy G., Buzás E.I., Iványi Z., Kittel A., Powell D.W., McLeish K.R., Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood.* 121(3):510-8. IF: 9,898

Touati-Jallabe Y., Bojnik E., Legrand B., Mauchauffée E., Chung N.N., Schiller P.W., Benyhe S., Averlant-Petit M.C., Martinez J., Hernandez J.F. (2013) Cyclic enkephalins with a diversely substituted guanidine bridge or a thiourea bridge: Synthesis, biological and structural evaluations. *J. Med. Chem.* 56:5964-5973. IF: 5,614

Uitto J., Váradi A., Bercovitch L., Terry P.F., Terry S.F. (2013) Pseudoxanthoma elasticum: progress in research toward treatment: summary of the 2012 PXE international research meeting. *J. Invest. Dermatol.* 133(6):1444-9. IF: 6,193

Varga T., Mounier R., Gogolak P., Poliska S., Chazaud B., Nagy L. (2013) Tissue LyC6- macrophages are generated in the absence of circulating LyC6- monocytes and Nur77 in a model of muscle regeneration. *J. Immunol.* 191:5695-5701. IF: 5,520

Végner L., Peragovics A., Tombor L., Jelinek B., Czobor P., Bender A., Simon Z., Málnási-Csizmadia A. (2013) Experimental confirmation of new drug-target interactions predicted by drug profile matching. *J. Med. Chem.* 56(21):8377-88. IF: 5,614

Venkatraman Girija U., Gingras A.R., Marshall J.E., Panchal R., Sheikh M.A., Gál P., Schwaeble W.J., Mitchell D.A., Moody P.C., Wallis R. (2013) Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:13916-13920. IF: 9,737

Vieira-Pires R.S., Szollosi A., Morais-Cabral J.H. (2013) The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* 496:323-9. IF: 38,597

Virág L., Robaszkiewicz A., Rodriguez-Vargas J.M., Oliver F.J. (2013) Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol. Aspects Med.* 34:1153-1167. IF: 10,375

Virág L. (2013) 50 Years of poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol. Aspects Med.* 34:1043-1045. IF: 10,375

Winter E., Lecerf-Schmidt F., Gozzi G., Peres B., Lightbody M., Gauthier C., Ozvegy-Laczka C., Szakacs G., Sarkadi B., Creczynski-Pasa T.B., Boumendjel A., Di Pietro A. (2013) Structure-Activity Relationships of Chromone Derivatives toward the Mechanism of Interaction with and Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2. *J. Med. Chem.* 56(24):9849-60. IF: 5,614

Xu S., Bai P., Little P., Liu P. (2013) Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Atherosclerosis: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Med. Res. Rev.* IF: 9,583

STRAUB F. BRUNÓ
(1994-1996)

Száz éve született a magyar biokémia történetének - Szent-Györgyi után – legnagyobb egyénisége, Straub F. Brunó. Pályám kezdetén évekig szorosán vele dolgoztam, és évtizedeken át volt intézeti főnököm, tehát úgy érzem, autentikus tanúként emlékezhetek rá. Azzal kezdeném, hogy amikor 1965-ben az NIH-be indultam, egy későbbi Nobel-díjas (C.B. Anfinsen) laboratóriumába, kedves idősebb kollegám, Garzó Tamás azzal búcsúztatott, hogy „...az USA-ban nyilván sok híres tudóssal fogsz találkozni, de a Profhoz hasonlítható nagy egyéniséggel valószínűleg nem”. Ez a jövendölése teljesen igazolódott, valóban egész későbbi pályám során kevés igazán nagy embert ismertem meg, de ő kétség kívül ezek egyike volt. Mivel szerencsétlen korban élt és alkotott, tudományos életműve csonka maradt, nem tükrözi igazán zsenialitását, bár természetesen így is nagyon jelentős.

Hiszen alig huszonöt évesen már világszerte elismert kutatója az oxidáció biokémiájának, nevéhez fűződik az almasavdehidrogenáz és a tejsavdehidrogenáz tisztítása és jellemzése, a Straub-diaforáz felfedezése. Huszonhét éves korában fedezi fel az aktint, amivel biztosítja örökös helyét a tudomány történetében. Igen fiatalon (31 éves korában) lesz tanszékvezető professzor (előbb Szegeden, majd Budapesten), és nem sokkal később (34 éves korában) akadémikus. Pályája második felében már elsősorban oktató és mester, biokémikusok nemzedékeinek nevelője, bár még ekkor is fűződnek a nevéhez jelentős eredmények (egy új ATP meghatározási módszer, az ATP mint az aktin kofaktora, az ATP szerepének felismerése a vörösvértetek permeabilitásában, a fluktuációs fit elméletének első felvetése, a protein-diszulfid izomeráz felfedezése stb.).

1956 után, a vasfüggöny részleges felemelkedésével azok a nyugat európai biokémikusok, akik először látogatnak Magyarországra (Work, Campbell, Pollock, Sanger, Lynen stb.) elsősorban őt keresik fel, vele akarnak eszmét cserélni. A szomszéd országok számos fiatal kutatója (Rychlik, Keil, Grünberger, Daskocil, Hadjiolov, Osztrowszki, Venksztern, Krause stb.) az ő intézetében töltött heteknek, hónapoknak köszönheti későbbi sikeres pályáját. Tíz egykori munkatársa, tanítványa lett az MTA tagja, hárman a külföldre szakadtak közül az MTA külső tagjai.

Kiváló tankönyvei (Általános és Szervetlen Kémia, Szerves Kémia, Biokémia)

és legendásan érdekesítő, színes előadásai orvostanhallgatók nemzedékeit nevelték fel. Ő vezette be egyetemünkön elsőként a feleletválasztásos írásbeli vizsgáztatást. Tudománypolitikusként neki köszönhető az Akadémián az önálló Biológiai Osztály létrehozása, és mindenekelőtt a Szegedi Biológiai Kutatóközpont megalapítása. Azt a lépését, hogy élete alkonyán (1988-89) elvállalta az Elnöki Tanács elnökségét, sokan vitatták, de nem tagadható, hogy ennek külföldön igen jó visszhangja volt, és nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a rendszerváltó országok között hazánknak volt ekkoriban a legjobb reputációja a nyugati világban.

Életművének ez a (nagyon vázlatos és hiányos) áttekintése természetesen távolról sem képes megmutatni személyiségének, egyéniségének súlyát és erejét, amelyre utaltam a bevezető sorokban. Noha mint olyan embernek, aki élete nagy részében jelentős hatalommal rendelkezett, nyilván voltak ellenfelei és haragosai, mindazok, akik abban a szerencsében részesültek, hogy intézetében dolgozhattak, végtelenül tisztelték és többnyire rajongva szerették is. Bár távolságtartó volt, még idősebb munkatársaival sem tegeződött (és soha nem használta a „csendőrpertut”), mégis tudott nagyon szeretetre méltó lenni egy-egy váratlan, kedvesen humoros megjegyzéssel vagy gesztussal. Lenyűgöző autoritásával soha nem élt vissza, nemhogy eltűrte, egyenesen bátorította az ellentmondást, sőt a szemtelenséget is. Munkatársaiban a legtöbbre az önálló gondolkodást becsülte. Elképesztő volt a lényegmegragadó képessége, amivel első pillanatban felismerte egy cikkben a logikai, sőt a sajtóhibákat is, ahogy rátapintott egy előadás gyenge pontjaira. Senkit nem ismertem, aki olyan efficiensen tudott levezetni egy ülést, mint ő. Gyűlölte az üres fecsegést, a mellébeszélést, de értelmes vitára mindig készen állt. Nagy ember volt, nagyon



hiányzik a jelenléte. Természetesen mindannyiunknak, akik munkatársai, tanítványai voltak, szívünkben és elménkben ma is él és hat. A fiatalabb biokémikus-generáció számára azonban ez nyilván nincs így. Ezért fontos, hogy emlékezzünk rá.

Ezt szolgálja az a dombormű, amely halála után az SzBK előcsarnokában került felavatásra és még inkább a szegedi Dóm-tér árkádjai alatt a Nemzeti Pantheonban idén február 5.-én leleplezett életnagyságúnál nagyobb mellszobra.

(fotó: Börcsök Szilveszterné, SZBK)

Venetianer Pál
Az MTA rendes tagja
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

A FELFEDEZÉS BOLDOGSÁGA¹

A *Magyar Nemzet* 1984. március 4-i számában hosszú cikk jelent meg a hetvenéves Straub F. Brunóról [1]. A Kristóf Attila által rögzített interjúban Straub F. Brunó megindító őszinteséggel vallott pályájáról, pályájának örömeiről és csalódásairól. Az interjúból egyértelműen kirajzolódik egy olyan ember értékrendje, aki a tudományos kutatást izgalmas szellemi foglalkozásként fogja fel, melynek legfőbb jutalma a megismerés, a felfedezés szellemi öröme. „...a figyelmemet lekötni a középiskolában csak egy ember tudta igazán, a matematika-tanárunk, aki egy-egy tételt látható örömmel vezetett le, jóérzése, öröme oly nyilvánvaló volt, hogy mindig együtt örültem vele [...] Aztán az egyetemen találkoztam Szent-Györgyi Alberttel, aki minden előadásában óriási örömmel élte át újra tudományos igazságait, s ily módon engem is bevont ebbe az örömbé [...] így kerültem azok közé, akik tudják, hogy a legnagyobb jóérzést az okozza, ha egy nem értett dolgot megért az ember. Ez nem azt a parlagi örömet jelenti, hogy lám, milyen okos vagyok én, hanem a felismerés boldogságát, amikor tulajdonképpen egy új világ tárul föl előttünk, ez érzelmileg nagyon nagy dolog.”

A „milyen okos vagyok én” örömét sem ítélte el, sőt nagyon fontosnak tartotta a tudomány előrehaladása szempontjából. „Ezt a hiúságot mindenki lenézi, én is, de azt kell mondanom mégis: hatalmas hajtóerő a tudományos kutatásban és bármi alkotó munkában. [...] El kell fogadnunk, azzal a megköttéssel, hogy a hiúság addig egészséges, amíg előbbre visz, amíg az ember nem hajlik arra, hogy a múlt eredményeivel hivalkodjon...”

Straub F. Brunónak pályája első két évtizedében bőségesen része volt mindabból a sikerből és elismerésből, melyet a kutató munka nyújthat: „...Szent-Györgyi... büszke volt arra, hogy személyemben sikerült egy elismert tanítványt kinevelnie... Ez volt hát a hőskor, amikor sok jutott nekem abból az örömből, amelyet egykori matematika tanárom révén ismertem meg...”

Némi keserűség érződik ki szavaiból, amikor arról beszél, hogy a történelem menete belesodorta a politikába, a tudománypolitikába, a tudományszervezésbe.

1 Megjelent a *Magyar Tudomány* 2014/1 számának 7-9 oldalán. Kiadó: Korrektor Nyomdai Kft., felelős vezető: Póth Gábor (a szerkesztőbizottság megjegyzése).

Bár büszke arra, hogy ő hozta létre a Szegedi Biológiai Központot, úgy érzi, hogy túl nagy árat fizetett pályájának ezen fordulataért: *„amit fiatalkorom örömeiről, boldogságérzéseiről mondtam, tehát a megértés, megismerés és felfedezés örömeiről, az eltűnt. Megszűnt. Hosszú idő óta nincs részem benne. Jött helyébe az, hogy a tanítványaim csinálnak valamit, hogy a fiataloknak segíteni tudok. [...] Ez más. Egészen más [...] panaszkodjak a történelemre, hogy miközben a magyar biokémia létrejött én elvesztem?”*

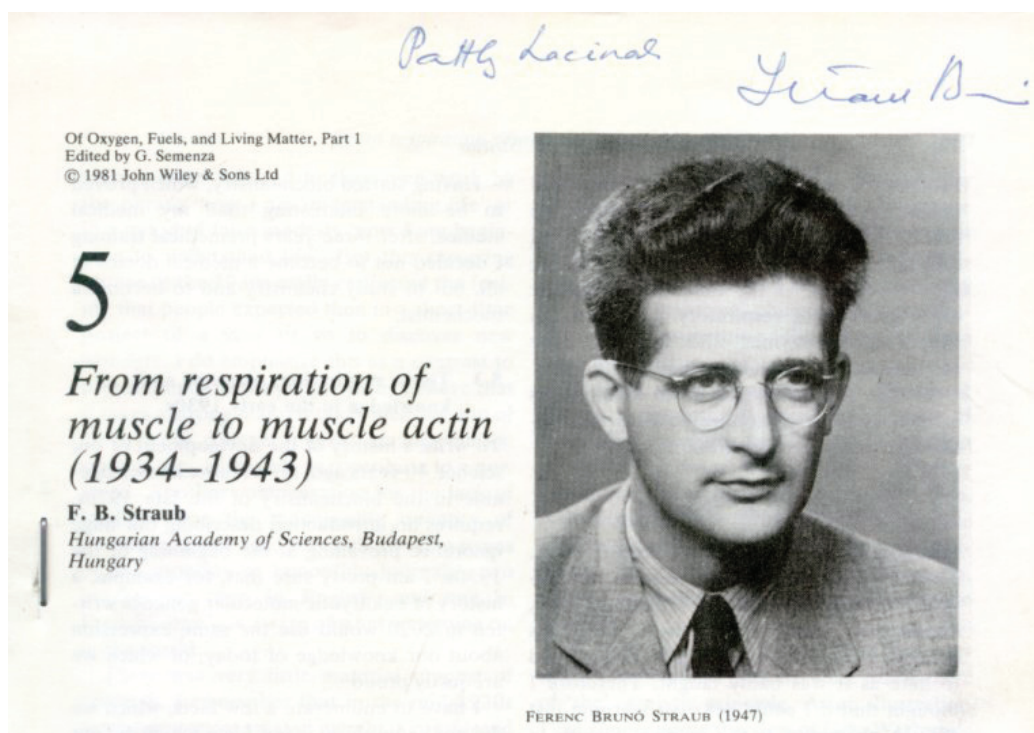
Amikor 1967 szeptemberében felvételt nyertem az MTA Karolina úti Biokémiai Intézetébe (aleendő SZBK, a Szegedi Biológia Központ alkalmazottjaként) az intézet igazgatója, Straub professzor energiája jelentős részét tudományszervezésre, az SZBK létrehozására fordította. Bár közvetlen szakmai irányításomban nem vett részt mégis meghatározó szerepet játszott pályám alakulásában.

1967 és 1972 között tényleges munkahelyem sokszor változott, először a Semmelweis Orvostudományi Egyetem (ugyancsak Straub F. Brunó által irányított) Orvosvegytani Intézetében, majd a Karolina úti intézetben, majd – az SZBK első blokkjának elkészülte után – Szegeden dolgoztam. Ez a többszöri költözéssel terhelt periódus nem nagyon kedvezett a kutatómunkának, talán kutatási témám sem volt a legszerencsésebb. Részben ennek rovására írom azt, hogy pályám első öt éve nem szerzett annyi örömet (érdekes, visszhangot kiváltó eredményt), mint amennyit a kutatópályától reméltem. Talán ezt látva, 1972-ben Straub professzor kezdeményezte, hogy posztdoktorként menjek ki dolgozni a UCLA (University of California, Los Angeles) Biológiai Kémia Intézetébe, Emil L. Smith laboratóriumába. Kezdeményezése különösen azért volt számomra megtisztelő (és töltött el némi szorongással), mert a fogadó laboratórium a fehérjekémiai kutatások vezető laboratóriumának számított, Smith professzor pedig Straub F. Brunó személyes jóbarátja volt abból az időből, amikor a háború előtt mindketten Cambridge-ben dolgoztak. Szerencsére az itt eltöltött két év alatt nem vallottam szégyent, és részem lehetett a tudományos felfedezések örömeiben, és abban az örömben, hogy munkám során általános érdeklődésre számot tartó kérdéseket vizsgálhattam, és eredményeim jelentős visszhangot kaptak. Ezt az örömteli periódust Straub professzornak köszönhettem.

A posztdoktori munka során szerzett fehérjetudományi ismeretek jobb hasznosítása érdekében Straub professzor kezdeményezte, hogy hazatérésem után munkámat a fehérjekutatások számára jobb feltételeket biztosító budapesti Enzimológiai Intézetben folytathassam. Megelőlegezett nekem annyi bizalmat,

hogy önállóan kezdhettek dolgozni. Egyszemélyes csoportom kezdetben a posztdoktori munkám során általam kidolgozott technikákat alkalmazta fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatára, közben azonban igyekeztem olyan új területet találni, mely jelentősebb kihívást jelent (és így több örömet hozhat). 1977-ben úgy döntöttem, hogy a fibrinolitikus proteázok (plazminogén, szöveti típusú plazminogén aktivátor) szerkezet-funkció összefüggéseit tanulmányozom. Ennek a kutatási témának a fontossága nyilvánvaló volt (vö. trombózis, stroke, infarktus), ugyanakkor szinte ismeretlen területnek számított, mert ekkor még szinte semmit nem tudtunk ezeknek a fehérjéknek a szerkezetéről és funkciójuk szerkezeti alapjairól. Megint csak Straub professzor megelőzött bizalmának köszönhettem, hogy belevághattam ebbe az ambíciózus projektbe, elősegítette, hogy megalakulhasson a tervek megvalósítására alkalmas méretű Fibrinolízis-csoport. Kezdetét vehette egy olyan, több mint tízéves periódus, amely a legtöbb tudományos meglepetést és szellemi örömet hozta számomra.

Visszatekintve: a fehérjekutatások területén Straub professzor indított el azáltal, hogy tanácsára és támogatásával ennek a területnek a műveléséhez szükséges ismereteket és gyakorlatot az egyik legkiválóbb külföldi fehérjekémiai laboratóriumban sajátíthattam el. Fehérje-kutatásaim folytatását itthon is lehetővé tette, munkámat mindig figyelemmel kísérte, kritikai észrevételeivel segítette, így nagyrészt neki köszönhetem mindazt az örömet, amit ez a munka számomra nyújtott. Büszke vagyok arra, hogy a nevét viselő díjat, a Straub-plakettet, 1986-ban nekem ítelték.



Bár eredményeim meg sem közelítik az ő eredményeit, mégis azt hiszem: sikereink a saját fiatalkorát, tudományos sikereinek emlékét idézték fel benne. Talán ez indította arra, hogy dedikálja nekem azt a cikket (lásd ábra), mely az ő tudománytörténeti jelentőségű munkáit ismerteti [2].

Hivatkozások

- [1] Kristóf, A. (1984): A boldogságkeresés technikái. A fordulat. Beszélgetés Straub F. Brunóval. *Magyar Nemzet*. március 4.
- [2] Straub, F. B. (1981): From Respiration of Muscle to Muscle Actin (1934–1943). In: Semenza, G. (ed.): *Of Oxygen, Fuels and Living Matter*, Part I. (*Evolving Life Science Series*, Volume 1) John Wiley & Sons Ltd., pp. 325–344.

Patthy László
az MTA rendes tagja
MTA TTK Enzimológiai Intézet
patthy@enzim.hu

STRAUB F. BRUNÓ KÉT ÉVTIZEDE A PUSKIN UTCÁBAN

Straub F. Brunó születésének századik évfordulójáról különböző módon és fórumokon emlékezünk meg. A megemlékezések egyik visszatérő motívuma, hogy bár jelentős személyiségek sokasága számára sok okból Straub volt a „Prof”, mégis számos méltatásból kimarad, hogy hol volt az Egyetem. Furcsa módon a Straubról megjelent különböző életrajzi írások, nekrológok egy jelentős részében nem szerepel, vagy csak megemlítődik az a több mint húsz év, amit „főállásban” a budapesti orvoskar professzoraként töltött el. Az SzBK-ban 1994-ben rendezett nyolcvanadik születésnap ünnepségén a „Puskin utca” szöszszetétel, a budapesti medikusok „vándorlásainak” egyik fő színtere egyedül **Hajdú János** előadásában hangozott el. A Puskin utcai tanteremben több ezer orvostanhallgató hallgatta évtizedekig Straub orvosi kémia előadásait. Ez az emlékező írás Straub F. Brunóról, az egyetemi emberről szól.

Magyarországon a professzori cím nagy becsben áll. Számos jeles kutató, vagy közéleti ember büszkélkedik professzori titulussal és szólítják „prof”-nak felsőoktatással általában közvetve kapcsolódó okokból megvalósult egyetemi tanári címe jogán. Straub F. Brunó azonban nemcsak névjegyén prof, hanem ízig vérig egyetemi ember volt, akinek nagy ívű professzori pályája elválaszthatatlan a budapesti orvoskartól. Straub ugyan kiváló előadó volt, de mindez kevés lett volna ahhoz, amit elért.

Élete teljében, 1948-ban hívta meg az akkori Pázmány Péter Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara a frissen létrehozandó Orvosi Vegytani Intézet élére Straub F. Brunót Szegedről. Az Orvosi Vegytani Intézet koncepciója Budapesten **Szent-Györgyi Albert** fejében fogant. Korabeli dokumentumok szerint 1945-ben ő javasolta létrehozását az Általános Orvostudományi Kar Tanácsában. Ma már nehezen kitalálható, hogy kit gondolt akkor Szent-Györgyi a leendő intézet igazgatójának. Feltehetően nem Straub F. Brunót, akire a szegedi intézetét hagyta, miután ő kinevezést nyert a Pázmány Péter Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara Biokémiai Intézetének élére. Az események mindenesetre sűrűn követték egymást és 1948-ra, miután a kiemelkedő, Pestre került Szent-Györgyi tanítványok közül „utolsóként” **Laki Kálmán** is elhagyta az országot, a Kar ott állt egy új intézetet létrehozó döntéssel, de igazgató és oktatók nélkül. Mindenképpen Szent-Györgyiben gondolkoztak és Straubot – több jelölt közül – azért választották, mert őt tekintették a Szent-Györgyi örökség leghitelesebb képviselőjének.

Straub emlékeit a Szent-Györgyi intézetben eltöltött pályakezdő diák- és kutató-éveiről a nyolcvanas évek végén volt módom meghallgatni, amikor a Semmelweis Ignác emlékelőadást tartotta az Egyetemen és ez volt az előadásának témája. Szent-Györgyi 1931-ben komoly nemzetközi kutatói múlttal ugyan, de fiatalon, egy politikai vezetői döntéssel kezdte meg szegedi pályafutását és gyakorlatilag egyedül érkezve hozott létre a semmiből egy virágzó, rengeteg tehetséges embert odavonzó intézetet egy nagyon „politikai” évtizedben. Nem igazán tűnik kockázatosnak leírni olyan mondatot, hogy a Nobel-díjas Szent-Györgyi sokban más volt, elütött kora átlagos professzorától. Szent-Györgyi másképpen öltözött, viselkedett, kommunikált és mindenekelőtt egy korától igencsak eltérő szellemiségű, összetételű és értékrendű intézetet alapított. Nem kétséges, hogy milyen intézet-ideál lebeghetett Straub F. Brunó fejében, amikor frissen érkezett munkatársai között, 34 évesen, „legöregebbként”, gyakorlatilag egyedül, egy-két minimális egyetemi tapasztalattal rendelkező oktató (**Bíró Endre, Feuer György, Wollemann Mária**) kivételével pályakezdőkkel, vagy egyetemi hallgatókkal nekivágott egy új intézet létrehozásának, egy új tantárgy oktatásának. Ő is egy nagyon „politikai” évtizedben tette ezt; a semmiből virágzó intézetet hozott létre rengeteg tehetséges ember odavonzásával. Megtehetette ő is, mert 1948-ban Straub már nemzetközileg jegyzett, beérkezett kutató volt, az aktív felfedezője, fiatal kora ellenére Kossuth-díjas akadémikus, befolyásos közéleti ember. A „fényes szelek” idején sem lehetett igazán máshonnan főnöke. Az alma mater szegedi intézethez hasonlóan a Straub intézet is sokban különbözött a kor átlagos intézeteitől; más volt a légköre, az értékrendje, szokásai.

Oktatásszervezőként Straub bevezette a kiscsoportos oktatást. Tananyagalkotóként 1951-re megírta az orvosi kémia két tankönyvét, majd később a magyar orvosegyetemi graduális képzésben egyébként hivatalosan nem alkalmazott „Biokémia” című tankönyvét. Az orvosi kémia tantárgy abban az időben a biokémia egy részét is jelentette, többek között a leíró biokémiát, az enzimológiát, a fehérje szerkezetet. A tananyagalkotásba, a gyakorlati tematika fejlesztésébe folyamatosan több munkatársát bevonta. Amellett, hogy a politikailag determinált izoláltság éveiben is a nemzetközi szintű kutatást tekintették mércének, az oktatás is egyértelmű prioritás volt az intézetében. A „ranglétrán” történő előrelépéshez mindkét területen teljesíteni kellett és ebben Straub F. Brunó személyes példával járt élen. Magasan kiemelkedő intellektusához igen előnyös tulajdonságok, remek orgánus, megnyerő és tekintélyt parancsoló fellépés, szuggesztivitás és humorérzék társult. A Straub-intézet meritokrácián alapult, de demokratikus meritokrácia volt, amennyiben fiatal munkatársaknak

is lehetőséget adott az érdemben szólásra. Ha a sors úgy hozta, Straub nem félt magán is nevetni („a Professor Úr után én gondolkozom a legkevesebbet az Intézetben” copyright **Mile Imre**), aktívan részt vett az ugratásokban, szigorúan magázódva, „követési” távolságot tartva tudott közvetlen lenni. Nagyon komolyan vette az oktatás szervezését, a legjobb előadókat engedte a tanterembe, ahol a saját professzori előadásait időnként két kezével bemutatott kísérletekkel színesítette. Mindez felkészülést igényelt és a hallgatóság ebből is úgy érezte, hogy fontos; ő a legfontosabb. A számonkérés igen komoly és szigorú volt. Nevéhez köthető a kezdettől vitatott, „felelet-válogató”, írásbeli vizsga bevezetése a magyar felsőoktatásban. Mindezt nem a vizsgáztatásra szánt idő és energia „spórolása” miatt tette; a döntést számos konfliktus vállalása, sok oktató bevonásával történő igényes szervező munka, a kérdésállomány folyamatos karbantartása, az új kérdések vitákban történő, rengeteg időt rabló kiválasztása, az egész vizsga körültekintően tervezett technikai lebonyolítása övezte; a „kérdés-pool” így valóban az intézet szellemi tulajdonává vált, ahol egy-egy kérdés intellektuális megalkotásához több személyes történet fűződött.

A szakma közösség teremtő erőként működött a Straub-intézetben munkabeszámolók és cikkviták, oktatási megbeszélések és más, pezsgő, kulturális viták révén. Nagyon kompetitív, kritikus, produktív közélet teremtődött, rendezvények, sportmérkőzések sokaságával. Összességében az orvostanhallgatók nem szerették a kémiát, de szerették „a Straubot” és tisztelték az intézetet.

Időről időre szakmai, személyi okokból (**Bíró Endre** megalapította az ELTE Biokémiai Intézetét, **Gárdos György** az Országos Vérellátó Intézet membránbiológiai laboratóriumát stb.), történelmi sorsfordulók kapcsán (az 1956-ban, vagy azután távozók közül talán **Ács György** – **Fritz Lippmann** laboratóriuma, majd Mount Sinai Medical School igazgató biokémia professzora -, és **Ullmann Ágnes** – **Jacques Monod** laboratóriuma, Pasteur Intézet igazgatóhelyettese – futotta be a legnagyobb karriert) az Intézet komoly veszteségeket szenvedett. De a folyamatosan érkező, kiváló, és esélyt kapva beilleszkedő, fiatal utánpótlás egyenletesen magas színvonalat biztosított. 1954-ig hol *de jure*, hol *de facto* Straub F. Brunó vezette az Egyetemen a szomszéd Biokémiai Intézetet is, illetve az MTA Karolina úti Biokémiai Intézetét. Ez folyamatos, a Karolina úttal 1970-ig eltartó „átjárást” eredményezett és utólag lehetetlen (az 1948 és 1956 közötti periódusról elérhető írásos dokumentum sincsen az Egyetemen) mindazokat felsorolni, akik hivatalosan, vagy csak ténylegesen a Puskin utcában dolgoztak,

vagy éppen ott voltak MTA statusban. **Korányiné Ellike**, a Szent-Györgyi után is itt maradt lelkiismeretes könyvtáros pontosan nyilvántartotta a közleményeket, de a Straub intézet legnagyobb értéke a jelentős mértékben az Igazgatótól érkező inspiráció, impulzus volt, amely az ott dolgozókat folyamatosan motiválta, és amely döntő szerepet játszott kutatói énjük kialakulásában, fejlődésükben. Rendkívül különböző karakterű, gondolkodású és sok helyütt, sokféle szakmai pályát befutott emberek kaptak életre szóló útmutatást, lendületet, gondolatvilágot, vagy szakmai értékrendet az intézetben. Túlnyomó többségük úgy tekint vissza a Puskin utcára, mint a fiatalkori boldogság és formálódás színterére. Mindennek középpontjában Straub F. Brunó személyisége állt. Emellett ugyanakkor – számos akkori orvosegyetemi intézettől eltérően - önálló munkacsoportok jöhettek létre, „több személyes” intézet alakult ki. A munkacsoportok publikációinál – szintén nem követve bizonyos „hagyományokat” - a szerzői lista végén a csoport vezetője és nem az igazgató szerepelt, sőt az igazgató neve többnyire nem is jelent meg a társszerzők között, kivéve természetesen azokat a munkákat, amelyekben közvetlenül, vagy közvetve részt vett.

A hatvanas években a Mici Mackó karaktereit osztották ki egymásnak az Intézet tagjai. Straub Róbert Gida lett – az Intézetbe Róbert Gidaként érkezett és úgy is távozott. Straub az SzBK létrehozását tekintette legfontosabb életművének; sokéves, sokrétű és bonyolult erőfeszítéseinek eredményeképpen az megépült, de őt választásra kényszerítette. Ennyi évtized elteltével, számos történet, interpretáció és spekuláció ismeretében nehezen rekonstruálható (ha egyáltalán), hogy a múlt század hatvanas éveinek végén ki mit akart, illetve ki mit akarhatott. A személyre szabható jogalkotás egyik korában voltak „egyesek”, akik lehettek egyszerre egyetemi tanárok és akadémiai intézet igazgatók és voltak, akik nem. Tény, hogy Straub F. Brunó tapasztalatai teljében 1970-ben 56 évesen köszönt le egyetemi katedrájáról. Tény az is, hogy Straub jelentős befolyással, hatalommal, kapcsolatrendszerrel és közéleti jártassággal, ügyességgel rendelkezett, de az Egyetemen mégsem az általa feltételezhetően kívánt módon zajlottak az események sem az utódlása, sem a párhuzamos intézet vezetői kinevezésének vonatkozásában. Az is tény, hogy kapcsolata 1970-ben gyakorlatilag megszakadt az általa alapított Orvosi Vegytani Intézettel.

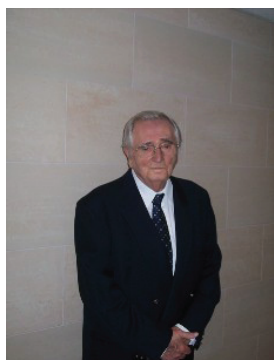
Az Intézet tagjainak jelentős része 1970-ben vagy a következő években távozott. **Dénes Géza, Venetianer Pál, Patthy László, Duda Ernő, Nagy Judit, Udvardy Andor, Zabos Péter** az SzBK Biokémiai Intézetének lettek alapítói. Közülük főigazgató, igazgatók, professzorok kerültek ki Szegeden.

Csányi Vilmos az ELTE Etológiai Intézetét alapította meg. Az Intézet különböző irányokba kirajzolt, más, egykori tagjai közül többen a későbbiekben vezető beosztást töltöttek be Magyarországon és külföldön. A Straub F. Brunó egykori intézetében nevelkedett kutatók közül a Puskin utcában tovább dolgozó **Faragó Anna, Staub Mária, Tóth Miklós** lett „nagydoktor”, egyetemi tanár és alapított intézeti laboratóriumot. Faragó Anna sok éven keresztül volt igazgatóhelyettes. Részben hasonló pályafutást mondhat magáénak a szintén tudományok doktora **Machovich Raymund** professzor is, aki pár év után a szomszéd intézetbe tért vissza és alapított munkacsoportot. Az Intézetben maradt „közvetlen Straub tanítványok” közül kiemelendő még **Garzó Tamás**, aki az Egyetem legsikeresebb fejlesztésének bizonyult németnyelvű oktatás bevezetésében játszott meghatározó szerepet.

Azok közül a Straub tanítványok közül, akik az Intézetben folytatták egyetemi pályafutásukat **T. Szabó Mária** emlékezett a hajdani időkre a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Molekuláris és Patobiokémiai Intézete januári Straub F. Brunó emlékére tartott rendezvényén. **Bánhegyi Gábor** igazgató bemutatta a centenáriumra rendelt Straub F. Brunót ábrázoló festményt, **Venetianer Pál** a korszakalkotó tudósi életutat, e sorok írója egyetemi pályafutását foglalta össze. A Straub intézetben, a hatvanas években „zsenihizlalda” működött, amelyben középiskolások ismerkedtek a molekuláris biológia legújabb fejleményeivel. Egykori középiskolásai közül a „közvetett, áttételes” tanítványok közé sorolható **Sasvári Mária** emlékezett arra a légkörre, amit az akkori Intézet akkori fiatal kutatói, Csányi, Machovich, Mile, Venetianer és mások árasztottak maguk körül és készítették sokakat (köztük jelen MTA tagokat, akik ugyan soha nem dolgoztak az Intézetben) arra, hogy a kutatói pályát válasszák. Fiatal kutatók előadásai bizonyították azt is, hogy az egykori „témák” nem halnak el, csak átalakulnak.

Ez az írás megemlékezés a Semmelweis Egyetem jelentős személyiségéről. Számos nevet tartalmaz és még több nevet nem, részint mert műfaji korlátok miatt nem tartalmazhat, részint mivel a korrekt írásbeli források hiányoznak, részint az „átjárásokból” kifolyólag nem lehet utólag tudni: ki mikor, milyen „statusban” volt és hol. Straub F. Brunó igazi nagysága az inspiráció, a szuggesztivitás, a különleges intellektus, a tanítványok sokasága. Nem az, hogy Ő kit sorolhatott a tanítványai közé, hanem az, hogy Őt kik tartják mesterüknek.

Mandl József egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem
Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

BAJUSZ SÁNDOR
(1931 – 2013)

Karácsony előtt néhány nappal hunyt el Bajusz Sándor, a XX. századi magyar peptidkémiai kutatás meghatározó személyisége. Ha eltekintünk Bruckner Győző akadémikus korábban megindított vizsgálataitól az anthrax-poliglutaminsav szerkezetfelderítése és szintézise területén, Bajusz Sándor volt az úttörője a biológiailag hatásos, élettanilag jelentős peptidek kémiai szintézisének Magyarországon. Kezdő vegyészként olyan témába vágott bele, amely később egész pályafutását betöltötte, s élete utolsó pillanatáig elkísérte. S ahogy az egy kutatópályán lenni szokott, az ő élete is bővelkedett sikerekben és csalódásokban.

Bajusz Sándor 1931-ben született Magyaróváron. Középiskolai tanulmányait a jezsuiták pécsi Pius kollégiumában végezte, s ugyanitt, az 1948-ban átkeresztelt Janus Pannonius gimnáziumban érettségizett 1950-ben. Az ELTE Természettudományi Karára jelentkezett vegyészhallgatónak, de mivel származása miatt (édesapja mérnök volt) oda nem vették fel, Szegeden tanult és kémia-fizika szakos tanárként végzett 1954-ben. Egy évi tanítás után Gerecs Árpád professzor hívására tudományos segédmunkatársként került a Gyógyszeripari Kutató Intézetbe.

Az intézetben Bodánszky Miklós vezetésével akkortájt fejeződött be az oxitocin hipofízishormon reproduktív kémiai szintézise, egyben Bajusz Sándor első találkozása a szintetikus peptidkémiaiával. Mivel Bodánszky 1957-ben emigrált, a hormon üzemeshető szintézisének befejezése, a Richter Gedeon Gyógyszergyár (akkor Kőbányai Gyógyszergyár) Kisfaludy Lajos által irányított kutatóinak közreműködésével Bajusz Sándor feladata lett. A szintetikus oxitocin azóta is a gyár egyik fontos, s annyi év után még ma is forgalomban levő terméke.

Az oxitocin szintézise után már három sikeres magyar peptidkutató csoportról beszélhetünk Magyarországon. A három „főnök” (Bruckner Győző, ELTE, Pillich Lajos, Richter és Vargha László, Gyógyszerkutató) irányítása mellett dolgozó kutatócsoportok (Bajusz Sándor, Kisfaludy Lajos, Medzihradsky Kálmán) nagy fába vágta fejszéküket, 1959-ben célul tűzték ki a humán adrenokortikotrop hormon (ACTH) teljes kémiai szintézisét. A témaválasztást a kutatók ambíciója mellett most az is indokolta, hogy a Richter Gyár forgalomban levő

organoterápiás készítményeinek (oxitocin–glanduitrin és ACTH) a szervekből való izolálást elkerülhetetlenül kísérő biológiai szennyeződéseit el lehessen kerülni. Ráadásul az emberi ACTH még szekvenciájában sem teljesen azonos az állati eredetű hormonnal. Elsőként az 1-28 aminosavakat tartalmazó peptid, majd az irodalomban felbukkant szerkezeti korrekció nyomán módosított, teljes 1-39 szekvenciának megfelelő humán hormon készült el. Bajusz Sándor és munkatársai a sikeres szintézisért 1970-ben Állami Díjban részesültek. Más kérdés, hogy a Richter Gyár a várható költségektől visszariadva a szintetikus hormon üzemi előállítására nem vállalkozott.

1975 decemberében nagy felfedezés híre rázta meg a peptides világot: agyhomogenátból izoláltak két morfinhatású pentapeptidet, melyeket enkefalinoknak neveztek el. A felfedezés jelentősége abban állt, hogy egy endogén vegyületről feltételezhető volt, hogy nem rendelkezik a morfin káros mellékhatásaival. Bajusz Sándor kutatócsoportja szintetizált is egy enzimrezisztens analógot, melybe egy D-konfigurációjú aminosavat beépítve a morfinhatás megnövekedését is sikerült elérniük. A várakozással szemben azonban e vegyület sem volt mentes a mellékhatásoktól, így gyógyszerre nem volt fejleszhető.

Az európai peptidkémikusok 1958 óta évente rendeznek peptidszimpóziumot, az amerikai szimpóziumok létrehozása után ez fokozatosan kétéves periódusokra korlátozódott. Bajusz Sándor mindkét sorozatnak kihagyhatatlan látogatója volt, s az utazási könnyítések következtében egyre népesebb magyar résztvevők közül kitűnt azzal, hogy ezeket elejétől–végéig derekasan végigülte és vitatkozta. Ezek során számtalan ötlettel lett gazdagabb, s amit lehetett, hasznosított is. Egy ilyen téma volt a forrása egy véralvadásgátló trombin-inhibitor, egy tripeptid-aldehid szintézise ötletének is. A Gyógyszerkutató Intézetben dolgozó Bagdy Dániel hematológussal együttműködve sokszoros módosítás után találták meg azt a hatékony vegyületet, melynek gyógyszerre fejlesztését az Eli Lilly cég végezte el. A csalódások közé sorolható az a döntés, melyet három éves klinikai kipróbálás után egy újonnan kinevezett ügyvezető igazgató hozott, aki szerint a termék nem hozza azt a hasznot, amelyet a gyár elvárt, ezért a technikai kísérleteket leállította, az Efgatran elnevezésű sikeres vegyületből így nem lett gyógyszer. Erkölcsi elismerést a két vezető kutató a magyar államtól kapott az 1992. évben odaítélt Széchenyi-díj formájában.

Bajusz Sándor töretlen, hosszú peptides életpályájának csúcspontja az LH-RH (luteinizing hormone-releasing hormone) antagonistájának, a Cetrorelix nevű gyógyszernek szintézise volt. 1985-ben utazott New Orleansba, a Nobel-díjas Schally professzor laboratóriumába, s három esztendőn át dolgozott e bonyolult szerkezetű peptid (a Cetrorelix egy öt D-aminosavat tartalmazó, acetilezett decapeptid-amid) optimális szekvenciájának megtervezésén és felépítésén, felhasználva mindazokat a tapasztalatokat, melyeket korábban e vegyületcsoport kutatása során szerzett. Visszaemlékezései hallgatóiban egy kalandregény olvasásának izgalmait keltik. Schally professzorral benyújtott amerikai szabadalmát 1993-ban fogadták el, a Cetrorelix azóta már kereskedelmi forgalomba is került. A tudományos siker végre anyagi gondtalanságot is jelentett Bajusz Sándor nyugdíjas éveire.

A nyugállományba vonuló Bajusz Sándor számára a Gyógyszerkutató Intézet tulajdonos váltása és lassú felszámolása következtében a munkalehetőségek megszűntek, de megmaradt az évtizedek során felgyülemlett szellemi kincs és az a lehetőség, hogy átadhassa tapasztalatait a fiatalabb generációknak. Címzetes egyetemi tanár lett a Szegedi Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében, s önkéntes tanácsadója több intézmény, így az ELTE-n működő MTA Peptidkémiai Kutatócsoport fiataljainak.

Társadalmi funkciókat csak a szűk szakterületén vállalt. Éveken át volt elnöke az Akadémia Peptidkémiai Munkabizottságának, nyolc éven át nemzeti képviselője az Európai Peptidkémikusok Társaságának, majd négy éven át a Társaság tudományos bizottságának is. E munkája során, évtizedes sikeres peptidkutatói tevékenységének elismeréséül 2002-ben nyerte el legmegbecsültebb kitüntetését, a Rudinger Memorial Award-ot a sorrentoi konferencián.

Szomorú szívvel emlékezik meg most jó barátjáról az ACTH triumvirátus megmaradt utolsó tagja.

Medzihradszky Kálmán
MTA rendes tagja
professzor emeritus
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

KUCSMAN ÁRPÁD**(1927 – 2012)**

A Biokémia olvasói számára Kucsman Árpád neve, figyelemreméltó munkássága valószínűleg nem annyira ismert, hiszen ő ízig-vérig kémikus volt. A megemlékezés aktualitását egy 2013. októberi esemény adja, amikor halálának egy éves évfordulóján kollégái, tisztelői, tanítványai emléktáblát avattak a ház falán, ahol élete jelentős részét töltötte.

Megtisztelő feladatnak tekintem, hogy e lapban visszaemlékezhetem Kucsman professzorra, a tanárra, a tudósra, de mindenekelőtt kollégámra és barátomra, akivel közel öt évtizedet töltöttem el az ELTE Természettudományi Kar Szerves Kémiai Tanszékén.

Kucsman Árpád életéről, munkásságáról halála után részletes nekrológban emlékeztek meg munkatársai, én csak néhány adatra szeretnék utalni, ami úgy érzem, jelentős befolyással bírt személyiségének kialakulására. A Fasori Evangélikus Gimnázium, ahol gimnáziumi tanulmányait végezte, az Eötvös Kollégium, amelynek egyetemi tanulmányai alatt tagja volt, komoly hatással volt a tudományok, irodalom és művészetek iránt érdeklődő fiatalemberre. Ezeknek a hatásoknak köszönhetően széleskörű műveltségét, fogékonyságát.

1949-ben kezdte pályafutását a Szerves Kémiai Tanszéken, ahol az akkori tudománypolitikának köszönhetően több fiatal részére is lehetőség adódott oktatói állás betöltésére. Kutató munkája mellett hamarosan igen nagy feladatra vállalkozott, Bruckner professzor felkérte őt megírandó nagyszabású tankönyvének adatgyűjtő és szerkesztői munkájának ellátására. A könyv írása során vetődött fel egy merőben új problémakör, a szerves szulfoxidok és az azokkal rokon kénorganikus vegyületek szerkezetének és sztereokémiájának kutatása. Ezzel kezdetét vette a Tanszéken a Kucsman Árpád névvel fémjelzett, nemzetközi elismerést is kiváltó, kénorganikus kémiai kutatás. 1970-ben, Bruckner professzor nyugállományba vonulása után átvette a szerves kémia főkollégium megtartását, bár előadások tartása korábban is feladatkörébe tartozott, ez mégis kihívást jelentett számára, hiszen Bruckner professzor előadásai közismerten igen magas színvonalúak voltak. Bár tiszteletben tartotta elődje előadói stílusát, mégis egyéni szint vitt az előadásaiba, követve a kor legmodernebb irányzatait. Akárcsak Bruckner Győző, úgy Kucsman Árpád hallgatói is szerencsésnek mondhatták magukat; a szerves kémiát szépségében, összefüggéseiben, logikus felépítésben ismerhették meg.

1970-ben tanszékvezetői megbízást kapott, igyekezett megőrizni a Szerves Kémia Tanszéken addig kialakult kollegiális légkört, a vezető feladatot úgy ellátni, hogy az ne hatalomgyakorlásnak tűnjön. Az idősebbeket bevonta a feladatok

megoldásába, a fiatalokat minden téren segítette, hogy szakmai fejlődésük sikeres legyen.

Egész életét átszötte az írás szeretete, a Szerves Kémiai Tanszék 70 éves történetét feldolgozó könyve még azok számára is tartalmaz meglepő fordulatokat, akik ezt nagyjából vele együtt élték át. Szívesen búvárkodott régi adatok feltárásában, az irodalmazás számára szórakoztató időtöltés volt.

Róla való megemlékezésemben nagyon fontosnak tartom emberi tulajdonságai méltatását is. Kiváló humorral rendelkezett, s ez sok kényes helyzet megoldásában is segítette, sőt saját időskori gyengeségeit is ironikus hangvételű írásában örökítette meg. Ez a tulajdonsága különösen a közös tanszéki kirándulások vagy rendezvények hangulatát emelte. Ezekon a kirándulásokon még Bruckner professzor is részt vett, hiszek az ilyen események emberi összekovácsoló erejében.

Kiemelkedő tulajdonságaként említem meg zeneszeretetét, büszke volt Vivaldi gyűjteményére, de ugyancsak említhetném irodalmi tájékozottságát is. Saját családot pótoló kiterjedt baráti köre és szülei iránt érzett ragaszkodása.

Egyéniségének hatása jól mérhető volt az emléktábla avatásra összegyűlt barátok, tanítványok, ismerősök népes seregében. Bár az idő meglehetősen zord volt azon a napon, ez sem tartott távol senkit, aki Kucsman Árpád baráti, tanítványi köréhez tartozott.

Kortársai, barátai, tanítványai számára emléke nem halványul, remélem ez a visszaemlékezés mások számára is közelebb hozza a múlt század jeles magyar kémikusainak egyikét, Kucsman Árpádot.

Medzihradszkyné Schweiger Hedvig
ny.tudományos főmunkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

FEBS-EMBO JUBILEUMI KONFERENCIA PÁRIZS, 2014

The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), EMBO - Excellence in life sciences, and the French Society for Biochemistry and Molecular Biology (SFBBM) will hold a joint conference for the life sciences in 2014.

The FEBS EMBO 2014 Conference will take place from **Saturday 30 August to Thursday 4 September 2014** at the Palais des Congrès in **Paris, France**.

2014 marks the **50th anniversary** of FEBS and EMBO, and the **centennial** of the SFBBM.

This year's meeting replaces the normally separate annual conferences of FEBS and EMBO, and combining our communities, we expect to bring together a wide range of researchers.

Angela Nieto, Susan M. Gasser, Eric Westhof and Michael Reth have agreed to act as the programme committee. They have put together a scientific programme covering the breadth of the life sciences. In addition, there will be sessions on science policy, publishing and careers and education, as well as activities tailored specifically for scientists in the early stages of their careers. Further information and registration is at <http://www.febs-embo2014.org/>.

We are all looking forward to welcoming you in Paris!

Frédéric Dardel

President, SFBBM

frederic.dardel@parisdescartes.fr

Maria Leptin

Director, EMBO

maria.leptin@embo.org

Israel Pecht

Secretary General, FEBS

israel.pecht@weizmann.ac.il



**A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET 2014. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSE
DEBRECEN, 2014. AUGUSZTUS 24-27.**

Tisztelt Kolléga!

Örömmel értesítjük, hogy a Magyar Biokémiai Egyesület Debrecenben rendezi meg 2014. évi Vándorgyűlését. A program kettő vagy több szekcióban zajlik majd, angol nyelven. Tervezzük nemzetközi hírű külföldi előadók meghívását plenáris előadások tartására.

Tervezett témák:

*Biochemical pharmacology
Biochemical education
Biocrystallography and structural biology
Cell death and differentiation
Genome structure, function and maintenance
Genomics and epigenetics
Membrane biochemistry
Pathobiochemistry
Proteomics
Signaling and post-translational modifications
Stem cells
Systems biology
Poster sessions*

A konferencia főszervezője Tózsér József, e-mail cím: tozser@med.unideb.hu

A Vándorgyűlés felhívása és minden további információ az Egyesület honlapján lesz megtalálható (<http://www.mbkegy.hu>), illetve elektronikus levélben értesítjük az MBKE tagjait.

Kérjük, hogy az érdeklődő kollégák figyelmét szíveskedjen felhívni a konferenciára.

Szívélyes üdvözlettel,

Fésüs László
az MBKE elnöke

Vértessy Beáta
az MBKE főtitkára

Tózsér József
Debreceni Egyetem OEC
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet



“Straub Örökség”

Alapítvány a Biológia Különböző Területein Végzett
Kutatások Támogatására

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ

6726 Szeged, Temesvári krt. 62., 6701 Szeged, Pf. 521.
Telefon: 62-599654, 432048, Fax: 62-433506

Tisztelt Kollégánk!

Ezúton kérjük, hogy ebben az évben is támogassa a **“Straub Örökség”** Alapítvány munkáját azzal, hogy a személyi jövedelemadójának 1%-át felajánlja az Alapítvány javára.

Mint köztudott, az Alapítvány célja a tudományos utánpótlás nevelése - az SZTE oktatóival karöltve -, a fiatal tehetségek felkutatása (“Középiskolás Élettudományi Kutatótábor”), a fiatal (35 év alatti) magyar anyanyelvű lipid és/vagy membránkutatók kimagasló teljesítményének elismerése (Farkas Plakett), valamint a PhD Journal Club Előadói Versenyének díjazása.

A kedvezményezett adószáma: 18459416-2-06

Segítségét köszönjük!

Vigh László s.k.

a “Straub Örökség” Alapítvány elnöke



Karcagi Ildikó s.k.

kuratóriumi titkár

2014. február

PÁLYÁZATI FELHÍVÁS

A Magyar Biokémiai Egyesülettel együttműködve

a **BIO-SCIENCE Kft. pályázatot hirdet**

2013-2014-ben, nemzetközi folyóiratban megjelent¹, molekuláris biológiai témájú közlemény szerzője/szerzői részére.

Pályázatot nyújthatnak be az MBKE tagjai és tagjelöltjei². A 35 év alatti pályázók az elbírálás során előnyben részesülnek. A pályázatokat a Magyar Biokémiai Egyesület elismert szakemberekből álló bizottsága bírálja el.

A pályázat díja bruttó **500.000.-Ft**

Az összeg felhasználható a BIO-SCIENCE Kft. által forgalmazott termékekre és az MBKE 2014. évi Vándorgyűlésén (Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014. augusztus 24-27.) való részvétel költségeinek (regisztráció+szállásköltség) fedezésére.

A nyertes pályázó eredményeit szóbeli előadásban ismerteti az MBKE 2014. évi Vándorgyűlésén.

Előnyben részesülnek azok a munkák, amelyek döntően hazai tudományos műhelyekben készültek.

A pályázatokat (a folyóiratban megjelent cikk pdf file-ját) a Magyar Biokémiai Egyesület Titkárságára kérjük beküldeni, az mbke@med.unideb.hu e-mail címre.

Beküldési határidő: **2014. március 31.**

Az eredményről a pályázókat 2014. április 30-ig értesítjük.

¹on-line megjelenés is elfogadható

²Az MBKE tagjelöltje az a személy, aki a belépési nyilatkozatot kitöltve eljuttatta az MBKE-nek és befizette a tagdíjat.

VÁLTOZÁSOK A SZERKESZTŐBIZOTTSÁGBAN

Keserű György és Váradi András egyéb elfoglaltsága miatt lemondott a Biokémia újság szerkesztőbizottsági tagságáról. Az MBKE vezetősége megköszöni több éves munkájukat. Az alább bemutatkozó új tagokat köszönti és jó munkát kíván.

Geiszt Miklós, szerkesztőbizottsági tag



1993-ban végeztem a Semmelweis Egyetemen általános orvosként. Az egyetem alatt tudományos diákkörösként bekapcsolódtam az Élettani Intézetben folyó oktató- és kutatómunkába. Ph.D. fokozatot 1998-ban szereztem. 1999 és 2002 között a National Institute of Healthben (NIH) dolgoztam, Dr Thomas Leto laboratóriumában. Külföldi tanulmányutam során a fagocita NADPH oxidáz korábban ismeretlen homológját és oxidázt szabályozó fehérjét azonosítottam. Külföldi tanulmányutam után az Élettani Intézetbe tértem vissza, ahol az amerikai Cystic Fibrosis Foundation és az angliai Wellcome Trust kutatási támogatásainak segítségével labort alapítottam. Jelenleg egyetemi docensként dolgozok az intézetben, ahol rendszeresen tartok előadásokat és konzultációkat. Fő kutatási területem a NADPH oxidáz és peroxidáz enzimek működésének vizsgálata. Irányításom mellett eddig négy munkatársam szerzett Ph.D. fokozatot. 2008-ban alelnöke voltam a NADPH oxidázokkal foglalkozó Gordon konferenciának, 2010-ben pedig elnökként szerveztem Gordon konferenciát Svájcban. Legfontosabb díjaim az MTA Talentum díj, a Richter Gedeon kutatói díj, Magyar Felsőoktatásért Emlékplakett és a Kiváló Tudományos Diákköri Nevelő díj. 2011-ben elnyertem az MTA Lendület kutatási pályázatát.

Maksay Gábor, szerkesztőbizottsági tag



Az ELTE TTK vegyész szakán végeztem 1973-ban. A diákkör folyóirata, a Vegy-ész alapító szerkesztője voltam. Egyetlen munkahelyem az MTA korábban Központi Kémiai Kutatóintézete, most Természettudományi Kutatóközpontja. Tudományos tanácsadó vagyok, 1993 óta a biológiai tudomány doktora. Visiting associate professor voltam a University of Texas Health Science Center-ben (San Antonio, 1982-1984). Többszöri, többhónapos, elektrofiziológiai és gyógyszerbiokémiai tanulmányutakat töltöttem az MSD Neuroscience Research Centre-ben (Harlow, UK) és a Max-Planck-Institute for Brain Research Neurokémiai Osztályán (Frankfurt/M). Titkára voltam az MTA Bioorganikus Kémiai Munkabizottságának (1986-2005) és a KKKI ez irányú tudományos testületének. A Current Molecular Pharmacology szerkesztőbizottságának tagja vagyok 2008 óta. Kutatási területeim: a KKKI Bioorganikus Kémiai Osztályán prodrugok, farmakokinetika és sztereokémia; majd a Molekuláris Farmakológiai Osztály vezetőjeként is: receptorkötődés, termodinamika, allosztéria, számítógépes receptormodellezés az ionotróp, elsősorban GABA_A és glicin receptorok körében. Tudománynépszerűsítő közleményeket írok és előadásokat tartok. Kedvenceim a tenisz, vitorlázás és filmklubok.

FELHÍVÁS

A *Biokémia* folyóirat szerkesztőbizottsága ismét felhívja olvasóink figyelmét az interaktív **Fórumra**, amely az Egyesület honlapján található. Várjuk vitatémák indítását, valamint különféle információkat, híreket is, amelyek tagtársaink érdeklődésére számíthatnak.

Az írásokat Maksay Gábor SzB-tag címére (maksay.gabor@ttk.mta.hu) kérjük elküldeni.

MESÉS TÁJAK, EMBEREK – AFRIKA

Fizikus vagyok. Illetve ma már biofizikus. Szeretem csinálni. Aztán pár éve elkezdtem fotózni, és ez lassan a szenvedélyemmé vált. Ma már hiányzik, ha kimarad. Gondolom, hogy az lehet a dolog mögött, hogy kutatóként (tanárként) a munkámnak csak kicsi része ábrándos és szárnyaló. Bár mondják, hogy a tudomány valahol művészet is, azért ez csak nagyon szerencsés pillanatokban van így. Egy kísérlet negyedik ismétlésénél vagy ugyanazon előadás hetedik leadásakor már ezt szerintem senki nem képes mindig így érezni. A fotózásban pedig fel tudok úgy oldódni, hogy sem megfogalmazott célom, sem feladatom sincs. Vagyis nem kell, hogy legyen. Mert persze, ha akarom, akkor van. Ez remek. És még szép is. Egy-egy ködös hajnalon baktatni a Duna partján akkor is jó lenne, ha nem fotóznék. Persze gondolom az is kedvemre lenne, ha gyönyörű képeket festenék vagy novellákat írnék. De azt nem tudok. Fényképezni meg ugye mindenki tud. Eleinte. Más képeit is szeretem nézegetni. Az is igaz, hogy a képeket nagyon ritkán készítem egy koncepció szerint, azt fotózom, ami tetszik, ami látványos vagy furcsa. Legszívesebben az embereket. Minden nehézsége ellenére rabul ejtett a portréfotózás. A munkám miatt, de úgy egyébként is sokat utazom. Ezeken az utakon mászkálok, báméskodok és keresgélek. Ilyenkor igazi turista fotós leszek, és fotózom, amit előttem már százezrek lefotóztak. Ez is része. Az utóbbi időben eljutottam a fekete Afrikába is, és beleszerettem. Kenya, Kongó, most Nigéria. Nem egy dühöngő és mindent elsöprő szerelem ez, hanem egy lassan enyelgő, kissé alattomos, sündörgő, időnként felerősödő és sokszor veszekedős. Olyan, hogy oda még vissza kellene menni. Muszáj. Pedig néha fárasztóan-zsibbasztóan afrikai ott minden, és úgy érzi az ember, hogy csak a bolond keresi az ilyen helyeket. De mégis. Afrika bája és mosolya már nem enged el. Nagy ez a világ, sok még a látnivaló. Itthon is, máshol is. Remélem, sok kép vár még rám. És hogy mindez merre tart, hova fejlődik és mivé alakul majd, nem tudom. De nem is érdekes. Jó a sok kötöttség mellett a felhőtlen és felelősség nélküli kattintgatás. Mert kikapcsol, elvarázsol és gyönyörködtet.

Nyitrai Miklós 1993-ban diplomázott fizikusként Debrecenben (KLTE TTK). Ph.D. fokozatot 1997-ben (Pécs, POTE), MTA Doktori Címet 2007-ben szerzett. 1993 óta – egy rövidebb külföldi megszakítással – a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében dolgozik, 2006 óta az intézet igazgatója. Kutatásaiban a fehérjék kölcsönhatásait tanulmányozza biofizikai, leginkább spektroszkópiai és mikroszkópiai módszerekkel. Vizsgálatainak homlokterében a sejtek vázát felépítő fehérjék, azokon belül is az aktin citoskeleton komponensei állnak.





A Mt. Elgon tetején. Felmásztunk a kenyai Mt. Elgon (hegy) tetejére. Fantasztikus volt a látvány. Ezen a helyen a 2008-as zavargások idején szörnyű dolgok játszódtak le a törzsi villongások keretei között. Barátom, István éppen erről beszélget a képen Christophe-fal, a helyi vezetőnkkel.



Piacon Matadiban. A matadi piac nyüzsgő forgatag volt rengeteg különféle termékkel és eladóval. Voltak olyan árúk, amik nálunk is megszokottak, és voltak európai szemnek elborzasztók is.



Diamond. A kislány a kinshasa-i árvaház szomszédságában lakott, és előszeretettel kukucskált át hozzánk a kerítés lyukain keresztül (cím a neve.)



Horgász a Baringo tavon. Reggel és este horgásznak apró tutajaikon. Napközben árulják a fogást, többnyire a tűző napon. Veszélyes a munkájuk. Ottlétünkör volt két hete, hogy egy víziló megölte egyiküket.



Sarah. Egy másik lány a kinshasa-i árvaházból. Kicsit fiús, makrancos és többnyire nagyon vidám volt. Az egyik legkedvesebb és legmegkapóbb találkozásom volt Kinshasa-ban.



Eldoreti anyuka gyerekével.



Afrika bája.



Jambo, brother! A sráccal egy eldoreti kocsmában (Who's Pub) találkoztunk. Saját bevallása szerint az unokaöccsével együtt rap énekesek (az uncsitesó C'zar néven fut). Vidámak, közvetlenek voltak mind a ketten. („Jambo” a bevett köszönés, és persze mindenki „brother” arrafelé.)