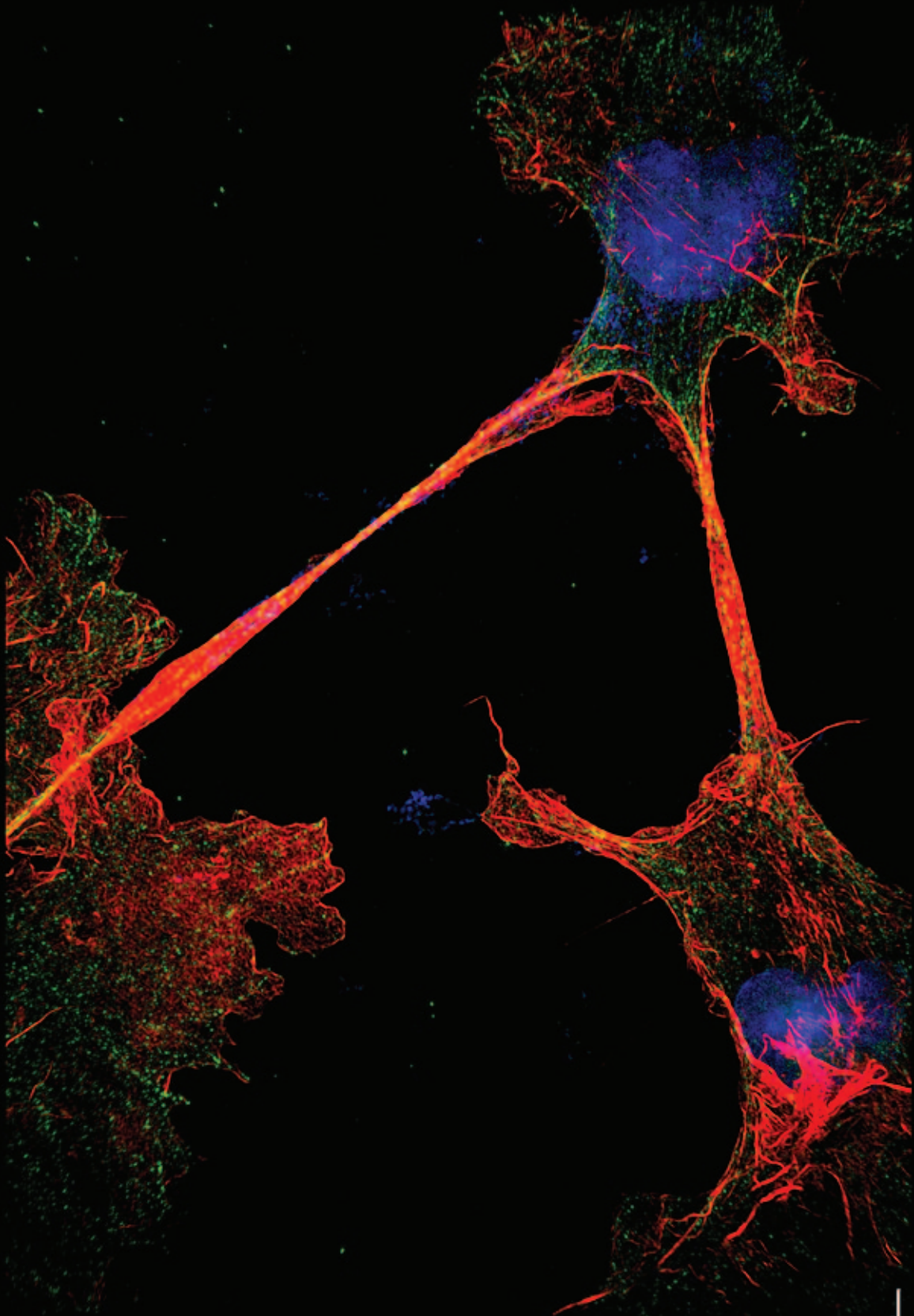


BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XXXVIII. évfolyam 4. szám

2014. december



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 4. SZÁM

2014. december

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: Cos7-es sejtek SIM mikroszkóp alatt (Szabó-Meleg Edina felvétele, lásd Lukács András írását 39. oldalon)

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak	4.
Venetianer Pál előadása a Tankó Béla életmű-díj átvételekor	6.
Takáts Szabolcs, Nagy Péter és Juhász Gábor: Az autofágia szerepének és szabályozásának vizsgálata Drosophila modellen	17.
Orosz Ferenc humanitárius tevékenységét a svéd Királyi Sarkcsillagrend Parancsnoki Fokozatával díjazták	30.

HAZAI TUDOMÁNYOS MŰHELYEK

A Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program (MedInProt) bemutatása	32.
---	-----

REVIEW

Lukács András: Sejtek szuperfelbontásban, Nobel-díj, 2014.	36.
Maksay Gábor: Max Perutz öröksége	41.
Vértessy G. Beáta: Mire jó a fehérjekrisztallográfia?	48.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY

Leitgeb Balázs: Alamethicin peptidek térszerkezeti tulajdonságai	55.
--	-----

VISSZATEKINTÉS AZ ELMŰLT 50 ÉV KIEMELKEDŐ CIKKEIRE

Prológus	65.
Keszthelyi Lajos és Ormos Pál: Egy dolgozat elő- és utóélete	66.

KONFERENCIA BESZÁMOLÓK

Az MBKE 2014. évi vándorgyűlése, Debrecen	73.
Workshop on „Molecular Medicine and Life Science Education” címmel megrendezett FEBS oktatási munkaértekezlet, Debrecen	76.
„Danube Scientific Conferences on Epigenetics” rendezvény, Budapest	78.
FEBS-EMBO jubileumi konferencia, Párizs	82.

KONFERENCIA HÍREK

Hungarian Molecular Life Sciences 2015- Molekuláris Élettudományi Konferencia 2015	84.
--	-----

FELHÍVÁSOK

A 2014. évi kiemelkedő cikkek listájának beküldése	85.
A Bio-Science Kft. pályázati felhívása	86.
MBKE Fórum	87.
Alapítvány a Tudományos Szemészetért pályázat	88.
TUDOMÁNY ÉS MŰVÉSZET	
Tóth Csaba: Természetfotók	89.



*Kellemes karácsonyi ünnepeket és békés, boldog,
tudományban gazdag új évet kívánunk!*

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 2014. JÚNIUS 15. ÉS 2014. DECEMBER 15. KÖZÖTT

Az MBKE 2014. évi vándorgyűlésén Venetianer Pál akadémikus, az MTA SZBK emeritus professzora **Tankó Béla életmű díjat**, Nagy László akadémikus, a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet professzora **Tankó Béla díjat** vehetett át eddigi munkássága elismeréseként.

A Magyar Tudományos Akadémia májusi, 185. közgyűlését követő tisztújítási folyamat eredményeként négy tudományos osztály élén új elnök áll a következő három évben. **A Biológiai Tudományok Osztálya élére Fésüs Lászlót**, az MBKE elnökét választotta a testület.

A **FEBS Council Vértessy Beátát**, (az MBKE főtitkárát) az **Advanced Course Committe** élére választotta.

Hét magyar taggal bővült az Academia Europea tagjainak száma. A több mint háromezer tagot – közöttük Nobel-díjasokat is – számláló közösségébe az idén felvételt nyert Tompa Péter, az MTA TTK tudományos főmunkatársa.

Sóti Csaba, a SOTE Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet docense **Huzella Tivadar emlékérmét** kapott a stressz, az öregedés és a tanulás területén elért eredményeiért.

A Magyar Tudomány kategória **Veszprém Megyei Prima Díj 2014. évi nyertese Vonderviszt Ferenc**, a Pannon Egyetem Műszaki Informatikai Kar Nanotechnológiai Tanszékének professzora.

A jelentős eredményeket elért, 45 évesnél fiatalabb kutatók közül idén 188-an nyerték el a **Bolyai János Kutatási Ösztöndíjat**. Köztük:

- Kenessey István, Semmelweis Egyetem,
- Kövesdi Dorottya, ELTE Immunológiai Tanszék,
- Lukács András, Pécsi Tudományegyetem, ÁOK,
- Szöllősi Gergely János, MTA TKI.

A harminc év alatti tudósoknak nyolcadik alkalommal kiosztott **Junior Prima Díjat** magyar tudomány kategóriában tíz fiatal vehette át, köztük **Enyedi Balázs** (SE Élettani Intézet) a sejtélettan kutatója, aki elsősorban a reaktív oxigénszarmazékokat és a gyulladási folyamatokat tanulmányozza és **Nagy G. László** (MTA SZBK), aki a soksejtű gombák evolúciójának hátterében meghúzódó biológiai folyamatokat vizsgálja bioinformatikai, filogenetikai és genomikai technikákkal.

A **Lendület Fiatal Kutatói Program** 2014. évi nyerteseinek ismertetőjéből (Biokémia XXXVIII. ÉVFOLYAM 2. SZÁM 2014. június) sajnálatos módon kimaradt **Nagy G. László** (lásd fent) és **Juhász Gábor**, aki az autofágiát tanulmányozza

kutatócsoportjával az MTA SZBK-ban. A díjazottaktól szíves elnézést kérünk és mostani számunkban örömmel közöljük Juhász Gábor és munkatársainak a kutatási témát bemutató írását, lásd 17. oldal.

Orosz Ferenc, az MTA TTK Enzimológiai Intézet tudományos igazgatóhelyettese a svéd **Sarkcsillagrend Parancsnoki Fokozatát** kapta a Raoul Wallenberg Egyesület elnökeként végzett társadalmi munkájáért.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

BUTTERFLIES, BACTERIA, BOOKS. MY WAY...¹

Dear Colleagues, Ladies and Gentlemen,



First of all I want to express my gratitude to the Presidium of the Hungarian Biochemical Society for bestowing me this honor. I especially appreciate it, because I am old enough to have known, respected and liked the late Béla Tankó, so it is a pleasure to receive an award named after him. As this award honors a whole scientific career, I suppose that I

am expected to summarize my life's work and achievements. Although these are fairly modest, I still find it impossible to tell it all in 25 minutes. Therefore, I shall restrict myself to the mentioning of only a few decisive turning points, and a few publications – not necessarily the most successful ones – that were memorable for me for some reason or other. In other words: which I liked most.

„My way is to begin with the beginning”, as Lord Byron once wrote, so I must first answer the question, which probably many of you asked: why butterflies? Because, as a high-school student I was a passionate collector of butterflies. This hobby of mine was shared with such cultural heroes as Béla Bartók or Vladimir Nabokov, but they were only amateurs and I wanted to become a professional lepidopterologist. This desire induced me to enroll to ELTE as a student of biology and chemistry. During the university years however I had to realize with some regret that the zoology and botany disciplines terribly bored me, the teaching of general biology and genetics were in those years (the nineteen fifties) at shockingly low level, whereas the chemistry (which I originally regarded as an unnecessary burden, only making my biological studies less attractive) became more and more interesting for me. Probably the only teacher during my student years, who proved to be intellectually stimulating, was Endre Biró, who taught biochemistry. Although I was not yet aware of the fact that he secretly translated James Joyce's difficult novel, *Finnegans Wake* for his desk drawer, and of his deep involvement in philosophy, I somehow sensed his spiritual superiority. Still,

¹ Venetianer Pál előadása a „Tankó Béla életmű-díj” átvételén, az MBKE vándorgyűlésén 2014. augusztus 24.-én Debrecenben.

I have not decided yet to become a biochemist. After graduation I received three letters of recommendation from a family friend, to three different institutions and it was pure chance that my first visit was to Ágnes Ullmann in Straub's Institute of Medical Chemistry at SOTE. She introduced me to Straub, and this proved to be a decisive moment for my whole life. Straub immediately impressed me as a giant, and now, after having known several leading figures of the biochemistry and molecular biology of the last third of the twentieth century, I still believe that he was one of the greatest personalities I had the good fortune to have known.

Although I was very happy in this Institute, as I admired the big boss, Straub and I liked my immediate supervisor Ágnes Ullmann, my first years there proved to be unsuccessful. I was in the state what Tibor Dévényi describes in his classic book as „generalkrach”, when one day Straub offered me a bright idea. He said: „Everybody working on protein synthesis (that was the main subject of our research then) wants to know how the peptide bonds are formed. But proteins have other covalent bonds as well. Why don't you look at the formation of the disulfide bridges?” Indeed, I was not aware of any work, dealing with this problem. I went immediately into the library and found those epoch-making papers from Anfinsen's lab (which eventually won the Nobel-prize for him) in which they described that if they reduced under denaturing conditions the four disulfide bridges of ribonuclease, then, after removal of the denaturing agent, under mildly oxidizing conditions, the original structure was reformed, with the recovery of the activity of the enzyme. That is: *only* the original structure, not the mixture of the 105 possible isomers. However, this process required several hours. We thought that *in vivo* this cannot happen that slow, there might be an enzyme catalyzing this reaction. I set up a very primitive experimental system and, lo and behold, the very first experiment convincingly indicated the existence of such an enzyme.

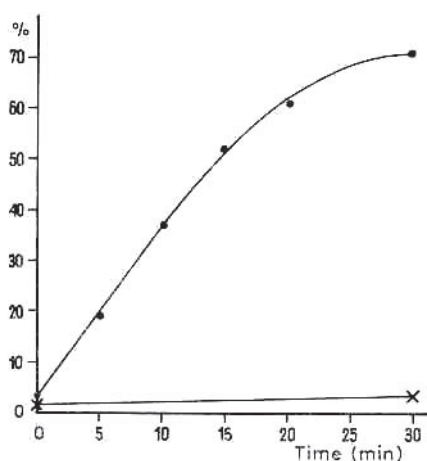


Figure 1. The recovery of ribonuclease activity in the presence (upper curve) and absence (lower curve) of a cell-free extract of pancreatic tissue.

For the next few weeks I lived in Hershey's heaven (the Nobel-prize winning molecular biologist, Al Hershey once answered the question „What is scientific happiness?” with „To do an experiment that works, and keep doing it all the time”). Well, I did not repeat the same experiment, but in this period all my experiments worked, and every one of them resulted in a step forward. I think you all know how rare this is in the life of an experimentalist. Our intention was to publish only after having purified the enzyme to homogeneity, but in 1962, we learned through the grapevine that Anfinsen's group also found this enzyme and they also heard about our results. So Anfinsen sent his coworker, Bob Goldberger to Budapest, to discuss matters with us. This visit had three important consequences for me, the decision to publish our preliminary results, an invitation to work in Anfinsen's laboratory, and the start of a lifelong friendship with Bob. So we published the discovery of the enzyme – later named protein-disulfide-isomerase (PDI) – simultaneously with them. Anfinsen in his Nobel-lecture said that „The discrepancy between the *in vivo* and *in vitro* rates led to the discovery of an enzyme system which catalyses the disulfide interchange reaction” [1] and he properly referred to our [2] and their papers [3]. Nevertheless, if an unknown Hungarian publishes anything in parallel with a Nobel-prize winner; it is unavoidable that the latter will be cited much more frequently than the former. As it happened in this case (323 versus 127 citations). Still, the discovery proved to be significant, PDI produces now 540,000 hits in a Google search, and a recent review claims that it might be an important target of anticancer drugs [4].

In the National Institutes of Health, I quit the PDI enzyme, and with it classical enzymology as well. By joining to Bob Goldberger's newly formed group I was converted into a bacterial molecular biologist. The published results of this postdoctoral year in the USA were not very memorable, but the participation at weekly working lunches with the best and the brightest molecular biologists of the NIH, Gordon Tomkins, Bruce Ames, Bob Martin, Philip Leder, Gary Felsenfeld and others, exerted a lasting influence on my thinking, and future work.

After my return I received my first collaborator Ernő Duda, and not much later the second, Andor Udvardy. Both of them became lifelong friends and they formed the seed of my group when we all moved to my second and final workplace, the Biological Research Centre in Szeged. There, my „idée fixe”, the – somewhat utopistic – aim of my research effort became the isolation of a single gene, and the study of its function and regulation in an *in vitro*, isolated system. As usual, this goal was first achieved not by us, but by Jon Beckwith at Harvard

University, nevertheless this „mad pursuit” (to quote Francis Crick) led to two important consequences on my way. First: my chosen target, the gene coding for rRNA in *Escherichia coli* became the principal research subject of our group for the next 15 years, resulting in 30 publications. Second: when I read the first, ground-breaking publications on the type II restriction endonucleases (in 1972), I realized that these will be the adequate tools for reaching our aim, the isolation of a single gene. So, I advised my two new collaborators, Béla Sain and Antal Kiss to reproduce the purification of the first such enzyme, EcoRI, and to look for new restriction endonucleases. Then, in 1973, on the invitation of Philip Leder, who was the co-discoverer with Marshall Nirenberg, of the method that led to the final elucidation of the genetic code, and a later winner of the prestigious Lasker-prize, I spent a year again in the NIH. There I developed a then very promising-looking method, which however became soon obsolete, mainly due to the triumph of the genetic engineering revolution [5]. After my return to Szeged we joined with full force to this revolution. Not much later, with Antal Kiss and Béla Sain we performed the first successful molecular cloning experiments behind the iron curtain. At that time I frequently heard the comment that I imported genetic-engineering from the Leder-lab. This may sound boastful, but the opposite was true. As I mentioned earlier, we started working with restriction enzymes before I went to the States. In the Leder-lab I purified the first restriction enzyme, I gave a seminar about the ground-breaking papers of Boyer and Cohen, which opened the genetic-engineering epoch, and the – very successful - work on the development of new cloning vectors, started there by David Tiemeier and Shirley Tilghman only after I left the Leder-lab.



Figure 2. My group around 1980.

So, after my return, as the head of a very talented and enthusiastically working team, we reached our target, we cloned an rRNA gene and studied its structure, function and regulation, became versatile in the techniques of molecular cloning, and were the pioneers of DNA sequencing in Hungary.

From this period I should like to mention the story of two papers. One day Antal Kiss, who then digested the genome of *E. coli* for cloning purposes, and hybridized the fragments with radioactive rRNA, showed me a digestion pattern with the enzyme BamH1.



Figure 3. Agarose-gel electrophoresis and hybridization with radioactive rRNA of BamHI-digested DNA from an rRNA-gene carrying phage (A), and *E. coli* (B).

It was known then that the rRNA genes are redundant, but their number was not yet known. As most of the digestion patterns formerly seen by us, were much more complicated than this one, we concluded that probably the BamH1 enzyme – in contrast with the other, previously used enzymes – does not cleave any of the rRNA genes and the seven bands of approximately equal intensity mean that the number of RNA genes is seven. I proposed some simple control experiments to Béla and Anti and after having obtained the expected results I wrote a short paper on a single evening. We submitted it next morning to FEBS Letters, it was accepted immediately, without any change, and the result became a textbook fact [6]. If one would make a cost benefit analysis, by dividing the number of citations to a paper by the number of working hours necessary to produce the results and writing the paper, this paper would have won the contest for me with a wide margin.

The second favorite paper was of a very different kind. Ever since my youth I loved logical riddles. When we decided to determine the restriction map of all seven rRNA genes of *E. coli*, this work (by the way, today it would be a task solved by a computer in a few seconds) was a „first”, the determination of the restriction map of seven genes from a whole genome, simultaneously.

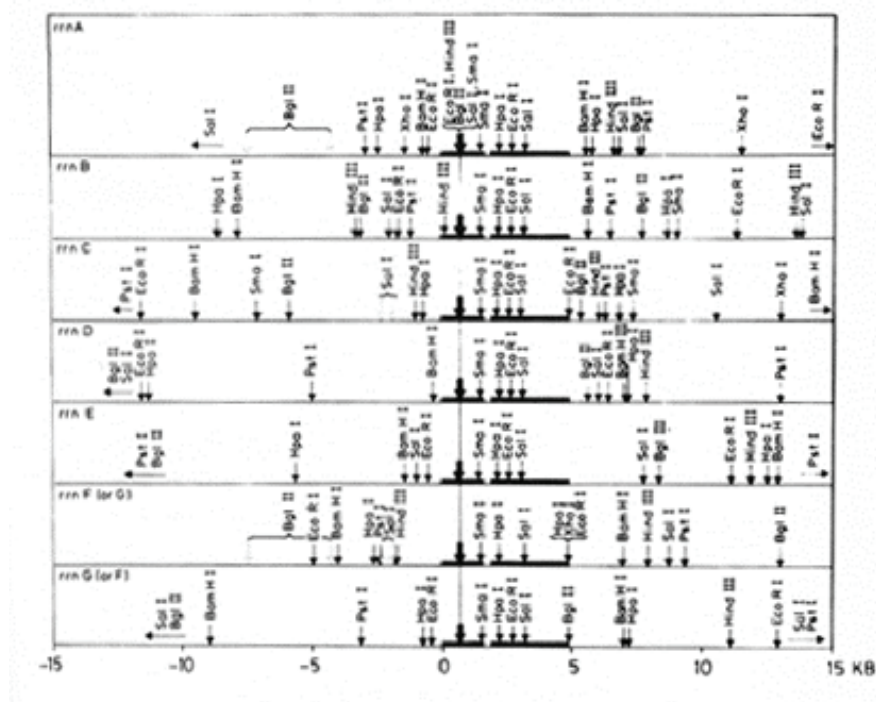


Figure 4. Physical map of the seven rRNA operons of *E. coli*. Thick solid bars represent the 16S and 23S rRNA sequences. The beginning of the 16S sequence was chosen as point of reference and distances in kilobases are related to this point. The vertical line in the middle of the 16S rRNA sequence denotes a 0.1 kB long region where all five enzymes written in the top row have cleavage sites. Dotted arrows represent undecided alternatives.

The experimental data, that is: agarose gel electrophoresis of digestion products with different enzymes, and subsequent hybridization with radioactive rRNA, were mainly produced by Imre Boros, and with these data I spent for weeks, every afternoon and sometimes the night also in a permanent state of „flow” (to use the psychological term coined by Mihály Csikszentmihályi), enjoying the hard, concentrated logical thinking, and the pleasure of having finally solved the difficult riddle. Although when we submitted the paper, I was worried that the reviewers will not be able to follow the very complicated reasoning behind the results, this paper was also accepted immediately, without any change [7].

As a consequence of our successful cloning work, and the general worldwide enthusiasm surrounding its possible practical applications, our group was commissioned by the secretary of the Academy of Sciences and the Gedeon Richter Company, to create a bacterial strain expressing human proinsulin. In retrospect I look back to this project with ambivalence. It proved to be a challenging and exciting task, but it required a large amount of scientifically unrewarding work from my whole group. Finally, we solved the problem, the

constructed *E. coli* strain produced human proinsulin very efficiently [8], but – of course – the industrial production has never been realized and scientifically the results did not mean anything, as this task had already been solved by leading American groups, and genetically engineered human insulin was already available on the market. Nevertheless, the result made me sort of a media-celebrity for a short while. This fact was exploited by my colleagues in the institute, when they portrayed me as „The insulin-sultan” at the yearly carnival-entertainment show of the Szeged centre.



Figure 5. „The insulin-sultan” on the BRC carnival.

In this period we used large amounts of different restriction endonucleases, the purchases of which would have been hardly affordable with our very limited convertible-currency budget. So we prepared most of these enzymes ourselves and because this activity was carried out on a fairly large scale, we also generated some extra income from the sale of these enzymes. This meant also a shift in the focus of our research. Restriction enzymes which were earlier only the tools now became the objects of our research. We discovered, and characterized several new restriction endonucleases and modification methylases, cloned and sequenced several genes coding for them, and studied the expression, and mechanism of action of several such enzymes. This line of research also resulted in nearly 30 publications. I should like to mention two of these.

This paper [9] describes a generally applicable method for the cloning of modification methylase genes, and the successful application of the method for the M.Bsp enzyme. The idea of this method was not mine, it came from my

friend and collaborator Antal Kiss, but I liked it very much and perhaps never in my whole scientific career followed the outcome of an experiment with more excitement and enthusiasm. When it proved to work, we celebrated the result with a bottle of champagne. This method has since been referred to in the literature, even today, as „The Hungarian trick”.

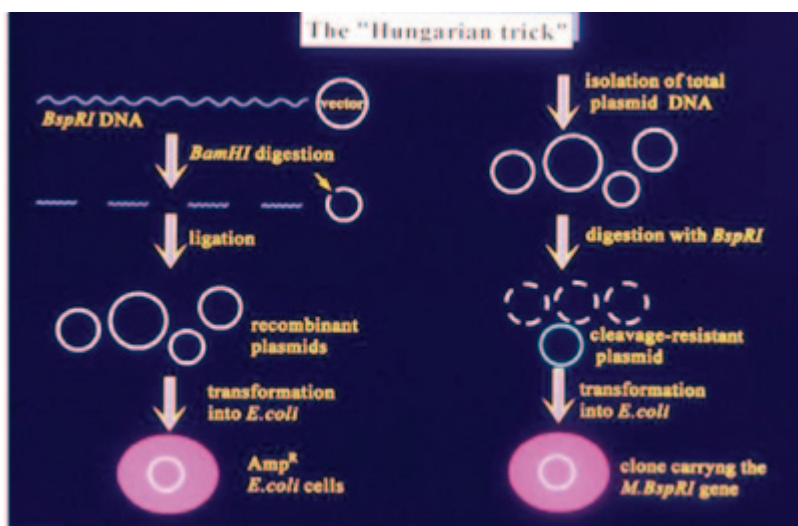


Figure 6. "The Hungarian trick" in cloning.

I sometimes wonder that if we would have been smart enough to patent this procedure, we could have become quite rich, because most of the restriction endonucleases and modification methylases have been produced by the various companies selling these enzymes by the application of this method.

The second paper describes the first complete sequence of a restriction endonuclease – modification methylase gene set [10]. I show this to boast with my second Nobel-prize winning coauthor (after Anfinsen), Rich Roberts. The sequencing was done partly in his lab by Antal Kiss, partly in mine by György Pósfai (by the way, he is my present boss).

Finally, from this period I should like to mention the rather funny case of a non-existent paper. In the production and characterization of restriction endonucleases we were in collaboration with other East European laboratories. One of our partners, Manfred Hartmann from Jena once gave me a sample of a purified enzyme, which he prepared from an unknown, contaminating bacterial strain and he thought that it might represent a new specificity. He asked us to determine the recognition and cleavage specificity of this enzyme. Then, as the director of the Institute of Biochemistry I spent very little time in the lab working manually, but I thought that this task would be just suitable for me, so

I decided to do it myself. Indeed, in a few weeks, I could unambiguously prove that the enzyme recognizes and cleaves a new, hitherto unknown sequence, and I proposed Manfred to send us the strain, or the purification protocol of the enzyme for a joint publication. He replied that he was terribly sorry, but the strain died before it was identified, and they were unable to recover it. So we could not publish, although the original preparation lasted for two more years, we used it frequently, and called it enzyme X. The interesting and surprising climax of the story is that although nearly thirty years passed since then, and the number of known restriction endonucleases now exceeds 3000, the X enzyme has not been discovered yet by anybody else, and this sequence is not recognized by any known enzyme.

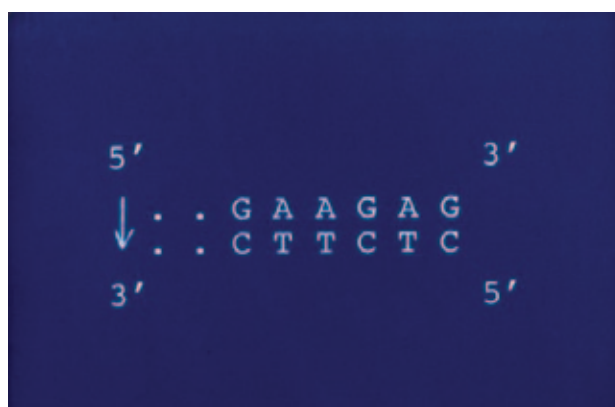


Figure 7. The recognition and cleavage specificity of enzyme X.

And finishing this account of my way, I might say a few words about my books. I wrote seven books, all dealing with the popularization of molecular biology, or various aspects of it. Now, I should like to comment on two of them. The book „DNA, yesterday, today, and tomorrow” [11] contained three essays on the past, present and future of molecular biology. The third essay discussed the possibility of creating artificial life. Well, in 2010 the sensational results of the team of Craig Venter were widely acclaimed as just this: the creation of artificial life. Upon reading Venter’s paper, I re-read my essay on this problem written 36 years ago, and I found with great satisfaction, that my conclusions remained valid after so many years, and Venter’s results nicely fit in the conceptual framework of my article.

The second comment refers to my book on GM-plants („Gene-modified plants: what are they good for?”), written three years ago [12]. You might ask: why did I write this book as I never worked with plants and never had anything to do with the agricultural sciences. As an answer, I should like to cite one of my scientific

heroes, Jacques Monod. Shortly before his untimely death, Monod received a fan-letter from a schoolboy, asking him: what are the main moral values of his life. Monod's answer was, that „The quality that appears most important to me, is the love of truth, or rather, the hatred of lies. I prefer to speak of the hatred of lies rather than the love of truth, since one is never sure of holding the truth, whereas with lies, one is almost always able to detect them, to discover them, and to denounce them.” I completely agree with him. I simply could not swallow the heap of lies, falsehoods and stupidities in the debate surrounding the case of GM-agriculture, and that „hatred of lies” motivated me to write this book.

The usual conclusion of such a talk is to thank to the masters, disciples and collaborators. I omit this, because during the talk I mentioned all my masters, and some of my most important collaborators. I do not call them disciples, because probably I learned more from them, than they learned from me. And I cannot mention them all because as I counted for this talk: I had altogether 74 coauthors in my publications. So, I finish with expressing only thanks to my wife, Anikó Venetianer, who is also a scientist, and who has been with me already for 46 years on my way, helping, criticizing and very rarely also praising.

References

- [1] Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**: 223-230.
- [2] Venetianer, P. and Straub, F.B. (1963) The enzymic reactivation of reduced ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**: 166-168.
- [3] Goldberger, R.F., Epstein, C.J. and Anfinsen, C.B. (1963) Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**: 628-35.
- [4] Xu, S.L., Sankar, S. and Neamati, N. (2014) Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, **19**: 222-240.
- [5] Venetianer, P. and Leder, P. (1974) Enzymatic synthesis of solid phase-bound DNA sequences corresponding to specific mammalian genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 3892-3895.
- [6] Kiss, A., Sain, B. and Venetianer, P. (1977) The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **79**: 77-79.
- [7] Boros, I., Kiss, A. and Venetianer, P. (1979) Physical map of the seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **6**:1817-1830.

- [8] Venetianer, P. (1985) A humán proinzulint termelő baktériumtörzs előállítás. (in: Napjaink biotechnológiája. OMFB tanulmányok **7**: OMFB-OMIKK. ed: L.Kállai, Budapest) pp. 42-45
- [9] Szomolanyi, E., Kiss, A. and Venetianer, P. (1980) Cloning of the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* in *E. coli*. *Gene*, **10**: 219-225.
- [10] Kiss, A., Posfai, G., Keller, C.C., Venetianer, P. and Roberts, R.J. (1985) Nucleotide sequence of the BsuRI restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 6403-6421.
- [11] Venetianer, P. (1978) Molekuláris biológia: Tegnap. Ma, Holnap. Magvető, Bp. Gyorsuló idő.
- [12] Venetianer, P. (2010) Génmódosított növények – Mire jók? Typotex, Bp.

Pál Venetianer
Professor emeritus
Biological Research Centre, HAS
Szeged

AZ AUTOFÁGIA SZEREPÉNEK ÉS SZABÁLYOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA *DROSOPHILA* MODELLEN

Takáts Szabolcs, Nagy Péter és Juhász Gábor
ELTE Anatómiai, Sejt-és Fejlődésbiológiai Tanszék

Az autofágia egy valamennyi eukarióta sejtre jellemző katabolikus folyamat, mely során a sejt saját anyagait bontja le a lizoszómális rendszer segítségével. Három fő típusa létezik: a chaperone-mediált autofágia (CMA), a mikroautofágia és a makroautofágia. Ez a három egymástól morfológiailag teljesen eltérő útvonal három különböző választ ad arra a problémára, hogy hogyan juttassunk át anyagot a citoplazmából a lizoszómális kompartment belsejébe, annak határolómembránján keresztül. A CMA úton ez a Hsp70 családba tartozó dajkafehérjék segítségével valósul meg, melyek a lebontandó fehérjéket a lizoszóma membránhoz szállítják, ahol a LAMP2A transzmembrán fehérje által alkotott csatornán keresztül jutnak be a lumenbe. A mikroautofágia a CMA-nál nagyobb kapacitású, így annak folyamán nemcsak egyes fehérjék, hanem kisebb citoplazma részek és organellumok (például peroxiszómák) is bejuthatnak a lizoszómákba. Ennek során a lizoszóma membránja egy adott helyen benyomódik, majd a keletkező vezikula (belsejében a citoplazma egy részletével) lefűződik a lizoszóma lumenébe, ahol tartalma membránjával együtt lebomlik. A három folyamat közül az utolsónak tárgyalt makroautofágia szállítja a legnagyobb anyagmennyiséget, mivel terjedelmes citoplazma részleteket és organellumokat (mint például a mitokondrium) is képes a lizoszómába juttatni és lebontatni. Ehhez először egy membrán ciszterna, az úgynevezett fagofór vagy izoláló membrán jön létre, mely fokozatosan növekedve körülveszi a lebontandó citoplazmarészt, majd egy kettős membránnal határolt vezikulává, autofagoszómává záródik. Az autofagoszóma egy érési folyamat révén válik alkalmassá a lizoszómákkal történő fúzióra. Az ily módon létrejövő emésztő kompartmentet autolizoszómának nevezzük. Mivel a cikk hátralévő részében csak a makroautofágiáról lesz szó, ezért a továbbiakban az egyszerűség kedvéért ezt nevezzük autofágiának.

Az autofágia kulcsfontosságú szerepet játszik az eukarióta sejtek és többsejtű élőlények dinamikus egyensúlyi állapotának biztosításában, és a változó körülményekre adott adaptációs válaszokban. A folyamat alacsony szinten állandóan zajlik valamennyi eukarióta sejtben, így biztosítva az előregedett sejtalkotók és a hosszú féléletidejű, illetve aggregálódott és hibás konformációjú fehérjék lebontását. Ez a bazális autofágia elengedhetetlenül fontos például a terminálisan differenciálódott neuronok normális működésének fenntartásában, mivel az autofág lebontásra képtelen modellállatok hibás konformációjú fehérjék megjelenése nélkül is neurodegenerációs tüneteket mutatnak. Emellett az autofágia tekinthető az egyik legfontosabb sejtszintű stresszválasznak, a folyamat ugyanis számos különböző, a sejt számára előnytelen hatásra fokozódik, mint például éhezés, szérum megvonás, baktérium- és vírusfertőzés vagy oxidatív stressz. Megjegyzendő, hogy ezekben az esetekben a károsodott

sejtalkotók lebontása mellett gyakran a nélkülözhető bioanyagok is lebomlanak, mivel a felszabaduló monomerek bioszintetikus és energiatermelő folyamatok alapanyagaként a túlélést és alkalmazkodást szolgálják. Az autofágia túlzott aktivitása ugyanakkor a sejt pusztulásához vezethet, ami az egyedfejlődés során programozott módon is bekövetkezhet. Az autofágiának a sejtpusztulásban feltételezett szerepét mutatja, hogy a jelenségnek külön neve is van: II-es típusú programozott vagy autofág sejthalál. Fontos azonban kiemelni, hogy pusztuló sejtekben gyakran megfigyelhető az autofág struktúrák megjelenése, ami nem feltétlenül jelenti azt, hogy az autofágia aktív szerepet vállal a sejtpusztulás során. Viszonylag kevés esetben sikerült ugyanis dokumentálni azt, hogy az autofágia hiánya megakadályozná a sejt öngyilkosságát. Úgy tűnik tehát, hogy az autofágia elsődleges feladata a sejtek túlélésének biztosítása.

Az autofágia folyamatát 1960 körül írták le, és tanulmányozásában már a kezdetektől fogva részt vettek hazai kutatók is. Az ELTE Állatszervezettani, mai nevén Anatómai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén az 1960-as években indult autofágia kutatások mind a mai napig sikerrel folynak. Eleinte a különféle állati sejtek bizonyos egyedfejlődési állapotokban vagy hormonkezelés hatására mutatott autofág aktivitását vizsgálták főleg elektronmikroszkóppal, azaz a jelenség morfológiai leírására szorítkoztak.

Az 1990-es évek közepén más laborokban végzett, úttörő élesztő genetikai vizsgálatok azonosították az első olyan géneket, melyek aktivitása szükséges az autofagoszómák kialakulásához [1]. Ezek a később egységesen *Atg* és egy szám rövidítésével jelölt gének többsége evolúciósan konzervált, homológjaik növényekben és állatokban is megtalálhatók. Az *Atg* gének felfedezése hatalmas lökést adott az autofágia kutatásának. Egyrészt így vált lehetségessé a folyamat specifikus biokémiai és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata megfelelő fúziós fehérje riporterek és ellenanyagok felhasználásával. Másrészt funkcionális genetikai analízis révén tesztelhetővé vált, hogy az *Atg* gének funkciójának gátlása (mutánsok, RNS interferencia vagy domináns-negatíván ható génváltozat vizsgálatával) milyen hatással van egy adott folyamatra.

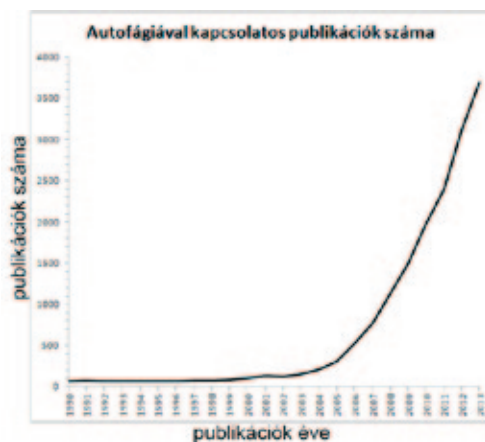
A 2000-es évekre már ismertté vált, hogy az *Atg* fehérjék több komplexet/funkcionális egységet alkotnak, és ezek egymással együttműködve vesznek részt a fagofór és az autofagoszóma kialakításában. Az autofágiát szabályozó fehérjekomplexek közül a hierarchia csúcsán az *Atg1* kináz komplex (állati sejtekben ezt az *Atg1/ULK1*, *Atg13*, *Atg17/FIP200* és az *Atg101* alkotja) helyezkedik el, melyet közvetlenül a sejtek anyagcseréjének központi regulátora, a TORC1 (target of rapamycin complex 1) szerin-treonin kináz komplex irányít. A TORC1 a növekedési jelekre (pl. IGF, azaz insulin-like growth factor) aktiválódó jelátviteli útvonalak és a sejtben lévő tápanyagok és egyéb fontos molekulák (pl. aminosavak, glukóz, oxigén) szintjéről kapott információkat összegezve szabályozza a sejtnövekedést és az autofágiát. Növekedési faktorok jelenlétében, amennyiben a tápanyag- és oxigénszint is megfelelő, az aktív TORC1 (bizonyos kulcsfehérjék foszforilációjával) serkenti a transzlációt (*S6K*, *4EBP*) és gátolja az autofágiát (*Atg1*). A növekedési jel elmaradása, vagy az aminosavak szintjének csökkenése viszont a TORC1 inaktiválódását eredményezi, aminek következtében

az Atg1 komplex aktivitása megnő és fokozódik az autofagoszómák képződése. Ehhez szükséges a többi Atg fehérje működése is. A Vps34 lipid kináz komplex (alegységei: Vps34, Vps15, Atg6/Beclin1, és az autofág útvonal esetén az Atg14) a fagofór és az autofagoszóma membránban található foszfatidil-inozitol-3-foszfátot (PI3P) állít elő. Ez a foszfolipid bizonyos effektor fehérjéket (mint pl. a DFCP1 vagy az Atg18/WIPI családba tartozó fehérjék) megkötve segíti az autofág struktúrák kialakulását. Az autofagoszóma biogenezisében fontos szerepe van az Atg9-nek is, mely az egyetlen transzmembrán fehérje az Atg géntermékek között. Feltételezik, hogy az Atg9 egy vezikuláris transzport útvonal részeként segíti különféle forrásokból (Golgi, plazma membrán/endoszómák) a képződő fagofórhoz történő membránzállítást. Végül, de nem utolsósorban, az Atg8 családba tartozó ubikvitin-szerű fehérjék (ide tartozik emlősök esetén az LC3 is) lipidációja során a szolubilis Atg8-ból (Atg8-I/LC3-I) foszfatidiletanolaminnal konjugált Atg8-II/LC3-II jön létre, melyet E1-szerű (Atg7), E2-szerű (Atg3, Atg10) és E3-szerű (Atg5-Atg12-Atg16 komplex) fehérjék segítenek elő. Az Atg8-II lipid horgonyával a fagofór membránjához kapcsolódik, és a korábban említett Atg1 és Vps34 fehérjekomplexek kötésével segíti nemcsak az autofagoszómák kialakulását, hanem a szelektív autofág szubsztrátok lebontását is [2].

Érdemes megjegyezni, hogy korábban az autofágiát egy aspecifikus folyamatnak gondolták, ami többé-kevésbé véletlenszerűen bontja le a citoplazma adott részeit. Mára már ismertté váltak olyan sejten belüli receptorok, amelyek sérült sejtorganellumok és ubikvitinált fehérjéket tartalmazó aggregátumok szelektív autofág lebontását teszik lehetővé. Az ehhez szükséges autofág adaptorok közül a p62/SQSTM1 fehérjéről írták le elsőként, hogy a lebontandó anyag kijelölése és a fagofórhoz való irányítása a feladata [3]. Számos doménje közül az UBA (Ubiquitin Associated) felelős a poliubikvitinált fehérjék megkötéséért, a PB1 (Phox and Bem1) segítségével pedig több p62 molekula képes multimert képezni, így egy p62-ből és ubikvitinált fehérjékből álló aggregátum jön létre. A p62 fehérje rendezetlen régiójában található egy LIR (LC3 Interacting Region) motívum is, mellyel a p62 az Atg8/LC3 családba tartozó fehérjékhez tud kötni. A fagofóron található lipidált Atg8-II fehérjékhez ezért kötődhetnek a p62-t tartalmazó fehérjeaggregátumok, így biztosítva azok autofágiával történő eliminálását. A p62-höz hasonló funkciókkal rendelkező adaptorok sorába tartoznak például az NBR1 és az optineurin fehérjék is. Ismereteink a szelektív autofág receptorok fontosságáról folyamatosan bővülnek, szerepüket leírták már intracelluláris patogének (mint a *Salmonella*, *Mycobacterium*) és sérült mitokondriumok lebontásában is [4].

Az autofágia tehát a közelmúlt és napjaink biológiai kutatásának egyik vezető és töretlenül fejlődő területe, ami az évente ebben a témában publikált cikkek számában is jól tükröződik (1. ábra). Az autofágia kutatásában továbbra is aktív részt vállalunk mi, az ELTE Anatómiai Tanszékének kutatói is, akik 2009-ben Wellcome Trust és OTKA támogatással alapítottunk önálló csoportot. Vizsgálataink középpontjában mindig is egy népszerű modellállat, a *Drosophila melanogaster* állt. A vizsgálati rendszer erőssége, hogy a biológiai folyamatok *in vivo*, egy teljes állatban tanulmányozhatók. További előnyei közé tartozik a rövid generációs idő, az emlősökhöz képest alacsony genetikai redundancia,

valamint az a kiforrott genetikai eszköztár, melynek segítségével könnyedén kivitelezhetünk funkcionális vizsgálatokat.



1. ábra. Az autofágia témájához kapcsolódó publikációk évenkénti számának alakulása a Pubmed adatbázis alapján.

Projektjeink egy része a korábban elvégzett munkák szerves folytatása volt, mint például az *Atg* gének expresszióváltozásának vizsgálata autofágia indukció során. Mind a metamorfózis kezdetén bekövetkező ún. fejlődési autofágia, mind pedig az éhezéssel indukált válasz során kimutatható ezen gének transzkripciójának fokozódása a lárvális zsírtestben, mely az emlősök májával és zsírszövetével hasonló funkciót betöltő metabolikus és raktározó szerv [5, 6]. A legnagyobb mértékű génexpresszió növekedést ebben a szövetben az *Atg8a* mutatja, részben azért, mert az autofág membránokhoz kötött *Atg8a* fehérjemolekulák fele minden egyes autofagoszóma ciklusban lebomlik. A külső membránhoz kapcsolt állomány ugyanis levágódik és újrahasznosul, míg a belső membránhoz kapcsolt állomány a lizoszómába jut. Emellett jelentős indukciót mutat a foszfolipid effektort kódoló *Atg18*, és az autofág adaptor génje, a *p62* (melyet *Drosophila*-ban *Ref2P*-nek is neveznek). Érdeemes megemlíteni, hogy a különféle stresszhatásokra aktiválódó Foxo transzkripció faktor bizonyos *Atg* gének átírásának fokozásával igen fontos szerepet játszik az autofágia indukciójában, amely nemcsak a mi elsőként leírt *Drosophila* kísérleteinkben volt egyértelmű [5], hanem a későbbiekben emlős sejtekben is igazolták homológjainak hasonló funkcióját [7].

Idestova több mint egy évtizede vizsgáljuk az élesztőben leírt *Atg* gének homológjainak működését *Drosophila*-ban. Az elsőként RNS interferencia segítségével jellemzett *Atg3*-at követően az *Atg8* konjugációs rendszer E1-szerű enzimét kódoló *Atg7*-re állítottunk elő null mutánsokat [8, 9]. Az *Atg7* deléciós állatok ugyan életképesnek bizonyultak, azonban a kifejlett gyümölcslegyek progresszív neurodegenerációs tüneteket mutattak, melyet csökkent élethossz és a neuromuszkuláris rendszer hibáját jelző mozgásképtelenség kísért. Az idegsejtek pusztulását feltehetően az ubikvitinált fehérjeaggregátumok drasztikus mértékű felhalmozódása okozta. Ez a megfigyelés teljes mértékben egybevágott a neuronspecifikus *Atg5* és *Atg7* génkiütött egerek vizsgálata során dokumentált tünetekkel, és megalapozták az autofágia ubikvitinált fehérjék lebontásában játszott esszenciális szerepét [9-11].

Az autofág indukció során elsőként az Atg1 kináz komplex aktiválódik. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy ezen fehérjekomplex alegységeinek túlermelletésével az autofág lebontás genetikai úton is fokozható *Drosophila*-ban. Ez a hatás leginkább az Atg1 overexpresszió esetén szembeűnő, de a FIP200 túlermelletése esetén is kimutatható [12, 13]. Megjegyzendő, hogy az autofagoszóma képződés során szintén fontos szerepet játszó Vps34 lipid kináz komplex az endocitózishoz és a lizoszómába irányuló bioszintetikus fehérjetranszportozhoz, azaz a lizoszómális fehérjék célba juttatásához is szükséges. Ezeket a fenotípusokat elsőként karakterizáltuk *in vivo*, Vps34 null mutáns és genetikai mozaik állatok különféle szöveteiben [14]. Érdekes módon a foszfolipid effektor Atg18 és kötőpartnere, az Atg2 igen hasonló szerepet töltenek be élesztőben, mivel funkcióvesztéses fenotípusaik megegyeznek. Ezzel szemben állati sejtekben az Atg18 hiánya megakadályozza a fagofór létrejöttét, míg Atg2 mutánsokban a fagofór membránok halmozódnak fel mind féreg és emlős, mind pedig – saját vizsgálataink alapján – *Drosophila* sejtekben [15, 16].

Az immár több mint öt éve működő labor első projektje egy nagy léptékű, *in vivo* genetikai szűrés volt. Ennek során összesen mintegy 7200 olyan *Drosophila* gén csendesítését vizsgáltuk több lépcsőben, melyek egyértelmű humán homológgal bírnak. Az mCherry-Atg8a fluoreszcens riportert segítségével végrehajtott elsődleges szűrés lényege az volt, hogy autofág struktúrák kialakulását vizsgáltuk éheztetett, genetikai mozaik lárvák zsírtestében. A szomatikus rekombináció révén létrejött, GFP-vel jelölt funkcióvesztéses sejtklónok fenotípusát hasonlítottuk össze az ugyanazon szövetben található vad típusú sejtekével. Az elsődleges szűrés során potenciális találatnak látszó gének autofágiában betöltött funkcióját további független RNS interferencia vonalak segítségével ellenőriztük. Az így igazolt találatokat további fluoreszcens riporterek és immunfestés segítségével rendeztük fenotípus kategóriákba. Az azonosított mintegy száz gén között a már ismert inzulin/TOR útvonal és az Atg gének mellett több olyat is találtunk, melyek autofágiában betöltött szerepét korábban nem ismertük.

A szűrés találatai között feltűnt a Myc transzkripciós faktor, melynek hiányában a sejtekben éhezés hatására nem indukálódott megfelelő mértékben az autofágia. A *Drosophila* Myc humán homológjai jól ismert onkogének, overexpressziójuk számos tumortípus esetén kimutatható. A Myc túlműködésének hatására mind a poliploid zsírsejtek, mind pedig a fejlődő szárny diploid sejtjei nemcsak fokozott növekedést, hanem meglepő módon szintén megnövekedett autofág aktivitást mutattak jól táplált állatokban is. Kimutattuk, hogy az autofág indukciót a Myc fehérjetranszlációt növelő hatása miatt fellépő ER stressz (unfolded protein response) okozza [17].

Az autofágia és a tumorképződés kapcsolata némileg ellentmondásos. Egér modelleken végzett kísérletekből vannak adatok arra vonatkozóan, hogy az autofágia gátlásakor megnő a jellemzően jóindulatú ráktípusok előfordulási gyakorisága. Ugyanakkor arról is szólnak publikációk, hogy az autofágia szükséges bizonyos, különféle stresszhatásoknak kitett ráksejtek életben maradásához és növekedéséhez. Ilyen stresszhatások például az éhezés és az oxigénhiány főként a szolid tumorok belsejében található sejtek esetén, valamint a kemoterápia.

Genetikai episztázis kísérleteink alapján a Myc túltermelés hatására fokozódó sejtnövekedést az Atg gének hiánya vagy az ER stressz útvonal gátlása megakadályozza mind poliploid, mind diploid szövetekben. Ezzel összhangban, a klinikumban már rákellenes terápiákban alkalmazott, a lizoszómális lebontást gátló klorokvin kezelés is meggátolta a Myc sejtnövekedést fokozó hatását [17]. Ezek az adatok azt az izgalmas lehetőséget vetik fel, hogy a Myc funkcionyerés miatt kialakuló tumorsejtek növekedésének és proliferációjának gátlására alkalmas terápia lehet valamilyen autofágia inhibitorral történő kezelés. Ez azért nagy jelentőségű felfedezés, mert a kiterjedt próbálkozások dacára eddig még nem sikerült a Myc ellen alkalmas hatóanyagot fejleszteni, míg ez sikerülhet azon Atg fehérjék esetén, amelyek jól definiált katalitikus centrummal rendelkeznek. *Drosophila* eredményeinkkel összhangban humán sejtek esetén is kimutatták, hogy a Myc szükséges az autofágiához, valamint hogy Myc-függő tumorerő növekedéséhez szükséges az ER stressz-autofágia útvonal egereken [18, 19].

Genetikai szűrésünk során külön csoportba soroltuk azokat a géneket, melyek hiányában az autofagoszóma-lizoszóma fúzió gátlódott. A jellegzetes fenotípus jegyek közé tartoztak a savas autolizoszómák hiánya, az autofágia szubsztrát p62 szintjének megemelkedése, valamint az autolizoszómákhoz viszonyítva apró mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák perinukleáris felhalmozódása. Mivel állati sejtekben az autofagoszóma-lizoszóma fúziót szabályozó faktorokról nem sokat lehetett tudni, célul tűztük ki a fúziós folyamat aktív résztvevőinek jellemzését. A membránok fúziójáért rendszerint a SNARE családba tartozó fehérjék felelősek. A SNARE-ek jellemzően transzmembrán doménnel rendelkező, vagy membrán-asszociált fehérjék, és közös jellemzőjük egy (vagy a SNAP család esetén kettő) SNARE domén jelenléte. Ez egy speciális coiled-coil domén, melynek segítségével a SNARE-ek képesek egymást kötve a membránok fúzióját kiváltó komplexet létrehozni. A SNARE komplex kialakulásához az elfogadott modell szerint összesen négy SNARE domén szükséges. Közülük az egyik membránban három SNARE domén helyezkedik el, míg a másikon egy SNARE domén található. A szűrés során három olyan SNARE fehérjét kódoló gént is azonosítottunk, melyek hiányában az autofagoszóma-lizoszóma fúzió sérült: a *Syntaxin 17*-et (*Syx17*), az *ubisnap*-et (*usnp/dSNAP-29*) és a *Vesicle Associated Membrane Protein 7*-et (*VAMP7*). Mivel ezek közül a *Syx17*-nek és *VAMP7*-nek egy-egy, az *usnp*-nek pedig két SNARE doménje van, a három fehérje együtt képes lehet egy működőképes SNARE komplexet létrehozni.

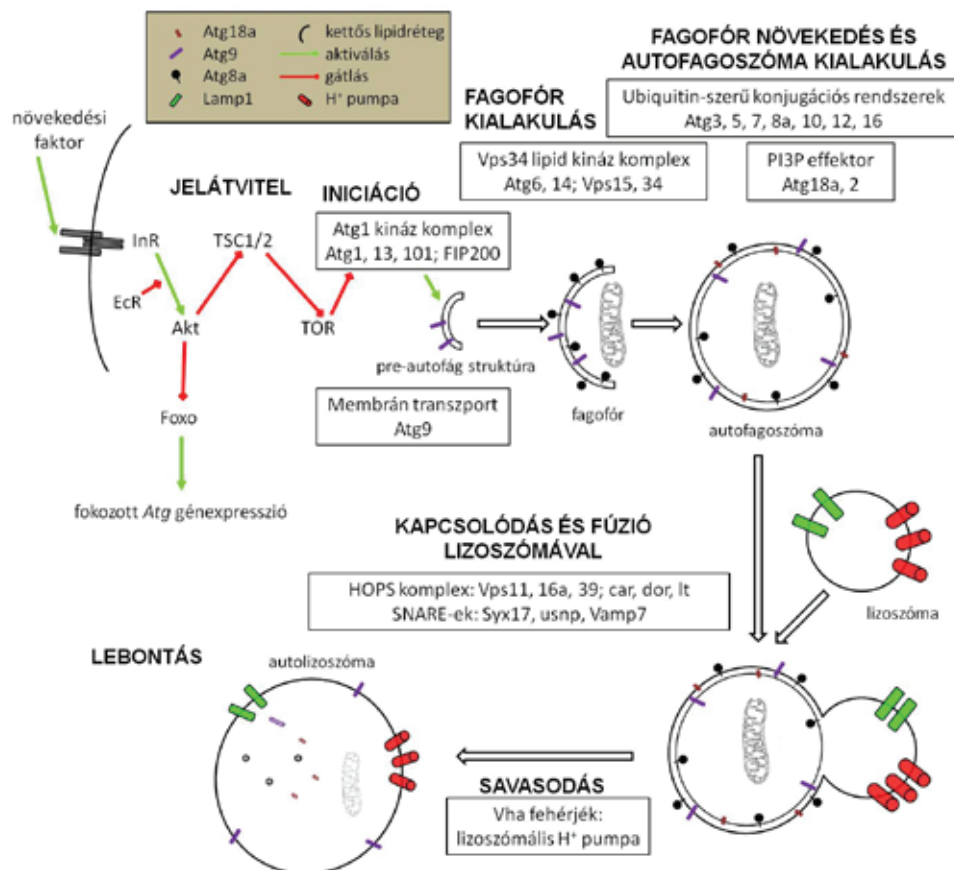
Szerencsére a labor megalakulása óta eltelt öt év során a folyamatos fejlesztéseknek köszönhetően a kezdetektől alkalmazott genetikai és elektronmikroszkópos technikák mellett jelentősen megnőtt az autofágia kutatásához *Drosophila*-ban alkalmazható eszköztárunk. Többféle transzgenikus riporter törzs és ellenanyag révén fluoreszcens mikroszkópia mellett sejtenyészeti és biokémiai módszereket (western blot, ko-immunoprecipitáció) is rutinszerűen használunk. Ezeknek köszönhetően sikerült immunoprecipitációs kísérletekben kimutatnunk mind a sejtenyészetben túltermeltetett és „felcímkézett” három fehérje, mind pedig a kifejlett legyek lizátumában az endogén *Syx17* és *usnp* kölcsönhatását. Fény- és elektronmikroszkópos lokalizációs kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a *Syx17* az autofagoszóma külső membránján helyezkedik el, és feltehetően

a vezikula létrejötte után egy érési folyamat részeként kerül oda, így fúziós kompetencia faktornak tekinthető. A *Syx17* null mutáns imágókon végzett mászás (negatív geotaxis) teszt során azt tapasztaltuk, hogy a mutáns legyek a kontroll állatokhoz képest alig képesek függőlegesen felfelé mászni. Ezt a defektust feltehetően az autofagoszómák neuronális felhalmozódása váltja ki, mivel ezek a sejtek citoplazmájának mintegy ötödét elfoglalják. Így elmondhatjuk, hogy az autofagoszóma-lizoszóma fúzió *in vivo* gátlása az *Atg* gének hiányához hasonló neuromuszkuláris zavarokat eredményez [20]. Cikkünk revíziója során jelent meg egy párhuzamos kutatásból született publikáció, melyben humán sejtenyészetben szintén leírták a Syntaxin 17 komplex tagjainak szerepét az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban [21].

Az eukarióta membránok egyesülésében a SNARE fehérjék mellett az úgynevezett pányvázó komplexek is fontosak, melyek a fúzió korai szakaszában a két membránt összekötik. A szűrés során azonosítottuk a HOMotypic fusion and vacuole Protein Sorting (HOPS) pányvázó komplexnek mind a 6 alegységét (Vps11, Vps16A, deep orange/dor/Vps18, carnation/car/Vps33, Vps39, light/lit/Vps41), melyek bármelyikének csendesítése a *Syx17* komplexhez hasonló funkcióvesztéses fenotípust mutatott, összhangban a HOPS-szal kapcsolatos élesztő adatokkal. Ez a felfedezés azért lehet fontos, mert ellentmondásos cikkek jelentek meg a HOPS autofágiában betöltött szerepéről állati sejtekben, ráadásul a *Syx17* SNARE komplex tagjainak nincsen egyértelmű élesztő homológja. Kimutattuk, hogy a HOPS a *Syx17*-tel kölcsönhatva segíti a SNARE komplex összeszerelődését. A HOPS-ról ismert, hogy az endoszóma-lizoszóma fúzióban és a lizoszóma biogenezisben is szerepel, melyet mi is igazoltunk. Mivel a *Syx17* mutánsok nem mutattak ilyen endocitózis és lizoszóma-biogenezis hibákat, feltételezzük hogy a *Syx17*-HOPS kölcsönhatás specifikusan az autofágiához szükséges [22]. Adatainkhoz hasonló eredményekre jutott egy velünk párhuzamosan emlős sejteken dolgozó japán kutatócsoport is, és ez esetben a két független cikk közlését koordináltuk [23].

Bár egyre többet tudunk az autofágia molekuláris szabályozásáról (2. ábra), még bőven akadnak felfedezni való kérdések. Laborunknak továbbra is fontos kutatási területe az *Atg* gének működésének vizsgálata (ld. később), és az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban szereplő további faktorok megismerése és leírása. Jelenleg is dolgozunk a késői endoszóma-lizoszóma membránforgalom fő szabályozója, a szintén a szűrés során azonosított Rab7 kisméretű GTP-áz és aktivátora, a Mon1-Ccz1 komplex pontos autofágiában betöltött szerepének meghatározásán.

Az autofágia fontosságát már számos szövetben bemutatták, azonban meglepő módon az emésztőszervrendszer működésében betöltött funkciói még nem ismertek. Az elfogyasztott tápanyaggal együtt mutagén és toxikus vegyületek, baktériumok és vírusok is kapcsolatba kerülhetnek emésztőrendszerünk sejtjeivel. A felszíváson kívül bélrendszerünk legfőbb feladata a szervezet védelme is. A mérgezés vagy fertőzés hatására pusztuló bélhámsejteket az ún. szöveti őssejtekből kialakuló új sejtek pótolják, mind emlősök, mind pedig *Drosophila* esetén.



2. ábra. Az autofágia molekuláris mechanizmusa. Növekedési faktorok jelenlétében, például az inzulin-receptor (InR) közvetített úton aktiválódik az Akt1, amely gátolja a TSC1/2 (tuberous sclerosis) komplexet. Ebben az esetben a TOR (target of rapamycin) kináz aktivása megnő, és gátolja az autofágia iniciációjában központi szerepet játszó Atg1 kináz komplexet. A *Drosophila* metamorfózisának kezdetén a vedlési hormon ecdizon receptorának (EcR) aktiválódásával, vagy korábbi stádiumú még táplálkozó lárvákban éhezés esetén a TOR gátlódik, ami autofágiát indukál. Az Atg1 kináz komplex (Atg1, Atg13, Atg101, FIP200) aktiválódása mellett az Atg9 membrán transzport fehérje szállít vezikulákat a létrejövő pre-autofág struktúrákhoz. A fagofór (izoláló membrán) kialakulásához szükséges a Vps34 lipid kináz komplex (Atg6, Atg14, Vps15, Vps34) működése. A fagofór érése és növekedése során körbeveszi a citoplazma egyes elemeit. Széleinek fúziója révén bezárul, és így létrehoz egy kettős membránnal határolt vezikulát. Ezt autofagoszómának nevezzük, melynek membránjában az Atg8a mellett jelen lehet az Atg18a és az Atg9 is. Az éréshez és az autofagoszóma kialakulásához szükséges a Vps34 aktivitása révén keletkező PI3P (foszfatidil-inozitol 3-foszfát) effektor Atg18a-Atg2 komplex és az ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek (Atg3, Atg5, Atg7, Atg8a, Atg10, Atg12, Atg16) működése is. Az autofagoszóma késői endoszómákkal és lizoszómákkal történő fúzióját a HOPS (homotypic vacuole fusion and protein sorting) pányvázó komplex megfelelő SNARE fehérjékkel (Syx17, SNAP29/usnp, Vamp7) történő kölcsönhatása biztosítja. A lizoszóma membránjában található, erősen glikozilált Lamp (lysosome associated membrane protein) fehérjék a membránt védik a savas hidrolázoktól. A lizoszómális protonpumpa (v-, azaz vakuoláris ATPáz), melyet *Drosophila*-ban a Vha fehérjék építenek fel, alakítja ki a lumenre jellemző savas pH-t. Az autolizoszómában működő lebontó enzimek (savas hidrolázok) hatására a bekebelezett anyag építőköveire bomlik. Az ábra forrása: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/onemesztes/index.html>.

Ezen szöveti őssejtek - más néven bél őssejtek - aszimmetrikus sejtosztódás során megújítják önmagukat és egy progenitor sejtet hoznak létre, melyet *Drosophila*-ban enteroblasztnak nevezünk. A progenitor sejtekből alakulnak ki a bél funkcióit ellátó, terminálisan differenciálódott hámsejtek. Az őssejtek

megfelelő osztódási aktivitásának szabályozása tehát központi fontosságú a bél egészséges működésének szempontjából, ami szükséges a szervezet normál homeosztázisának fenntartásához. Az emberi vékony- és vastagbélhez nagymértékben hasonlít a kifejlett gyümölcslegyek középbele, ezért számos alapvető biológiai jelenség tanulmányozható ebben a kísérleti rendszerben. A modell jelentőségét tükrözi, hogy az elmúlt 6-8 év folyamán a bél őssejtek osztódásában és stresszhatásokra adott válaszában szerepet játszó több jelátviteli útvonalat a muslicában azonosítottak elsőként.

Egerekben már kimutatták az autofágia fontos szerepét a vérképző őssejtek és a neuroblasztok fenntartásában és osztódási kapacitásának megőrzésében, de nem világos még, hogy ezek a megfigyelések általában igazak-e minden őssejt típus esetén. Célul tűztük ki, hogy az elmúlt években kifejlesztett riporter rendszereink és genetikai eszköztárunk felhasználásával megvizsgáljuk a *Drosophila* bél őssejtekben zajló autofág folyamatokat, és azok potenciális szerepét a bél homeosztázisának fenntartásában. Előzetes eredményeink alapján elmondható, hogy a bélben található szöveti őssejtekben magas szintű autofágia figyelhető meg. Tervezzük, hogy megvizsgáljuk az autofágia őssejt-specifikus gátlásának hatását a bél őssejtek osztódási kapacitására, valamint a differenciálódásra. Ez azért is fontos, mivel számos gyógyszer befolyásolhatja az autofágiát, és orális alkalmazás esetén a bél sejtjei szembesülnek ezzel először, ráadásul nagy dózisban. A bélrendszert érő károsító hatások következtében pusztuló sejteket a bél őssejtek proliferációjával keletkező újabb hámsejtek pótolják, így ezeknek a szerv regenerációs képességében is központi szerepük van. Laboratóriumi körülmények között bélgyulladás modellezésére rendszerint a DSS (dextran sodium sulfate) nevű mérget etetik az adott modellállattal. A DSS által kiváltott károsodásokat az őssejtek valamilyen módon érzékelik és elkezdenek osztódni. Érdekes lesz megvizsgálni az autofágia szerepét a regeneráció folyamán megfigyelhető kompenzációs sejtosztódásban is.

A bélrendszerbe kerülő baktériumok gyakran megfertőzik a bélhámsejteket, azonban a bejutó patogének egy intracelluláris „immunválasz”, azaz szelektív autofágia (xenofágia) révén eliminálódhatnak. Fehérvérsejtek esetén már kimutatták, hogy a xenofágia folyamatához a központi *Atg* gének mellett specifikus adaptor fehérjék is szükségesek, melyek felismerik az ubikvitinálódó patogéneket. Tervezzük olyan kísérletek elvégzését, mely során opportunistá baktériumokkal (mint pl. a *Pseudomonas aeruginosa* vagy *Enterococcus faecalis*) fertőznénk a legyeket. Ismert, hogy ilyen baktériumtenyészetek etetése is kiváltja a szöveti bél őssejtek proliferációját, mivel rengeteg enterocita elpusztul ilyenkor. Célul tűztük ki, hogy a fertőzés során megvizsgáljuk az autofágia szerepét ezekben a sejtekben. Ehhez rendelkezésünkre állnak a szükséges genetikai eszközök, tehát tudjuk specifikusan csak az őssejtekben, vagy csak a terminálisan differenciálódott bélhámsejtekben gátolni az autofágiát. Ezen felül a *Drosophila* eddig ismert egyetlen specifikus autofág adaptorának, a p62-nek a fertőzések során betöltött szerepét is tervezzük tesztelni. Ezeket a vizsgálatokat nemcsak sejttípus-specifikus gátlások révén, hanem az életképes *Atg* null mutáns gyümölcslegyek belének tanulmányozásával is meg tudjuk erősíteni. Előzetes kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy ilyen autofág mutáns állatok belében korai

diszplázia - nem differenciálódott enteroblasztok felhalmozódása - figyelhető meg, ami valószínűleg a bél felgyorsult öregedésének tudható be.

Az autofágia kutatásának egyik fontos kérdése még mindig az, hogy hogyan jön létre a fagofór és az autofagoszóma, és milyen szerepet játszanak ebben a különféle Atg fehérjék és kölcsönható partnereik. Számos publikáció jelent már meg ebben a témában, melyekben leírták, hogy sejttenyésztésben az autofág struktúrák létrejöttéhez szükséges membránok sokféle forrásból érkehetnek: ER, mitokondrium, késői endoszóma, plazmamembrán. Különösen fontos lenne tudni azonban, hogy milyen szövetspecifikus eltérések vannak az autofágia szabályozásában. Az Atg gének ugyan változó mértékben, de minden szövetben kifejeződnek, ami feltehetően nem igaz bizonyos, ezen fehérjék aktivitását moduláló kölcsönható partnerekre. Terveink között szerepel egy olyan transzgenikus muslica könyvtár létrehozása, melyben az egyes törzsek adott Atg transzgen hemagglutinin (HA) címkével ellátott változatát fejezik ki fiziológiai szinten, azaz az endogén promóter hatása alatt (tehát nincs overexpresszió). Így élő állatokban könnyen vizsgálhatjuk, hogy adott Atg fehérje kifejeződése hogyan változik az életkor és vizsgált szövet függvényében, vagy hogy mi történik a sejten belüli eloszlásával autofágia indukció során. Elsősorban arra szeretnénk használni ezt a könyvtárat, hogy Atg fehérjék új kölcsönható partnereit azonosítsuk. Eddig egyetlen ehhez hasonló, nagyobb léptékű proteomikai vizsgálatot publikáltak, melyben tenyésztett HEK (human embryonic kidney) sejtekben overexpresszált Atg fehérjék kapcsolatrendszerét tesztelték [24]. A mi megközelítésünk fő előnye, hogy egy teljes állatban vagy célzottan annak bármely szövetében kutassunk új partnerek után, hiszen egy adott sejt típusban csak a proteóm egy kis része fejeződik ki. Célunk, hogy például az agyban azonosítsunk új kötőpartnereket, mivel a neuronok homeosztázisában különösen fontos szerepet tölt be az autofágia, nemcsak az ubikvitinált fehérjeaggregátumok, hanem a különféle neurodegenerációt okozó aberráns fehérjék (mint pl. a mutáns huntingtin) lebontása révén. Az idén elnyert MTA Lendület pályázatnak köszönhetően ezeket a kísérleteket a *Drosophila* genetikai kutatásokban élen járó MTA SZBK-ban fogjuk kivitelezni, kiaknázva az itt található, legjobban felszerelt hazai proteomikai labor által biztosított lehetőségeket is.

Összegzésül elmondható, hogy az autofágia megfelelő szintje nagyon fontos egészségünk fenntartásában. Jelen cikkünkben ugyan nem tárgyaltuk részletesen, de mára már jól ismert, hogy a folyamat gátlása hozzájárulhat számos emberi kórkép kialakulásához, mint például a rák, neurodegeneráció (pl. Huntington-kór, Parkinson-kór), cukorbetegség, krónikus fertőzések és gyulladás, izomgyengeség és az öregedés [25]. Reményeink szerint kutatásaink hasznosnak bizonyulnak majd ahhoz, hogy jobban megértsük a folyamat molekuláris szabályozását és jelentőségét.

Irodalomjegyzék

- [1] Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **333**: 169-174.

- [2] Mulakkal, N.C., Nagy, P., Takats, S., Tusco, .R, Juhasz, G., Nezis, I.P. (2014) Autophagy in *Drosophila*: from historical studies to current knowledge. *BioMed Res Internat* **2014**: 273473.
- [3] Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**: 24131-24145.
- [4] Randow, F., Youle, R.J. (2014) Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell host & microbe* **15**: 403-411.
- [5] Juhasz, G., Puskas, L.G., Komonyi, O., Erdi, B., Maroy, P., Neufeld, T.P., Sass, M. (2007) Gene expression profiling identifies FKBP39 as an inhibitor of autophagy in larval *Drosophila* fat body. *Cell Death and Differentiation* **14**: 1181-1190.
- [6] Erdi, B., Nagy, P., Zvara, A., Varga, A., Piracs, K., Menesi, D., Puskas, L.G., Juhasz, G. (2012) Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* **8**: 1124-1135.
- [7] Sandri, M. (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Letters* **584**: 1411-1416.
- [8] Juhász, G., Csikós, G., Sinka, R., Erdélyi, M., Sass, M. (2003) The *Drosophila* homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Letters* **543**: 154-158.
- [9] Juhasz, G., Erdi, B., Sass, M., Neufeld, T.P. (2007) Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes and Development* **21**: 3061-3066.
- [10] Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884.
- [11] Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885-889.
- [12] Scott, R.C., Juhasz, G., Neufeld, T.P. (2007) Direct induction of autophagy by atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Current Biology* **17**: 1-11.
- [13] Nagy, P., Karpati, M., Varga, A., Piracs, K., Venkei, Z., Takats, S., Varga, K., Erdi, B., Hegedus, K., Juhasz, G. (2014) Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in *Drosophila*. *Autophagy* **10**: 453-467.
- [14] Juhasz, G., Hill, J.H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E.H., Backer, J.M., Neufeld, T.P. (2008) The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol* **181**: 655-666.
- [15] Lu, Q., Yang, P., Huang, X., Hu, W., Guo, B., Wu, F., Lin, L., Kovacs, A.L., Yu, L., Zhang, H. (2011) The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Developmental Cell* **21**: 343-357.

- [16] Nagy, P., Hegedus, K., Piracs, K., Varga, A., Juhász, G. (2014) Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in *Drosophila*. *FEBS Letters* **588**: 408-413.
- [17] Nagy, P., Varga, A., Piracs, K., Hegedus, K., Juhász, G. (2013) Myc-Driven Overgrowth Requires Unfolded Protein Response-Mediated Induction of Autophagy and Antioxidant Responses in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics* **9**: e1003664.
- [18] Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A.E., Koong, A., Fuchs, S.Y., Diehl, J.A., Mills, I.G., Ruggero, D., Koumenis, C. (2012) ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Inv* **122**: 4621-4634.
- [19] Toh, P.P., Luo, S., Menzies, F.M., Rasko, T., Wanker, E.E., Rubinsztein, D.C. (2013) Myc inhibition impairs autophagosome formation. *Human Mol Gen* **22**: 5237-5248.
- [20] Takats, S., Nagy, P., Varga, A., Piracs, K., Karpati, M., Varga, K., Kovacs, A.L., Hegedus, K., Juhász, G. (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **201**: 531-539.
- [21] Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Mizushima, N. (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**: 1256-1269.
- [22] Takats, S., Piracs, K., Nagy, P., Varga, A., Karpati, M., Hegedus, K., Kramer, H., Kovacs, A.L., Sass, M., Juhász, G. (2014) Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* **25**: 1338-1354.
- [23] Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., Mizushima, N. (2014) The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell* **25**: 1327-1337.
- [24] Behrends, C., Sowa, M.E., Gygi, S.P., Harper, J.W. (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**: 68-76.
- [25] Mizushima, N., Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**: 728-741.



Takáts Szabolcs 2009-ben csatlakozott a laborhoz MSc szakdolgozó hallgatóként. Az OTDK versenyen elért első helyezése, a TTK Kiváló Hallgatója díj elnyerése és 2011-es diplomázása után PhD hallgatóként folytatta kutatómunkáját. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió molekuláris mechanizmusainak felderítésében elért eredményeiért elnyerte az MBKE 2014-es Bio-Science díját. Jelenleg doktorjelöltként (tudományos segédmunkatárs) dolgozik a csoportban, és továbbra is ezt a témát kutatja *Drosophila* modellen.



Nagy Péter 2009-ben PhD hallgatóként csatlakozott a laborhoz. Két társával közösen több mint két évig a *Drosophila* lárvális zsírtestében éhezéssel indukált autofágiához szükséges gének azonosításával foglalkozott, egy teljes konzervált genomra kiterjedő RNS interferencia vizsgálat kivitelezésével. Számos, már egyéb élőlényekben ismert autofág gén vizsgálata mellett bizonyította, hogy a Myc transzkripciós faktor serkenti az autofágiát, valamint hogy az autofágia szükséges a Myc-indukálta túlnövekedéshez. 2014-ben szerzett PhD fokozatot, és eredményeiért Erdős Pál kutatási ösztöndíjat nyert. Jelenleg tudományos munkatársként dolgozik a csoportban, és továbbra is az autofágia és a sejtnövekedés kapcsolatát vizsgálja.



Juhász Gábor 1996-ban, diákkörös hallgatóként kapcsolódott be az autofágia kutatásába, az ELTE Állatszervezettani Tanszékén akkoriban először alkalmazott *Drosophila* modellen. 1999-ben szerzett biológus diplomát és 2004-ben PhD fokozatot Sass Miklós témavezetésével. Posztdoktor kutatóként az Egyesült Államokban dolgozott Tom Neufeld laborjában, hasonló témán. 2009-ben alapított önálló kutatócsoportot az ELTE Anatómiai, Sejt-és Fejlődésbiológiai Tanszékén a Wellcome Trust és OTKA kutatási támogatásával. Az MTA Bolyai ösztöndíját két alkalommal is elnyerte, és a 2014-es Lendület pályázat támogatásával 2015-ben a SZBK-ban alapíthat új csoportot.

NEGYED SZÁZAD A TOLERANCIA ÉS HUMÁNUM SZOLGÁLATÁBAN



XVI. Károly Gusztáv svéd király a Királyi Sarkcsillagrend Parancsnoki Fokozatát adományozta Orosz Ferencnek, a Raoul Wallenberg Egyesület korábbi elnökének, a Wallenberg-emlékév kezdeményezéséért és a Wallenberg-emlékbizottságban végzett munkája elismeréseként. A kitüntetést Karin Olofsdotter nagykövet adta át június 16-án. Orosz Ferenc az alábbiakban vall a biokémikus kutatásai mellett, humánumból végzett civil tevékenységéről, a kitüntetés háttéről.

2012-ben ünnepeltük Raoul Wallenberg svéd diplomata, magyar zsidók tízezrei megmentője születésének 100. évfordulóját. Ebből az alkalomból Magyarország kormánya 2012-t Wallenberg-emlékévnek nyilvánította. Wallenberg sorsa máig sem tisztázott; csak az bizonyos, hogy a sztálini terror áldozata lett. A nevét viselő egyesület 1988. december 17-én alakult, Derdák Tibor szociológus, középiskolai tanár kezdeményezésére, nem sokkal azután, hogy azt az akkoriban elfogadott új egyesülési törvény lehetővé tette. Az egyesület munkája kezdettől fogva kettős cél jegyében folyt: egyrészt Raoul Wallenberg és más embermentők emlékének ápolása, másrészt a „Mit csinálna ma Wallenberg?” kérdés jegyében az antiszemita, rasszista, kirekesztő nézetek és megnyilvánulások elleni határozott fellépés, tiltakozás illetve a megelőzésük céljából végzett felvilágosító munka, toleranciára nevelés, a pozitív példák felmutatása és társadalmi hidak építése.

Minden évben megemlékezést tartunk Wallenberg születésnapján, augusztus 4-én (ez mint a „Humánus Napja” vált ismertté) és eltűnése évfordulóján, január 17-én. Egyik kezdeményezői voltunk a Szent István parki Wallenberg-emlékmű újraállításának; számos emléktáblát avattunk Wallenberg és munkatársai, köztük a magyar Langfelder Vilmos emlékére. Természetesen nem lehet az embermentőkre emlékezni a Holokauszt áldozataira való emlékezés nélkül. Az idei 70. évforduló alkalmából Budapest egyik központi helyén – a Szabadság téren – tartottunk naponta csendes, gyertyás megemlékezést május 14-től július 9-ig, minden egyes nap az aznap elhurcoltakra emlékezve, tablókön bemutatva a deportálásokat menetrendjét. A Wallenberg életét bemutató kiállításunk megtekinthető az egyesület irodájában, és Nagykanizsától Sajószentpéterig, Soprontól Baracskaig számos más helyen is bemutattuk. A kiállításnak helyet adott már nemcsak iskola, egyetem és közösségi ház, hanem pláza és börtön is. A megnyitók alkalmával mindig megragadjuk az alkalmat, hogy az eseményt összekössük valamilyen, az esélyegyenlőség, a (in)tolerancia témaköréhez kapcsolódó beszélgetéssel, kulturális programmal. Az egyesület első évtizedében kiemelt helye volt a romák integrációját elősegítő tevékenységnek, beleértve ebbe a konkrét jogsegélyszolgálatot is. Ezt a munkát – másoké mellett – egykori elnökeink, a néhai Csalog Zsolt író és Bíró András alternatív Nobel-díjas neve fémjelezte.

Legbüszkébbek a „Régen volt? Hol is volt?” középiskolai vetélkedőnkre vagyunk. Kezdetben csak a fővárosban, majd országosan, idén már az egész Kárpát-medencében, több mint 200 iskola csapatának részvételével folyt a verseny, amelynek témái a Holokauszt, az embermentés és a zsidó és magyar kultúra együttélése voltak. Partnerünk ebben a munkában a Holokauszt Emlékközpont és a Wallenberg nevét viselő középiskola. A múlt alaposabb megismerése - különös tekintettel arra, hogy mekkora hiányosságok vannak és milyen tévképzetek élnek a közvéleményben a fenti kérdéseket illetően -, már önmagában is elősegíti a toleranciára való készséget. Nemcsak lexikális adatokat kértünk számon, hanem arra is lehetőséget adtunk, hogy a diákok kreatív módon számot adhassanak személyes viszonyulásukról a témához.

Wallenberg emlékére más szervezetekkel karöltve díjat is alapítottunk, amit minden év január 17-én adunk át. Evvel olyan személyek, szervezetek áldozatos munkáját, emberi, közösségi magatartását ismerjük el, akik tevékenységükkel, életútjukkal példát mutatnak embertársaiknak a Magyarországon hátrányos helyzetben élők, diszkriminációt elszenvedők érdekében, az emberi és állampolgári jogok törvényekben biztosított érvényesítésében kifejtett tevékenységükkel. Jellemzően évente három díjat adunk ebben a témában és egyet a Holokauszt emlékezetéhez kapcsolódóan. Olyan, többnyire kevésbé ismert szociális munkások, pedagógusok, önkormányzati vezetők, egyházi személyek részesültek eddig a díjban, akik a végeken építenek és békítenek, évtizedek óta munkálkodva.

Nemcsak adunk, hanem kapunk is díjakat. Az immár több mint negyed százados munkálkodásunk során társadalmi munkájáért az egyesület több vezetője is részesült hazai és nemzetközi kitüntetésben. 25 éves működésünk alkalmából tavaly megkaptuk az Európai Parlament által adományozott „Európai Polgár díjat”, amit az egyesület soros elnöke, Sipos András Brüsszelben vehetett át a parlament elnökétől, míg egy másik vezetője – e sorok írója, az egyesület alapító tagja – az Emberi Erőforrások miniszterétől vette át az „Esélyegyenlőségért” díjat „az esélyegyenlőség előmozdítása, megteremtése terén elért kiemelkedő eredmények, valamint a hátrányos helyzetű társadalmi csoportokhoz tartozó személyek jogainak érvényesítéséhez és az e jogok, valamint az emberi méltóság védelmében való fellépés és védelem minél szélesebb körű érvényesítése és népszerűsítése területén végzett kiemelkedő tevékenysége” elismeréseként.

Orosz Ferenc
tudományos igazgatóhelyettes
MTA TTK Enzimológiai Intézet
Budapest

AZ ÖSSZEFOGÁS EREJE, „MEDICINE IN PROTEINS”

2014. május 1-től a Fehérjetudományi Kiválósági Együtműködési Program (MedInProt) vezetésére kérte fel Pállinkás József, a Magyar Tudományos Akadémia korábbi elnöke Perczel Andrászt az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport vezetőjét, az MTA levelező tagját. A program első ütemében a négy intézmény - az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Semmelweis Egyetem és az MTA Természettudományi Kutatóközpont – együttműködését 2015. június 30-ig 150 millió Ft-tal támogatja az MTA.

Perczel András, a kuratórium elnöke 2014. május 20-án tartott nyílt alakuló ülésen mutatta be a MedInProt programot, ami **egyedülálló** és **hiánypótló** kezdeményezés Magyarországon. Céljai:

- a különböző fehérjetudományi szakterületek összekapcsolása,
- hálózatba szervezése és megerősítése,
- a versengő együttműködés gyakorlatának meghonosítása,
- a szakterületi szinergizmus katalizálása, valamint
- a már elismert kutatók együttműködésének segítése.

A kuratórium elnöke a program működésének felügyeléséhez és a pályázatok bírálásához héttagú kuratóriumot állított össze kiemelkedő hazai kutató szakemberekből. A kuratórium tagjai (abc sorrendben):

- Keserű György Miklós, az MTA Természettudományi Kutatóközpont főigazgatója,
- Ligeti Erzsébet, a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének egyetemi tanára, az MTA rendes tagja,
- Málnási-Csizmadi András, az ELTE TTK Biokémia Tanszék egyetemi docense,
- Molnár Mária Judit, A Semmelweis Egyetem tudományos rektorhelyettese,
- Pongor Sándor, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem egyetemi tanára, az International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (Trieszt) kutatója, MTA külső tagja,
- Salgó András, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékének vezetője,
- Tompa Péter, az MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet kutatója és VIB Structural Biology Research Center (SBRC), Brüsszel, igazgatója.

A program első ütemében (2014-2015) lehetőség nyílik a fehérjetudományok területére eső kimagasló kutatások támogatására, kisebb eszközök és berendezések megvásárlására, illetve néhány nagyértékű műszeren gépidő vásárlására. A MedInProt Program támogatni kívánja szakkonferenciák, előadássorozatok, szakmacsoport-gyűlések szervezését, valamint angol nyelvű M.Sc. fehérjetudományi program beindítását. Távlatosabb célok között szerepel egy fehérjetudományi *troubleshooting* és *hotline* kiépítése, szakkönyvek beszerzése, írása és fordítása.

A MedInProt program első ütemében kétszer, tavasszal és ősszel írt ki pályázatokat, melyre jelentkezhettek minden fehérjekutatásban dolgozó munkatárs, aki legalább 1 éve a BME, ELTE, SE valamint az MTA-TTK vagy MTA-TKI főállású alkalmazottja és vállalta, hogy a tervezett időpontban egy vagy több kollégájával intenzív szakmai együttműködés keretében fehérjetudományi kérdéseket kutatnak, valamint, hogy eredményeikről rendszeresen beszámolnak.

Az első pályázati kiírásra tavasszal került sor. A Szinergia programra beérkezett pályázatok közül a héttagú szakmai kuratórium transzparensszerűen választotta ki a nyerteseket 2014. június 16-án, mely döntés értelmében a beérkezett tizenöt pályázat közül hét csoport részesült támogatásban. Az első nyertes pályázók a közös munka megkezdése után először a MedInProt Konferencián, 2014. október 4-én számoltak be addig elért részeredményeikről az Eötvös Loránd Tudományegyetemen. A konferencián köszöntőt mondott Lovász László az Akadémia elnöke, aki a MedInProt programot mintaprojektnek nevezte, és hangsúlyozta, hisz abban, hogy „a tudományt manapság legjobban az együttműködés viszi előre”.

Pálincás József kormánybiztos, az Akadémia korábbi elnöke, a program elindítója kiemelte, hogy a közös munka egyfelől versengéssel, másfelől együttműködéssel jár, és ezek megfelelő egyensúlya teszi a világban versenyképpé a magyar kutatókat, kutatócsoportokat és egyetemeiket.

Fülöp Márta szociálpszichológus a versengés pszichológiájáról tartott előadást „Az együttműködő versengés szerepe a tudományban” címmel, majd Greiner István, a Richter Gedeon Zrt. kutatási igazgatója a fehérjealapú modern gyógyszeriparról, annak szakmai és gazdasági összefüggéseiről beszélt „Fehérje gyógyszerek fejlesztése és gyártása Magyarországon” címmel.

A köszöntők és a témához kapcsolódó előadások után az első nyertes pályázók mutatták be együttműködésüket.

Az áttétképzést és gyulladást fokozó S100A4 fehérje működése és gátlása:

Bodor Andrea – Kalmár Lajos – Nyitray László – Pál Gábor

Az S100A4 fehérje, (más néven metasztazin) a sejtek migrációs, inváziós viselkedését serkentve, valamint programozott pusztulásukat (apoptózis) is befolyásolva fontos szerepet játszik rosszindulatú daganatok áttétképződésében és krónikus gyulladással járó folyamatokban.

Az S100A4 a migrációban és invázióban betöltött szerepét a nem-izom miozin 2A (NM2A) motorfehérjéhez kötődve, míg apoptózis befolyásoló szerepét a p53 tumor szupresszor fehérjéhez kötődve látja el.

Ebben az alapvető kutatási és terápiás célokat egyaránt kitűző projektben az ELTE TTK Biológiai és Kémiai Intézetének, valamint az MTA TTK Enzimológiai Intézetének kutatóiként arra vállalkoznak, hogy biofizikai mérések, szerkezeti bioinformatikai elemzések, NMR spektroszkópia valamint irányított fehérjeevolúció kombinálásával mindkét említett komplexnél feltárják a komplexképzés molekuláris részleteit és a komplex stabilitását biztosító kölcsönhatásokat.



Keserű György Miklós, Pálinkás József, Lovász László, Perczel András, Frei Zsolt.

Extracelluláris vezikulák kölcsönhatása a komplementrendszerrel:

Búzás Edit – Józsi Mihály

A sejtek által kibocsátott, gyulladásos folyamatokban szerepet játszó extracelluláris vezikulák a véráramba, szövetközi térbe kerülve találkoznak az immunrendszer egyik fontos veleszületett elemével, a komplementrendszerrel. A projekt célja annak felderítése, hogy miképpen aktiválják a komplementrendszert a különböző, sejt eredetű extracelluláris vezikulák, illetve az aktiválódott komplement a vezikulákkal való kölcsönhatása révén miként befolyásolja az extracelluláris vezikulák sejtekhez kötődését, és a sejtek aktivációját.

Egy újonnan felfedezett gyulladáskeltő folyamat nyomában:

Cervenak László - Gál Péter - Pál Gábor

A gyulladásos megbetegedések súlyos egészségügyi problémát jelentenek; kezelésükre sok esetben nem áll rendelkezésre megfelelő terápia, mivel nem ismerjük a gyulladások kialakulásának pontos mechanizmusát és a potenciális gyógyszer-célpont molekulákat sem. A szinergia program keretében három kutatócsoport (az MTA TTK szerkezeti biofizika munkacsoportja, a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika kutatólaboratóriuma és az ELTE Biokémiai tanszékének in vitro evolúciós laboratóriuma) fogott össze egy újonnan felfedezett gyulladáskeltő mechanizmus részleteinek feltárásához. Tanulmányozzák a természetes immunitás szerin proteáz enzimeinek közvetlen sejtstimuláló hatását endotél sejteken és fehérvérsejteken, valamint hatékony gátlószereket fejlesztenek a patológus sejtaktiváció gátlására.

Fehérjéket tartalmazó gyógyszerkészítmények:

Bóta Attila – Marosi György

A makromolekuláris biogyszerek a környezeti hatásokra rendkívül érzékenyek, ezért munkájuk célja olyan hordozó nanostruktúrák előállítása, amelyek a fizikai és kémiai szerkezet stabilitását jobban biztosítják, mint a folyékony parenterális készítmények. Emellett a technológia megbízhatóságának fokozására kemometriával támogatott valós idejű spektroszkópiai módszereket és kisszögű röntgendiffrakciós módszereket fejlesztenek.

Fehérjekomplexek szerepe jelátviteli és karcinogenezis folyamatokban:

Buday László - Nyitray László - Vértessy Beáta

A jelátviteli fehérjék szerepét daganatos megbetegedésekben már régóta széles körűen felismerték, számos példáját részletesen leírták. Együtműködésük ezen molekuláris folyamatok feltárására alapul, több nagyjelentőségű komplex esetében. Az általuk vizsgálni kívánt fehérjék lényegi szerepet játszanak jelátvitelben, DNS károsodások javításában, daganatos megbetegedések kialakulásában vagy az áttétképzésben.

Immunkomplexek által elindított gyulladási folyamatok követésére alkalmas mikrofluidikai rendszer fejlesztése:

Fürjes Péter - Papp Krisztián

A kooperáció lényege egy olyan komplex autonóm mikrofluidikai eszköz és immunológiai módszer kidolgozása, mely a gyulladásban központi szerepet játszó neutrofil granulociták aktivációjának mérésére alkalmas. A kooperáció a mérnöki, anyagmegmunkálási folyamatokat egyesíti a biológiai ismeretekkel: az MTA-TTK munkacsoportja a mikrotechnológiai tudást, az MTA-ELTE munkacsoport az immunológiai szakértelmet biztosítja az együtműködésben. A mikro- és biotechnológia eszközparkját innovatívan használva és fejlesztve, a hagyományos anyagszerkezetek köréből kilépve olyan komplex Lab-on-a-Chip rendszereket hozznak létre, amelyek integrálva alkalmazzák az érzékelő és mintapreparációs lehetőségeket.

Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamatokban:

Bánhegyi Gábor - Sőti Csaba - Vellai Tibor

Orvosbiológiai, társadalmi és gazdasági jelentősége ellenére az öregedés biológiai alapja nagyrészt ismeretlen maradt. Jelen pályázatban az öregedési folyamat kiváltásában alapvető szerepet játszó fehérjéket kívánunk feltárni. Ugyancsak célul tűzték ki az öregedési folyamatot (élettartamot) befolyásoló fehérjék funkcionális kapcsolatának megismerését. Eredményeik elvezethetnek az öregedés betegségek molekuláris hátterének pontosabb megismeréséhez.

Az őszi második pályázati kiírásra, ami a Szinergia programon kívül lehetőséget teremtett műszervásárlási és gépidő vásárlási pályázatok benyújtására is, már harminchárom pályázat érkezett be, melyek közül a kuratórium november 12-ei döntése értelmében 2015. január 1-től tucatnál is több részesül támogatásban.

Az MedInProt program első ütemének lezárásaképpen tavasszal ismét konferencia keretében mutatják majd be az újonnan támogatott kutatócsoportok az eredményeiket, addig is bővebb információ található a <http://medinprot.chem.elte.hu/hu/> honlapon.

A Kuratórium tagjai

SEJTEK SZUPERFELBONTÁSBAN

Lukács András

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet

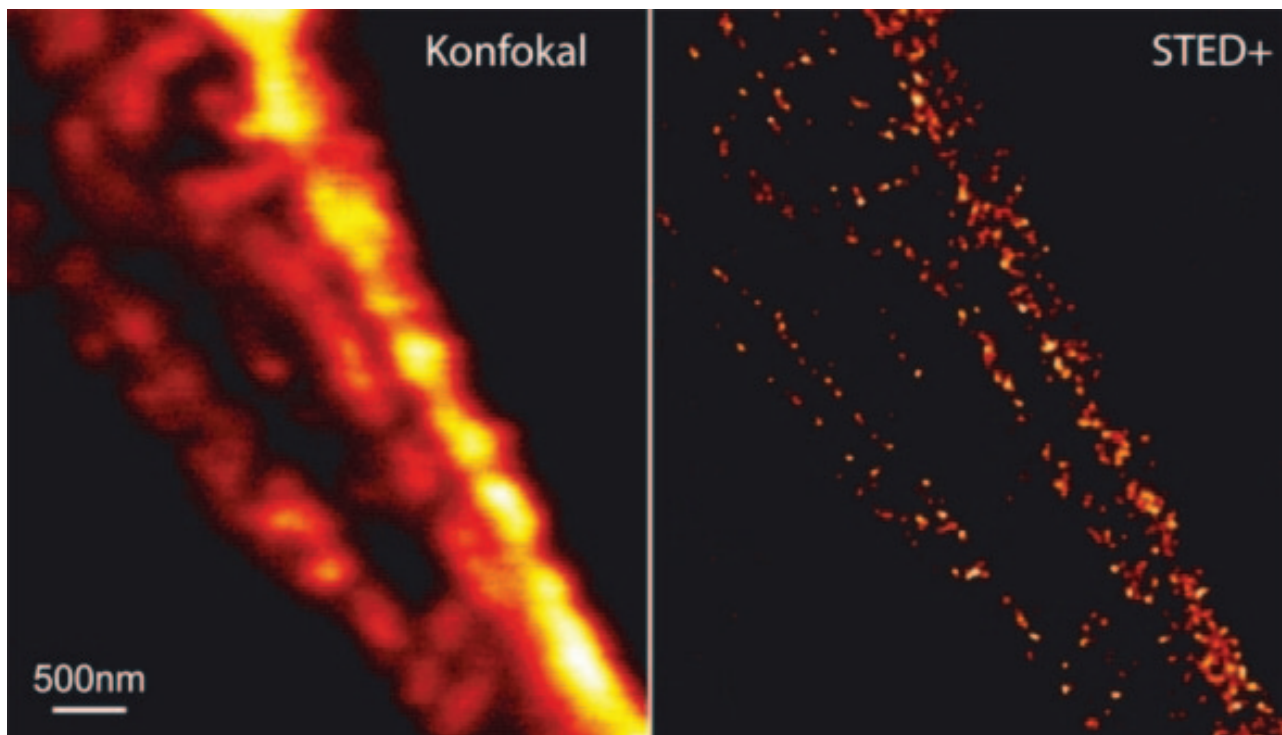
A szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia felfedezéséért ítélte oda a kémiai Nobel-díjat ebben az évben a Nobel Bizottság. Eric Betzig, Stefan Hell és William E. Moerner olyan módszerek kidolgozásáért kapták a díjat, amellyel a mikroszkópok felbontásának útjában álló évszázados akadályt tudták ötletes trükkökkel megoldani.

Ernst Abbe és John W. Rayleigh munkásságának köszönhetően több mint száz évig úgy tűnt, hogy a fénymikroszkópok felbontását nem lehet egy bizonyos ponton túl növelni, ennek ugyanis optikai akadályai vannak. Az Abbe által bevezetett és Rayleigh által módosított képlet szerint az optikai felbontás, vagyis amikor még két különálló pontot külön is látunk, a legjobb optikai elemeket alkalmazva mintegy a hullámhossz fele. 400 nm-es megvilágítás esetén ez gyakorlatilag 200 nm. A hagyományos fénymikroszkópokkal ez alá a határ alá egészen a közelmúltig nem lehetett lemenni.

STED

Az Abbe által felállított szabály nem hagyta nyugodni Stefan Hell-t, aki saját bevallása szerint nem tudta elfogadni, hogy a modern fizika forradalmát követően ez az akadály még mindig érvényben van. Hell a kilencvenes évek közepén két elméleti cikkben dogozta ki azt az eljárást, amellyel ezt az elvet meg lehet kerülni. A szakmában terjedő pletyka szerint a kilencvenes évek elején Hell számára beszűkültek a lehetőségek Németországban, ami miatt Finnország második legnagyobb városában működő kiváló egyetemre ment el dolgozni, és ez hozta el a fordulatot az életében. Turkuban dolgozta ugyanis ki a STED (Stimulated emission depletion, azaz stimulált emisszióval való kioltás) mikroszkóp elvét és itt építette meg az első STED mikroszkópot. Hell módszere, ahogy a nevében is szerepel, a stimulált emisszió jelenségére épül. Az Einstein által közel száz éve leírt jelenség következtében a beérkező foton megszünteti a gerjesztett állapotot, vagyis megszünteti az alkalmazott fluoreszcens jelölő fluoreszcenciáját. A Stefan Hell által Turkuban megépített mikroszkóp egy „hagyományos” konfokális mikroszkópra épül, de az alap lézer mellett – amely a fluoreszcens festékek gerjesztését végzi el – van egy másik lézer, amely a stimulált emisszió megvalósításáért felelős. Ennek a második lézernek a nyalábprofilja – egy elegáns optikai megoldásnak köszönhetően – leginkább egy fánkra hasonlít. A gerjesztő lézer pásztázása következtében a fluoreszcens molekulák világítani kezdenek, ezt követően pásztázza a mintát a STED lézer, amelynek következtében a fluoreszcencia csak a fánk lyukas részében marad meg, mindenhol máshol megszűnik. Ilyen módon a fluoreszkáló rész helyzete nagyon pontosan meghatározható. A módszer kidolgozása során Stefan Hell arra a megállapításra jutott, hogy a helymeghatározás pontossága a fluoreszcens molekula hatáskeresztmetszetének és a lézernyaláb intenzitásának

a szorzatától függ, vagyis ennek az értéknek a maximalizálásával lehet elérni a szuperfelbontást. Hell képlete szerint a STED lézer intenzitásának növelésével akár végtelen kis felbontást is elérhetne, feltéve, ha a minta „túléli” a megvilágítást. Ehhez képest a gyakorlatban elérhető felbontás mintegy 50-70 nm, amely a Leica kommerciális STED mikroszkópjaival is könnyedén elérhető; ez a felbontás mellesleg a laterális jellegzetes érték. Az első generációs STED készülékek függőleges irányú felbontása ennél rosszabb, mintegy 300 nm körül volt, a legújabb fejlesztésű STED-ek esetében ezt az értéket is sikerült jelentősen javítani.



1. ábra. Humán idegsejt képe. A bal oldalon egy hagyományos konfokális mikroszkóppal, a jobb oldalon ugyanez a minta STED-del felvéve. (Forrás: MPI Biophysical Chemistry).

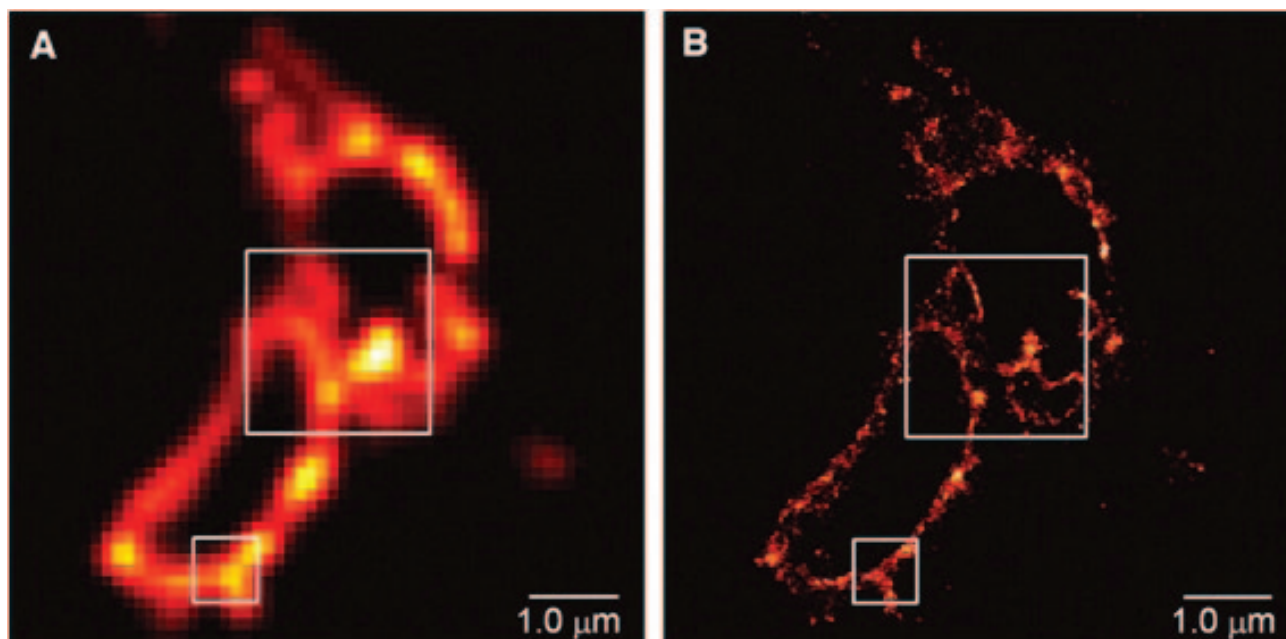
PALM

Az idei kémiai Nobel-díj két másik díjazottja a fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópiának (PALM) nevezett módszerrel ért el átütő eredményt. William Moerner még a kilencvenes évek végén figyelte meg, hogy egy GFP variáns fluoreszcenciája lézer fényvel kapcsolható, felfedezve a fotoaktiválható fluoreszcens fehérjék osztályát. A kísérlet során Moerner és társai a T203F és T203Y GFP mutánsok fotofizikai tulajdonságait vizsgálták és arra lettek figyelmesek, hogy a 488 nm-es gerjesztést követően az alkalmazott fluoreszcens fehérje fluoreszcenciája megszűnik, 405 nm-rel megvilágítva azonban ez a fluoreszcens állapot visszahozható. Ebben az eredményben pedig a jelentős mikroszkópiai múlttal rendelkező Eric Betzig látta meg a lehetőséget.

Néhány évvel korábban ugyanis azzal az ötlettel állt elő, hogyha egy mikroszkóp színenként készítené felvételeket, akkor ezeket egymásra szuperponálva egymástól akár néhány nanométerre elhelyezkedő molekulákat is meg lehetne különböztetni. Betzig elméleti eredményeit 1995-ben az *Optics Letters* című

lapban publikálta, majd a kutatópályát feladva az apja cégében kezdett el dolgozni. Ez a szakasz néhány évig tartott, majd 2005-ben azt követően, hogy olyan fluoreszcens fehérjékkel találkozott, amelyek tetszőlegesen kapcsolhatóak két állapot között leporolta eredeti ötletét és megalkotta a PALM-ot. Az ötlet rendkívül elegáns és azon alapul, hogy a képképzés első lépéseként egy gyenge lézernyalábbal (405 nm körül) világítjuk meg a mintát; ekkor a fluoreszcens fehérjék átkapcsolnak egy másik állapotukba. Ennek a nyalábnak azért kell gyengének lennie, hogy kevés és egymástól a térben távol elhelyezkedő fluoreszcens fehérjét gerjesszünk. A bekapcsolás fázisát követi a kiolvasás, amikor a fluoreszcens állapotba kapcsolt fehérjéket egy intenzív zöld nyalábbal gerjesztjük és képet készítünk a mintáról. A képképzés leginkább a pointilizmus mesterei által alkalmazott technikához hasonlít, sok apró pontból áll össze; a felbontás ebben az esetben akár 10-20 nm körül van.

A PALM módszer kidolgozásához nagymértékben hozzájárult a fluoreszcens fehérjék területén a 2000-es években végbement (és azóta is tartó) forradalom. Nem sokkal a fotoaktiválható GFP-k felfedezését követően több olyan GFP homológ fehérje felfedezésére került sor, amelyek fotofizikai tulajdonságai rendkívül kedvezőek. Myawaki és társai 2002-ben számoltak be a KADE nevű fluoreszcens fehérjéről, amelyet egy korallból izoláltak, és amelyet kék fény segítségével két fluoreszcens állapot között lehet kapcsolni. Néhány évvel később szintén a Mywaki csoport izolálta a Dronpa nevű fluoreszcens fehérjét, amelyet reverzibilis módon lehet a sötét és a fluoreszcens állapot között ki- illetve bekapcsolni. Betzig és munkatársai belevetették magukat ezeknek a fehérjéknek a használatába, a mérföldkőnek tekintett 2006-os Science cikkben Kaede-vel jelölt CD63-as transzmembrán fehérjén mutatták be a módszer működését.



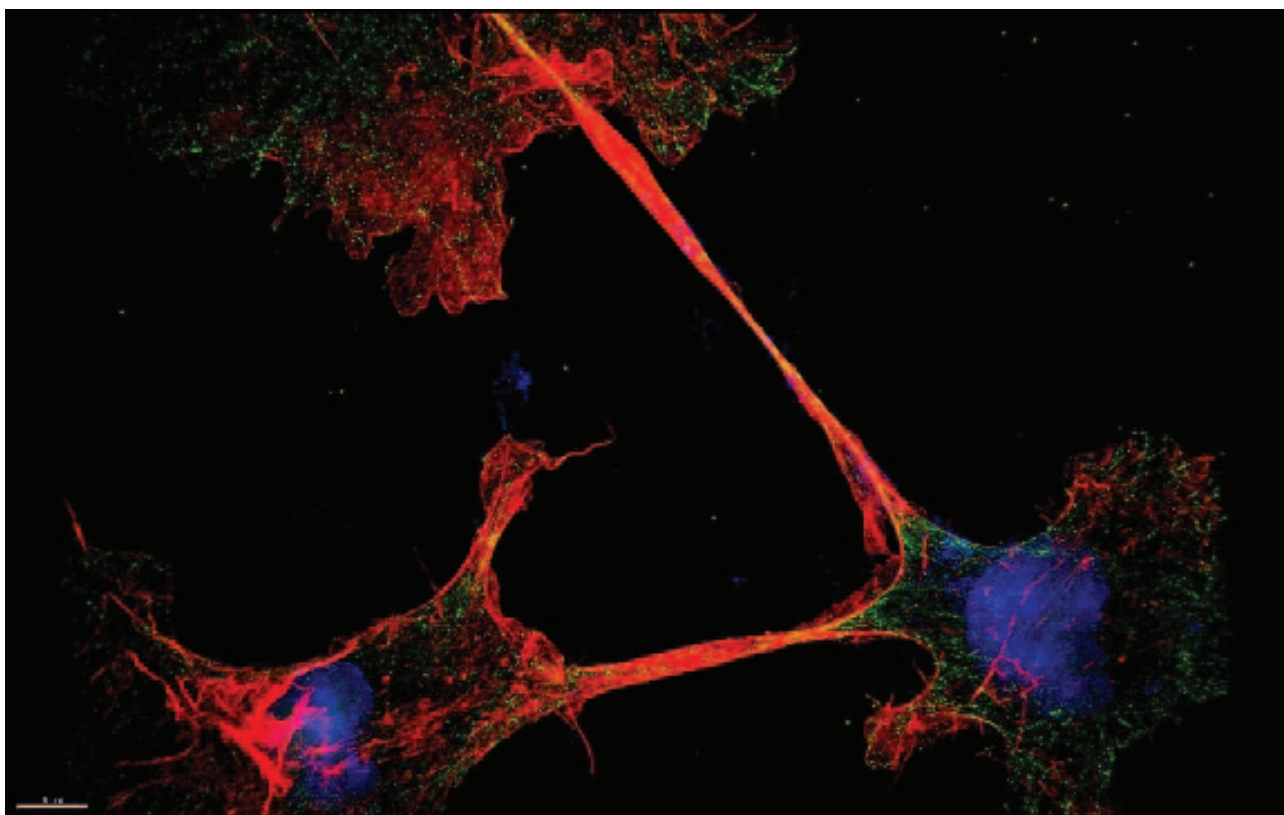
2. ábra. A CD63-as fehérje. A bal oldalon látható kép TIRF mikroszkópiával készült, a jobb oldalon a PALM-mal készített kép. Jól látszik, hogy a superfelbontásos kép apró pontokból áll. (Forrás: Betzig et al., Science 2006).

A teljes képhez hozzátartozik, hogy Xiaowei Zhuang és társai a Harvard Egyetemen egy nagyon hasonló módszert találtak ki, amelyet STORM-nak (Stochastic optical reconstruction microscopy) neveztek el. Betzig és Zhuang ötlete között az a különbség, hogy a Nobel-díjas tudós olyan fluoreszcens fehérjéket (Kaede, kikGR) alkalmazott elsősorban, amelyek a zöld és piros fluoreszcens állapot között kapcsolnak a kék fény segítségével. Zhuang és csapata viszont olyan (a Dronpához hasonló) fehérjékkel dolgozott, ahol a kék fény fluoreszcens állapotba kapcsolta a fehérjét, a zöld „kiolvasó” lézernyaláb pedig visszakapcsolta őket sötét állapotba.

A PALM és a STORM szárnyalásának köszönhetően a fluoreszcens fehérjék kutatása hatalmas lendületet kapott és az elmúlt években még a kedvezőbb tulajdonságú fluoreszcens fehérjék lettek megalkotva.

SIM

Nobel-díjat ugyan nem kapott, de létezik egy harmadik típusú módszer, amellyel szintén szuper felbontás érhető el. A Structured Illumination Microscopy-nak (SIM) nevezett módszer során a lézertény egy optikai rácson keresztül éri el a mintát. A felvétel készítése közben a rácst a készülék elforgatja, aminek köszönhetően megjelenik az úgynevezett Moiré mintázat, amit sokszor a tévében is láthatunk, ha egy vékony csíkozott mintára (pl. rosszul megválasztott zakóra) esik a fény. A Moiré gyűrűket korábban is használták nagy pontosságú távolságmérésekre, vagy például a repülőgép szárnyak deformációjának a meghatározására.



3. ábra. Cos7-es sejtek SIM mikroszkóp alatt. Kék színnel látszanak a sejtmagok, zölddel a mikrotubulusok pirossal pedig az aktin filamentumok. (Forrás: Dr. Szabó-Meleg Edina, PTE Biofizikai Intézet). Lásd címlap is.

A SIM is a Moiré jelenséget leíró matematikát alkalmazza, aminek köszönhetően segítségével a mikroszkóp mintegy 100 nanométeres felbontásra képes.

Szuperfelbontás Magyarországon

Magyarországon az első szuperfelbontású mikroszkópot beszerzésére a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében (KOKI) került sor 2010-ben. Az MTA KOKI-ban működő Nikon mikroszkóp a PALM/STORM metodika alapján működik. Ezt követően került sor 2012-ben a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpont szuperfelbontású mikroszkópjának beszerzésére. A kutatóközpontban működő mikroszkóp a Zeiss cég Elyra típusú mikroszkópja, amely SIM módszert használja. A kommerciális mikroszkópok mellett a Szegedi Tudományegyetemen Erdélyi Miklós és csapata egy a STORM elven működő, saját fejlesztésű szuperfelbontású mikroszkópot épített.



Lukács András a Budapesti Műszaki Egyetemen szerzett mérnök-fizikus diplomát 1997-ben. 1999-2002 között a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében volt Ph.D. hallgató, 2003-2005 között az R&D Ultrafast Lasers spin-off cégnél dolgozott, 2005-2006 között Marie Curie Ph.D. hallgató volt a franciaországi Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biologie kutatóintézetében. 2007-ben szerzett Ph.D. fokozatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán. 2007-2009 között az Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biologie kutatóintézetében volt posztdoktorális kutató, 2009-2011 között a University of East Anglia vegyész karán dolgozott tudományos főmunkatársként. 2011 óta újra a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében tevékenykedik. Kutatási területe a fotoaktív fehérjék funkcionális dinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópiai módszerekkel. Munkáját az elmúlt egy évben az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósuló TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program Magyary Zoltán posztdoktori ösztöndíjjal támogatta.

MAX PERUTZ ÖRÖKSÉGE; ÉVFORDULÓK, HEMOGLOBIN, ALLOSZTÉRIA ÉS SZIMMETRIA

Maksay Gábor

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Budapest

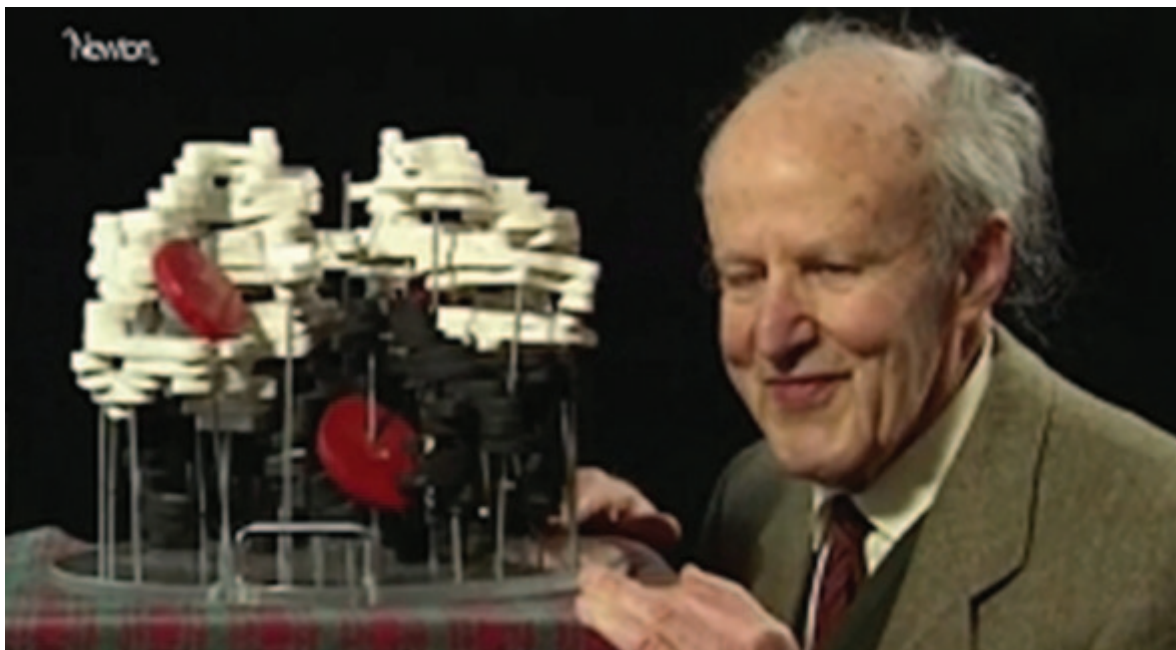
Max Perutz, a szerkezeti biológia úttörője, éppen egy évszázada született. Számos méltató írás jelzi újra és újra, hogy *Perutz* életműve dacol az idővel [1-4]. Az UNESCO kristálytannak szentelt idei éve is megfelelő alkalom *Perutz* méltatására.

A tehetséges embernek kiváló érzékre is szüksége van, hogy csúcsteljesítményt érjen el; eljusson a megfelelő helyre, ígéretes témát válasszon és éljen lehetőségeivel. *Perutz*, a fiatal bécsi biokémikus 1936-ban érkezett *Cambridge*-be, ahol a *William Bragg*-vezette *Cavendish* laboratóriumban megismerkedett a röntgenkrisztallográfia alapjaival. Egyébként most van centenáriuma annak is, hogy *W. Bragg* létrehozta a röntgenkrisztallográfiát a röntgensugarak diffrakciója alapján, amiért már 25 éves korában, 1915-ben fizikai Nobel-díjat kapott.

Mikor kitört a második világháború, *Perutz*ot, egy ellenséges állam polgárát, internálták. Alpesi ismeretei és gleccserkutató hobbija azonban kapóra jöttek a szövetségeseknek. A jég kristályszerkezetének vizsgálatával részt vehetett egy merész és titkos projektben: úszó jéghegyekre akartak repülőteret telepíteni (persze sikertelenül). A háború után visszatérhetett *Cambridge*-be és 1948-ban létrehozta a *Medical Research Council* új laboratóriumát, ahol doktoranduszával, *John Kendrew*-val munkához láttak.

Hemoglobin röntgenszerkezet

Megfelelő fehérjekristályokat keresve, *Perutz* már a harmincas években kikötött a hemoglobinnál. De szerkezetét a szép diffrakciós képek alapján sem tudta értelmezni a fázis-probléma miatt. Azonban 1953-ban alapvető felismerést tett: a ló hemoglobinjához higany vegyületet kapcsolva, a diffrakciós intenzitásokban különbségeket észlelt. Kidolgozta az izomorf helyettesítés módszerét, ami frontáttöréshez vezetett a fázis-probléma megoldásában és nagyobb (fehérje) molekulák kristályszerkezetének meghatározásában. A módszer előfeltétele, hogy nehéz atomok bevitelének lokális legyen a diffrakciós intenzitásnövelő hatása, azaz ne változzanak meg az elemi cella paraméterei vagy a protein orientációja a cellában. 1959-re *Kendrew* meghatározta az ámbráscet mioglobin szerkezetét néhány Å felbontással, *Perutz* pedig a ló hemoglobinét. Ezek alapján *Perutz* és *Kendrew* már 1962-ben kémiai Nobel-díjban részesült. Ugyanakkor, ugyanabból az *MRC*-laboratóriumból *Watson* és *Crick* pedig az élettan Nobel-díját kapta. Négyüket tekinthetjük a szerkezeti biológia megalapítóinak.



Perutz és a hemoglobin híres modellje, az 5,5 Å felbontású szerkezet. Piros korong jelzi a hem helyzetét. (Forrás: www.youtube.com/watch?v=7GcOizU2FHM).

A hemoglobin 5,5 Å felbontású szerkezete kimutatta a heterotetramer ($\alpha\beta$)₂ (dimer dimerje) tetraédes elrendeződését, valamint a kis- és nagyaffinitású oxigénkötődést a hemhez, azaz a porfirin gyűrűrendszer vas atomjához [5]. A két globinnak már ez a részleges felbontású szerkezete igazolta *Linus Pauling* α -hélix modelljének helyességét. Aztán a 1960-as évek végére feltárult az oxihemoglobin szerkezete atomi felbontásban [6]. *Perutz* részletesen értelmezte az O₂-kötődés szerkeztváltató hatását is. Az oxihemoglobinban a Fe atom közel van a hem síkjához, a dezoxihemoglobinban pedig 1 Å -mal távolabb. Ezáltal koordinációja hatról ötre csökken.

Jóllehet a hemoglobin szerkezete és alegységeinek oxigénkötő kooperativitása időközben biokémiai tankönyvek anyagává vált, atomi szintű kölcsönhatásainak dinamikája mindmáig meg-megújuló kihívást jelent a nagyműszeres vizsgálatok számára. *Perutz* és munkatársai is vissza-visszatértek a hemoglobin működési mechanizmusának finomításához [5-9]. A tudományos közösség kétségeit csak 1984-ben tudták végleg eloszlatni a humán dezoxihemoglobin 1,7 Å felbontású szerkezetével [8].

Kooperativitás és allostéria

A humán hemoglobin oxigénkötő képességét a négy alegység kooperatív kölcsönhatása fokozza. Ez lehetővé teszi, hogy az oxigén parciális nyomásának szűk intervallumban mind a négy kötőhely telítettséget érjen el. *Perutz* modellje ezt a kvaterner szerkezet változásával magyarázta: az O₂ koordinációja a hem Fe atomjához váltja ki a többi alegységre is áttérjedő hatást [7].

A humán hemoglobin két β alegységének távolsága és kooperativitása ihlette az allostéria fogalmának bevezetését [10]. *Monod*, *Wyman* és *Changeux*

(MWC) allosztéria modellje szerint a tetramer egyik állapota feszült (tense, T), amelyhez rosszul kapcsolódik az O₂ molekula. A másik állapot laza (relaxed, R) szerkezetéhez viszont nagy affinitással kötődik. Az MWC modell feltételezte, hogy a négy alegység affinitásnövekedése együttes és összehangolt (*concerted*). Az állapotváltozás során csak a tetramerek eleve meglévő konformációinak részaránya változik. Egyébként pedig a 2,3-difoszfoglicerinsav allosztérikusan stabilizálja a dezoxihemoglobin szerkezetét.

Az MWC modellel szemben áll *Koshland, Némethy és Filmer* szekvenciális allosztéria modellje [11]. A KNF modell szerint a ligandumok egymás után, növekvő affinitással kötődnek. A ligandum és kötőhely pedig kölcsönösen hatnak egymás térszerkezetére (*induced fit*).

Mai ismereteink szerint a ligandumok szelektálnak a fehérjék eleve létező konformációi között, az MWC modellnek megfelelően [12]. Az oligomer oldalláncai pedig illeszkednek a kötődő ligandumhoz, a KNF modellel összhangban. Vagyis az MWC és KNF modellek antitézise szintézis felé közeledik [13, 14, 15].

Említésre méltó az allosztéria *morpheein* modellje is, amely alkalmas lehet a hemoglobin különféle oligomer formáinak az értelmezésére [16]. A *morpheein* elnevezés alakváltoztató fehérjére utal. A modellt a porfobilinogén szintáz enzim ihlette, amely hexamerből monomerekre disszociál és Mg²⁺-kötődés hatására oktamert képez.

Hemoglobinszerkezetek alapján molekuláris medicina és evolúciókutatás

Perutz és úttörő társai a hemoglobin szerkezete alapján nemcsak a molekuláris biológiának nyitottak utat, hanem számos más diszciplínát is molekuláris alapra helyeztek. *Pauling* és *Perutz* elindította a kórélettan és medicina molekuláris korszakát. Feltártak számos összefüggést a hemoglobin mutációinak szerkezeti és kórélettani hatásai között [17]. Egy rövid szekvencia hiánya *β-thalasszémiát* okoz, egyetlen pontmutáció pedig sarlósejtes vérszegénységet. Utóbbi viszont a malária elleni védettséget fokozza. *Perutz* 1986-ban elfogadta az MRC megbízását antivirális HIV-gyógyszerek kutatásának koordinálására. Kézikönyvet is írt a fehérjék kristályszerkezetének gyógyszer-célpontként alkalmazása és ellenanyagok kifejlesztése témakörében [18].

A hemoglobinok - univerzális jelentőségük és faj-specifikus változatosságuk következtében - egyre gazdagodó ismeretanyagot szolgáltatnak az evolúciókutatás számára is [19]. Az élőlények különféle életmódja és életterük eltérő O₂-koncentrációja hemoglobinjuk evolúcióját különböző utakra terelte. Mélytengeri halak, magasra szálló madarak és földben élő állatok különféle módszerekkel ellensúlyozzák életterük alacsonyabb O₂-koncentrációját. Energiaigényük és az oxigén felhasználásának módja is eltér. Például a halhólyag térfogata gyorsan növelhető hemfehérjékről disszociált oxigénnel.

A globinok szupercsaládja ősi bakteriális, monomer szerkezetű flavohemoglobinokból eredeztethető. A törzsfajlás során különféle oligomerekké szerveződtek és működésük is változott. Kezdetben enzimatis és érzékelő

funkciójuk volt [20], az ősi bakteriális hemproteinek az NO, CO és H₂O₂ reakcióit, toxikus szabad gyökeik eltávolítását katalizálták vagy az O₂ koncentrációgradienst érzékelő *kemotaxis* receptorok voltak. A hemoglobin oxigén szállító és a mioglobin raktározó szerepe az aerob életmód megjelenéséhez kapcsolódik.

A mélytengeri csöves férgek (*annelidák*) viszont mindmáig anaerob életmódra korlátozódnak. Hidrotermális kűrtökből hemoglobinjukra hidrogén-szulfidot (H₂S) vesznek fel, amit S-oxidáló baktériumaik *tioautotróf* szimbiózisban szénvegyületekbe építenek be [20]. A kagyló *hemocianin*ja és a földigiliszta *eritrocruorin*ja pedig megadaltan méretű, kooperatív, extracelluláris, légző komplexumokat képeznek [21].

Összegezve, az 1950-es évek végén a hemoglobin röntgenszerkezetével *Perutz* utat nyitott a szerkezeti biológia fejlődésének. Aztán, amikor értelmezte az O₂ kötődésének szerkezeti hatását a hemoglobin kvaterner szerkezetének változása és az alegységek kooperativitása alapján, a közfigyelem ezen szerkezetek működésének, dinamikájának vizsgálatára irányult. Ez kisugárzott más tudományterületekre, például az élettanra, amely a jelátviteli folyamatokban immár figyelembe veszi a receptorok gyors konformációs változásait. A molekuláris farmakológiai kutatások pedig elsősorban a receptorok kötőhelyeire és ligandumaira irányulnak. Interpretációjukban a kooperativitás fogalmát az allosztéria váltja fel. A biomakromolekulák gyors szerkezetváltozásait manapság nagyműszeres módszerekkel (pl. NMR) vagy molekuladinamikai modellezéssel vizsgálják. Szilárd indulópont azonban továbbra is a röntgenszerkezet, *Perutz*ék öröksége.

Szimmetria és disszimmetria

Az UNESCO idén a kristálytan mellett a szimmetriát is a figyelem központjába állította. Indoklásában kiemelte *Kepler* úttörő szerepét, aki 400 évvel ezelőtt felfigyelt a jégkristályok (hópehely) szimmetriájára. Ezzel elkezdődött a szimmetria általános és anyagszerkezeti szerepének vizsgálata. A szimmetria különböző megnyilvánulásai mindmáig kihívást jelentenek a tudomány és művészet különféle területein. Megmutatkozik ez a fehérjeszerkezeti kutatásokban is.

A hemoglobin kvaterner szerkezetének tetraédres szimmetriája alátámasztotta *Jacques Monod* felfogását a szerkezeti szimmetria fontosságáról [22]. Ezért a szimmetria és megmaradása központi jelentőséget kapott az allosztéria MWC modelljében [10]. Ezzel összhangban a különféle hemoglobin oligomerek röntgenszerkezete szimmetrikus [13, 23]. A szekvenciális NKF modell viszont a kötődés folyamatát állította középpontba és disszimmetrikus intermediert feltételezett. Miután az intermedierek stabilitásának és élettartamának növelésével már vizsgálni lehetett az egyes O₂-kötődések disszimmetrikus perturbáló hatását, a humán hemoglobin szimmetrikus tetramerjében az alegységek kooperativitását disszimmetrikusnak találták [24]. Legújabban pedig mikrospektrofotometria és röntgendiffrakció kombinálásával kimutattak egy disszimmetrikus intermediert a hemoglobin T és R (alap és vég) állapotai között [25].

Changeux az enzimekre és hemoglobinra bevezetett MWC modellt időközben kiterjesztette a nikotinos acetilkolin receptorra [22], amely a pentamer szerkezetű, ligandum-kapuzott ioncsatornák (pLGIC) családjához tartozik [26]. Mivel a kezdetben vizsgált natív ioncsatornák heteropentamerek, csak pszeudo-szimmetriát lehetett feltételezni. Mikor aztán a pLGIC szerkezeti családban homopentamereket is találtak, majd a membránba ágyazott pentamereket sikerült kristályosítani, ezek szimmetrikus röntgenszerkezeteket mutattak. Az öt ligandummal telített pentamerek is, de anomális, azaz zárt ioncsatornával. Újabb vizsgálatok szerint azonban az aktivációhoz a kötőhelyek részleges telítettsége és az agonisták nem szimmetrikus kötődési eloszlása szükséges [27].

Changeux végül kiterjesztette az MWC modellt a jelátviteli fehérjékre, sőt, az agyműködés szabályozására is [22]. Egyre több jelátviteli receptor oligomerszerkezete bizonyul szimmetrikusnak. Másrészt működési dinamikájuk nagyműszeres vizsgálata vagy molekuladinamikai szimuláció egyre több szimmetriasértő perturbációt és disszimmetrikus intermediert mutat ki [28]. Vagyis általánosan érvényesnek tűnik, hogy a szimmetrikus szerkezetek és disszimmetrikus működésük egymást kiegészítő és egymásba átalakuló arculatai a biomakromolekuláknak.

*

Max Perutz kiemelkedő tudománypolitikai szerepeket is betöltött. Ennek magyar vonatkozású érdekessége is van. Az atombomba kifejlesztése, majd *Hiroshima* után Szilárd Leó érdeklődése a fizikáról a molekuláris biológia felé fordult. Erőteljesen lobbizott (különösen 1962-ben, a kubai rakétaválság idején!), hogy a CERN mintájára létesüljön egy nemzetközi szervezet a molekuláris biológia területén [3]. Éppen fél évszázada létrehozták az *EMBO*-t (*European Molecular Biology Organization*), amelynek alapító elnöke *Perutz* lett (1964-1969). Pontosan negyven éve pedig megalapították az *EMBL* intézetet (*European Molecular Biology Laboratory*), amely Hamburgban jött létre, *John Kendrew* vezetésével.

Max Perutz centenáriuma kapcsán igyekeztem rámutatni, hogy a fehérjekutatásnak az 1950-es évek óta bekövetkezett hatalmas fejlődése milyen mélyen gyökerezett *Perutz* hemoglobin-kutatásaiban és ennek szerteágazó, messzire sugárzó ('allosztérikus') hatásai mennyire átformáltak számos tudományterületet.

Perutz kiváló tudományos, társadalmi és emberi témájú esszéket is írt [29]. Feljutott az Alpok, valamint a tudományos felfedezés és társadalmi elismerés csúcsaira. A hemoglobin kiváló molekuláris serpának bizonyult.

Irodalomjegyzék

- [1] Eisenberg, D. (1994) Max Perutz's achievements: How did he do it? *Protein Sci* 3: 1625-1628.
- [2] Fersht, A.R. (2002) Max Ferdinand Perutz OM FRS. *Nature Struct Biol* 9: 245-246.
- [3] Blow, D.M. (2004) Max Ferdinand Perutz OM CH CBE. 19 May 1914-6 February 2002: elected F.R.S. 1954. *Biogr Mem Fell R Soc* 50: 227-256.
- [4] Ferry, G. (2007) *Max Perutz and the secret of life*. Chatto & Windus, London, UK.
- [5] Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., North, A.C.T. (1960) Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution obtained by X-ray analysis. *Nature* 185: 416-422.
- [6] Perutz, M.F., Muirhead, H., Cox, J.M., Goaman, L.C.G. (1968) Three-dimensional Fourier synthesis of hoarse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution. The atomic model. *Nature* 219: 131-139.
- [7] Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228: 726-739.
- [8] Perutz, M.F., Fermi, G., Shaanan, B., Fourme, R. (1984) The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J Mol Biol* 175: 159-174.
- [9] Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., Dodson, G.G., (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 1-34.
- [10] Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 12: 88-118.
- [11] Koshland, D.E., Némethy, G., Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5: 365-385.
- [12] Boehr, D.D., Nussinov, R., Wright, P.E. (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature Chem Biol* 5: 789-796.
- [13] Changeux, J.P., Edelstein, S. (2011) Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 Biol Reports* 3: 19.
- [14] Maksay, G. (2009) Allosztéria: Ioncsatornák és receptorok. *Biokémia* XXXIII/4: 19-29.
- [15] Maksay, G. (2011) Allostery in pharmacology: thermodynamics, evolution and design. *Progr Biophys Mol Biol* 106: 463-473.
- [16] Selwood, T., Jaffe, E.K. (2012) Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function. *Arch Biochem Biophys* 519: 131-143.

- [17] Perutz, M.F., Morimoto, H., Lehmann, H. (1971) Molecular pathology of human haemoglobin: stereochemical interpretation of abnormal oxygen affinities. *Nature* 232: 408-413.
- [18] Perutz, M.F. (1992) *Protein structure. New approaches to disease and therapy*. New York, Freeman.
- [19] Royer, W.E., Zhu, H., Gorr, T.A., Flores, J.F., Knapp, J.E. (2005) Allosteric hemoglobin assembly: diversity and similarity. *J Biol Chem* 280: 27477-27480.
- [20] Vinogradov, S.N., Moens, L. (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *J Biol Chem* 283: 8773-8777.
- [21] Royer, W.E., Sharma, H., Strand, H., Knapp, J.E., Bhyravbhatla, B. (2006) *Lumbricus erythrocrucorin* at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. *Structure* 14: 1167-1177.
- [22] Changeux, J.P. (2013) The concept of allosteric interactions and its consequences for the chemistry of the brain. *J Biol Chem* 288: 26969-26986.
- [23] Ronda, L., Bruno, S., Bettani, S. (2013) Tertiary and quaternary effects in the allosteric regulation of animal hemoglobins. *Biochim Biophys Acta* 1834: 1860-1872.
- [24] Ackers, G.K., Holt, J.M. (2006) Asymmetric cooperativity in a symmetric tetramer: human hemoglobin. *J Biol Chem* 281: 11441-11443.
- [25] Shibayama, N., Sugiyama, K., Tame, J.R.H., Park, S.Y. (2014) Capturing the hemoglobin allosteric transition in a crystal form. *J Am Chem Soc* 136: 5097-5105.
- [26] Maksay, G. (2009). Ligand-gated pentameric ion channels, from binding to gating. *Current Molecular Pharmacology* 2: 253-262.
- [27] Maksay, G. (2013) Asymmetric perturbations of pLGICs: action! *Trends Pharm Sci* 34: 299-300.
- [28] Maksay, G., Tóke O. (2014) Asymmetric perturbations of signalling oligomers. *Progr Biophys Mol Biol* 114: 153-169.
- [29] Perutz, M.F. (1998) *I wish I'd made you angry earlier*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., USA.



Maksay Gábor az MTA Természettudományi Kutatóközpont tudományos tanácsadója. A biológiai tudomány doktora, neurobiokémikus és molekuláris farmakológus. Kutatási területe a jelátviteli fehérjék, receptorok és ioncsatornák szerkezete és funkciója. A Biokémia szerkesztőbizottságának tagja, a MBKE honlapja Fórum rovatfelelőse.

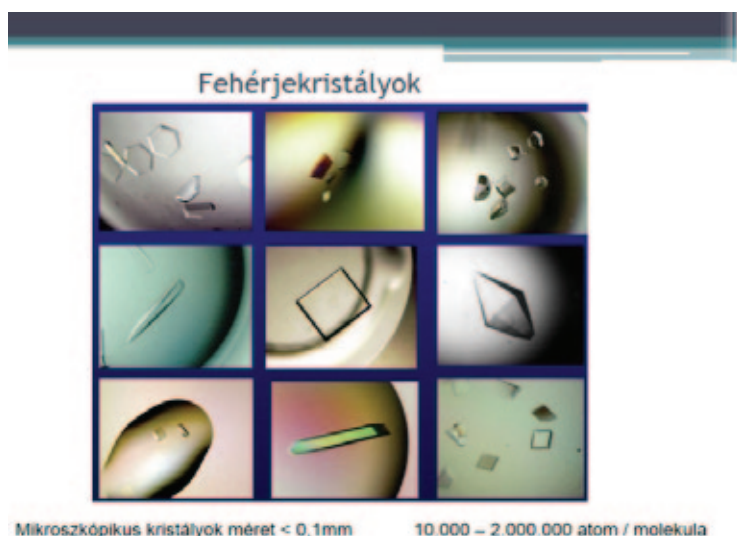
MIRE JÓ A FEHÉRJEKRISZTALLOGRÁFIA? A MÚLT NAGY FELFEDEZÉSEI ÉS A JÖVŐBELI REMÉNYEK - ÁTTEKINTÉS A 100. ÉVFORDULÓ FÉNYÉBEN

Vértessy G. Beáta

**MTA Természettudományi Kutatóközpont és Enzimológiai Intézet
és BME Vegyész- és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék**

2014-ben jubileumi év köszöntött ránk: a krisztallográfia nemzetközi éve. Jó alkalom ez arra, hogy áttekintsük, mit is köszönhetnek a molekuláris élettudományok ennek a páratlanul hasznos technológiának, és milyen irányba érdemes folytatni a további felhasználást. Ebben a cikkben röviden áttekintem a lényegi felfedezések sorát, melyek révén az egykristály röntgendiffrakció mára belépett a molekuláris biológusok és tág értelemben minden makromolekuláris szerkezet iránt érdeklődő kutató fegyvertárába. A cikk arról is szól, hogy a jelenleg folyó kutatások milyen nagy kérdéseket feszegetnek és milyen fejlesztések várhatók a jövőben.

Mik is azok az „egykristályok”? Ezt a kissé magyartalan kifejezést olyan kristályokra alkalmazzuk, melyek esetében a kristályrács a kristály egészében töretlenül és az adott kristályra jellemző tökéletes szimmetriával jelen van, a kristály magjától a kristály széléig (a kristály határáig). Az ilyen hibátlan kristályok páratlan mechanikai, optikai és (anyaguktól függően) elektronikus tulajdonságokkal rendelkeznek. Az emberi történelem során különböző szervesetlen sók ritka és gyönyörködtető kristályai folyamatosan jelen voltak (elsősorban drágakövek és egyéb ásványi anyagok révén): szimmetrikus szépségükkel lenyűgöző hatást gyakoroltak és lényegi gazdasági szerepük volt. Mai életünkben meghatározó szerepet játszanak a szilícium tartalmú egykristályok az elektronikai iparban. Mechanikai szilárdságuknak köszönhetően az egyes szuperötvezetkekből növesztett egykristályok alkotják a korszerű repülőgépek sugárhajtóműveinek



1. ábra. Fehérjekristályok.

BIOKÉMIA

XXXVIII. évfolyam 4. szám 2014. december

turbinalapátjait. Napjainkban - ezeken túl - a makromolekuláris kristályok a biológiai és orvostudományok fejlődésében is rendkívül jelentős szereppel bírnak (1. ábra).

A 2014. évben ünnepelt jubileumi dátum ahhoz a nagyjelentőségű megfigyeléshez kötődik, amit Sir William Henry Bragg és Sir William Lawrence Bragg (apa és fia) az 1910-es években tett. Korábban Max von Laue kimutatta, hogy a Wilhelm Conrad Röntgen által felfedezett, és a német és magyar szakirodalomban róla elnevezett, sugárzás réz-szulfát kristályokon fizikailag a szerkezettel összefüggően értelmezhető diffrakciós képet nyújt. Ennek oka az, hogy a röntgensugárzás hullámhossza összemérhető a kémiai kötésben lévő atomok közti távolságokkal, így a diffrakciós kép geometriai és intenzitást hordozó jellemzői valamilyen módon tükrözni fogják a molekuláris szerkezetben jelen lévő atomok egymáshoz viszonyított térbeli pozícióit. W. L. Bragg (a Bragg párosból ő a fiú) ezen összefüggés rendkívül elegáns és egyszerű matematikai leírását adta, ez a Bragg-törvény:

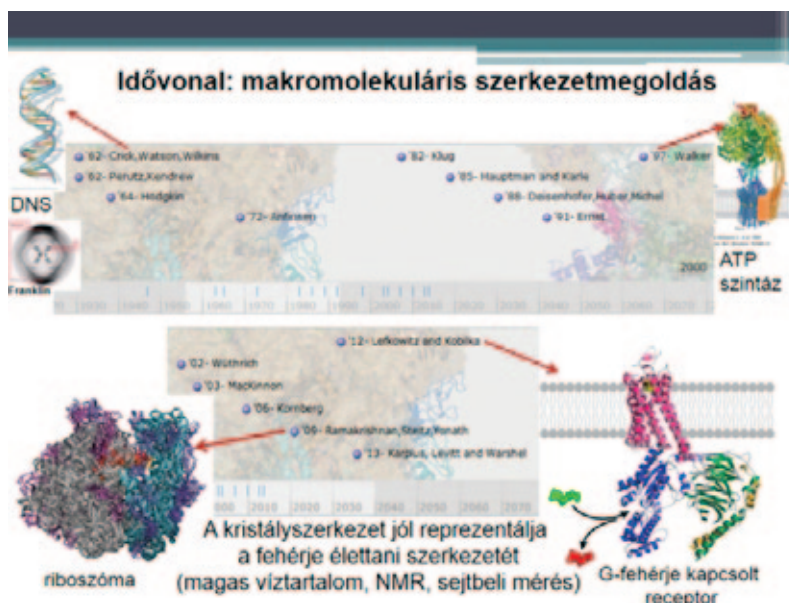
$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

ahol n : egy természetes szám, λ : a sugárzás hullámhossza, d : a kristályrács párhuzamos síkjainak távolsága, θ : a diffrakciós szög.

W. H. Bragg (az apa) megépítette az első röntgen-fotométert (a mai diffraktométerek/szinkrotronok őseit), és ezzel meghatározták a kősó, majd a gyémánt térszerkezetét. Ezen felfedezések jelentőségét szinte azonnal felismerve 1914-ben Laue, 1915-ben a két Bragg Nobel-díjban részesült (a fiatalabb Bragg ekkor 25 éves volt!) [1].

A makromolekuláris szerkezetmeghatározás terén ezek után jó negyven évet kellett várni arra, hogy az első fehérjeszerkezetet meghatározzák (mioglobint, John Kendrew, 1958, Nobel-díj 1962) [2] (2. ábra). Kicsit korábban, 1953-ban került közlésre a hipotézis a DNS térszerkezeti modelljéről. Itt a kiváló kísérletes adatokat Rosalind Franklin gyűjtötte [3, 4]. Ezen adatok alapján Francis Crick és James Watson alkotott merész hipotézist [5], ami kiállta az idők próbáját. Ma a makromolekuláris térszerkezeteket tároló adatbázis százezernél is több fehérje és makromolekuláris komplex szerkezetét tartalmazza, és havonta több száz új szerkezet kerül - szigorú ellenőrzés - után az adattárba (Protein Data Bank: fehérje és nukleinsav polimerek szerkezeteit tárolja, www.rcsb.org).

A szerkezetmeghatározások robbanásszerű gyorsulását jól szemlélteti, hogy 2000 előtt kb. 10.000 szerkezet volt az adatbázisban, míg idén már több mint 9000 került depozícióra. Ennek az öröndetes fejleménynek több lényegi oka van, ezek között a két legfontosabb: a szerkezetmeghatározási módszerek matematikai és fizikai fejlődése és a vizsgálandó objektumok (fehérjék) géntechnológiai előállításának egyre hatékonyabb lehetősége. A makromolekuláris szerkezetek meghatározásában az infrastruktúra fejlődését rendkívül látványosan lehet figyelemmel kísérni. A kezdeti kisműszerektől (a Bragg-féle röntgenfotométertől)



2. ábra. Fehérjekristallográfia a Nobel-díjak fényében.

elindulva, mára két nagy csoportra oszthatóak a röntgensugárzást kristályszerkezetek vizsgálatára alkalmazó műszerek (3. ábra).

Az egyik csoportba tartoznak az úgynevezett „házi” sugárforrások, melyek ma már kvázi asztali kivitelben is kaphatók. Itt történik az adott laboratóriumokban létrehozott kristályok elsődleges vizsgálata, annak eldöntése, hogy a kristály vajon diffraktál-e és mik a kristályt meghatározó ún. cellaállandók. Ha a kristály elég jól diffraktál, akkor ezen házi forrásokon gyűjtött adatokból is meghatározható a fehérje (illetve a makromolekuláris komplex) térszerkezete megfelelő felbontásban¹. Ezek az információk elengedhetetlenül szükségesek ahhoz, hogy becses kristályainkat a nagy intenzitású, rendkívül gyors és jó felbontású szerkezetek meghatározására elsődlegesen alkalmazott szinkrotron sugárforrásoknál megmérhessük. Itthon jelenleg két olyan laboratórium üzemel, ahol a házi sugárforrások lehetővé teszik a makromolekuláris kristályok vizsgálatát és a fehérjeszerkezetek meghatározását. A BME/MTA TTK közös laborjában (<http://www.biostruct.org/biostruct/>, 3. ábra) automatizált, robotokkal végzett kristályosítás és a kisméretű (mikrométeres mérettartomány) kristályok vizsgálatára is alkalmas mikrofókuszos sugárforrás egyaránt rendelkezésre áll, valamint az ELTE-n <http://prot.chem.elte.hu/laboratories/kristallografiai-laboratorium>).

Szinkrotron sugárforrások Európában számos helyen elérhetők (pl. <http://www.biostructx.eu/>), ezek esetében a röntgensugárzást óriási gyűrűkben keringtetett elektronnyalábok „megcsapolásával” állítják elő, rendkívüli intenzitással és mikrofókuszos, kiválóan hangolt sugárforrást hozva létre. A „hardware” mellett a szerkezetmegoldási szoftver is óriási fejlődésen ment át: ma már „felhasználó-

¹ Mi is az a „felbontás”? Ez az adat egy angströmben megadott szám, ami a szerkezet információ-gazdagságára jellemző: minél kisebb, annál jobb. 10 angström felbontásnál a makromolekula alakja, egyes nagyobb domének elrendeződése már látható, míg a 2 angström alatti felbontású szerkezetekben az oldallácok atomjai is láthatóak.



3. ábra. Házi sugárforrás vs szinkrotron.

barát”, ingyenesen elérhető programcsomagok segítik a kutatók munkáját (4. ábra).

A másik fontos körülmény a fejlődésben a molekuláris biológiai eszköztár megjelenése, amivel ma már (kis túlzással) tetszés szerinti fehérjét elő tudunk állítani, kristályosításra alkalmas mennyiségben. Itt azért még mindig a legszűkebb keresztmetszet az adott fehérje kristályosítása: a robotikus, több ezer paramétert is felhasználó kristályosítási „screenek” mellett sem garantálható, hogy minden fehérjéből kristály növeszthető.



4. ábra. A szerkezetmeghatározás lépései.

A legutóbbi Nobel-díjat ezen a téren 2012-ben a G-fehérjékkel kapcsolt receptorok működésének és térszerkezetének feltárásáért adták (Robert Lefkowitz és

Brian Kobilka), továbbá a tavalyi kémiai Nobel-díj (kvantummechanika és molekuláris dinamika, Karplus-Levitt-Warshel) is szorosan kötődik a röntgenkrisztallográfiához. Napjainkban a szerkezetek felderítéséből származó tudás felbecsülhetetlen hasznot hoz a biológiai felderítő kutatásokban és a molekuláris mechanizmusok megértésében. A biológiai egyedekben és közösségekben (a mikrobiálistól a gerincesekig) megvalósuló jelátvitel, ingerületátvitel, kommunikáció alapjait is ilyen szerkezetek révén érthetjük meg, és a megértés révén céljainknak megfelelően befolyásolhatjuk. A térszerkezeti információ nélkülözhetetlen a gyógyszertervezésben, a biotechnológiában, a nano-tudományokban és fejlesztésekben egyaránt. Saját kutatócsoportom a szerkezetek megfejtésével a genomi integritás folyamatainak megértésében ért el eredményeket, melyek mind rákellenes, mind anti-mikrobiális gyógyszerek tervezésében fontosak [6-8]. Ezekkel adhatunk választ a címben feltett kérdésre.

Mit tartogat a jövő?

Olyan fantasztikus lehetőségeket, melyek az egyre magasabb színvonalú és egyre újabb innovatív koncepciókon alapuló műszerezettség mellett már élő sejtben is képesek fehérjekristályok vizsgálatára [9]. Három fő irányt különíthetünk el a fejlesztésekben. Egyrészt a szubatomi felbontású (1 angström alatti felbontású) szerkezetek meghatározását és értelmezését, másrészt egyre nagyobb komplexek szerkezetének meghatározását, harmadrészt a femtoszekundumos krisztallográfiát. A szubatomi felbontások esetén a fehérjeszerkezetek fenntartásában és a fehérjeműködésben kiemelt jelentőségű hidrogénhidak esetleges aszimmetriája is vizualizálható. A nagy komplexek esetén a riboszóma szerkezete (az Ada Yonath, Venki Ramakrishnan és Tom Steitz trió Nobel-díjával jutalmazott eredmény) kiváló példa. Ezen túlmenően is, a sejtorganeliumok még



5. ábra. „Hit and run” krisztallográfia.

nagyobb alkotóinak térszerkezet meghatározását a röntgenkrisztallográfia és egyéb módszerek (elektronmikroszkópia, atomerő mikroszkópia, sőt akár STED mikroszkópia) együttes alkalmazásával cél az egész sejt szerkezetének leírása, az egyes alkotóknál az adott röntgenszerkezet beillesztésével. A femtoszekundumos

krisztallográfiában mikrokristályokat porlasztunk a nagyenergiájú sugárforrásba [10, 11] (5. ábra).

Itt az ún. „hit and run” krisztallográfia érvényesül: egy mikrokristály egyetlen sugáradaggal találkozik. Ez a találkozás a kristály számára végzetes, hiszen a kristályt elpusztítja az intenzív sugár, de a felvillanásban rögzített képekből a szerkezet meghatározható.

Hivatkozások

- [1] Jaskolski, M., Dauter, Z. & Wlodawer, A. (2014) A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. *FEBS J* **281**: 3985-4009.
- [2] Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**: 662-6.
- [3] Franklin, R. E. & Gosling, R. G. (1953) Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* **172**: 156-7.
- [4] Franklin, R. E. & Gosling, R. G. (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**: 740-1.
- [5] Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-8.
- [6] Nagy, G. N., Marton, L., Contet, A., Ozohanics, O., Ardelean, L. M., Revesz, A., Vekey, K., Irimie, F. D., Vial, H., Cerdan, R. & Vertessy, B. G. (2014) Composite aromatic boxes for enzymatic transformations of quaternary ammonium substrates. *Angewandte Chemie* **53**: 13471-6.
- [7] Leveles, I., Nemeth, V., Szabo, J. E., Harmat, V., Nyiri, K., Bendes, A. A., Papp-Kadar, V., Zagyva, I., Rona, G., Ozohanics, O., Vekey, K., Toth, J. & Vertessy, B. G. (2013) Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 2298-308.
- [8] Vertessy, B. G. & Toth, J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases, *Acc Chem Res* **42**: 97-106.
- [9] Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., Oberthur, D., Yefanov, O., Sommer, B. P., Mogk, S., Duszhenko, M., Betzel, C., Schneider, T. R., Chapman, H. N. & Redecke, L. (2014) Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation, *IUCrJ* **1**: 87-94.
- [10] Johansson, L. C., Arnlund, D., Katona, G., White, T. A., Barty, A., DePonte, D. P., Shoeman, R. L., Wickstrand, C., Sharma, A., Williams, G. J., Aquila, A., Bogan, M. J., Caleman, C., Davidsson, J., Doak, R. B., Frank, M., Fromme, R., Galli, L., Grotjohann, I., Hunter, M. S., Kassemeyer, S., Kirian, R. A., Kupitz, C., Liang, M., Lomb, L., Malmerberg, E., Martin, A. V., Messerschmidt, M., Nass, K., Redecke, L., Seibert, M. M., Sjöhamn, J., Steinbrener, J., Stellato, F., Wang, D., Wahlgren, W. Y., Weierstall, U., Westenhoff, S., Zatsepin, N. A., Boutet, S., Spence, J. C., Schlichting, I., Chapman, H. N., Fromme, P. & Neutze, R. (2013) Structure of a photosynthetic reaction centre determined by serial femtosecond crystallography: *Nature communications* **4**: 2911.

[11] Liu, W., Wacker, D., Gati, C., Han, G. W., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Katritch, V., Barty, A., Zatsepin, N. A., Li, D., Messerschmidt, M., Boutet, S., Williams, G. J., Koglin, J. E., Seibert, M. M., Wang, C., Shah, S. T., Basu, S., Fromme, R., Kupitz, C., Rendek, K. N., Grotjohann, I., Fromme, P., Kirian, R. A., Beyerlein, K. R., White, T. A., Chapman, H. N., Caffrey, M., Spence, J. C., Stevens, R. C. & Cherezov, V. (2013) Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors, *Science* **342**: 1521-4.



Vértessy G. Beáta a BME egyetemi tanára, az MTA TTK tudományos tanácsadója. Csoportjával a genomi integritás, ezen belül a DNS-ben előforduló uracil élettani szerepét kutatja, és több egyéb, orvosi biológiailag jelentős útvonalat is vizsgál. Kutatásait a Howard Hughes Medical Institutes, a Wellcome Trust, az ICGEB, az EU keretprogramjai, az MTA és az OTKA támogatja. Kutatócsoportjának több fiatal tagja jelentős hazai és nemzetközi elismerésekben, díjakban részesült. Vértessy Beáta a Fulbright Hungary kuratórium és a FEBS Advance Course Committee elnöke, az MBKE főtitkára.

ALAMETHICIN PEPTIDEK TÉRSZERKEZETI TULAJDONSÁGAI

Leitgeb Balázs

*MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont;
Szegedi Tudományegyetem, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, Szeged*

Bevezetés

Az alamethicin (ALM) a peptaibolok családjába tartozó antimikrobiális peptid [1-4], amelyet 1967-ben a peptaibol család első tagjaként izoláltak a *Trichoderma viride* gombából [5, 6]. Az ALM molekulák 20 aminosavból épülnek fel, és a többi peptaibolhoz hasonlóan nem-proteinogén aminosavakat (α -aminoizovajsav, Aib; izovalin, Iva) tartalmaznak [5]. Emellett az ALM peptidek N-terminális végén lévő Aib aminosav acetilált, míg a C-terminális végükön egy amino-alkohol (fenilalaninol, Pheol) található [5].

Akárcsak a többi peptaibol molekula, az ALM peptidek is nem-riboszómális bioszintézis úton jönnek létre, melynek során egy multifunkcionális enzim (ALM-szintetáz) játszik szerepet a bioszintézisben [5]. Ahogy az általában a legtöbb peptaibol esetén megfigyelhető, az ALM molekulák is mikroheterogén elegyként szintetizálódnak. Ebben az esetben ez azt jelenti, hogy több, különböző aminosav összetételű, de azonos szekvencia hosszal rendelkező ALM peptidet lehet megkülönböztetni [5, 7]. Az ALM esetében ebben a mikroheterogén elegyben a molekulák két csoportja található, úgymint az ALM F30 és az ALM F50 peptidek, és amíg az első csoport tíz molekulát, addig a második csoport tizenhárom molekulát foglal magában [5, 7] (1. táblázat).

A többi peptaibolhoz hasonlóan az ALM peptidek is széleskörű biológiai hatással jellemezhetők, úgymint antibakteriális és antifungális hatás, hemolitikus aktivitás, illetve képesek pórusokat kialakítani a membránokban [5, 6].

Alamethicinek térszerkezeti tulajdonságai

Az ALM molekulák térszerkezeti tulajdonságait egyrészt kísérleti módszerek (röntgenkristallográfia, cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia, Raman spektroszkópia, Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia és mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia), másrészt pedig elméleti módszerek („távolság-geometria” (DG), szimulált anelláció (SA) és molekuladinamika (MD)) alkalmazásával tanulmányozták [5, 6].

Alamethicin F30 peptidek**ALM F30/1, F30/2, F30/3, F30/4, F30/5,
F30/6, F30/7, F30/8, F30/9, F30/10;**

Ac-Aib¹-Pro²-Aib³-Ala⁴-Aib⁵-Xaa⁶-Xaa⁷-Aib⁸-Xaa⁹-Aib¹⁰-
Xaa¹¹-Xaa¹²-Aib¹³-Pro¹⁴-Val¹⁵-Aib¹⁶-Xaa¹⁷-Glu¹⁸-Gln¹⁹-Pheol²⁰;

ahol Xaa⁶: Ala/Aib, Xaa⁷: Glu/Gln, Xaa⁹: Aib/Leu/Val,
Xaa¹¹: Ala/Gly, Xaa¹²: Leu/Val, Xaa¹⁷: Aib/Val;

Alamethicin F50 peptidek**ALM F50/2, F50/3a, F50/3b, F50/3c, F50/4a, F50/4b, F50/5,
F50/6a, F50/6b, F50/7, F50/8a, F50/8b, F50/8c;**

Ac-Aib¹-Pro²-Xaa³-Xaa⁴-Xaa⁵-Xaa⁶-Gln⁷-Aib⁸-Xaa⁹-Aib¹⁰-
Gly¹¹-Xaa¹²-Aib¹³-Pro¹⁴-Xaa¹⁵-Aib¹⁶-Xaa¹⁷-Gln¹⁸-Gln¹⁹-Pheol²⁰;

ahol Xaa³: Ala/Aib, Xaa⁴: Ala/Aib, Xaa⁵: Ala/Aib, Xaa⁶: Ala/Aib/Gly, Xaa⁹: Ala/
Aib/Leu/Val/Iva, Xaa¹²: Leu/Val,
Xaa¹⁵: Val/Iva, Xaa¹⁷: Aib/Val/Iva;

1. táblázat: Az alamethicin F30 és F50 peptidek általános szekvenciája.

Az ALM peptidek konformációs sajátosságait különböző körülmények között vizsgálták, úgymint kristályszerkezetben, vizes oldatban, különféle szerves oldószerekben, micellák jelenlétében, membránhoz kötötten, illetve membránba ágyazódva [5, 6].

A természetben előforduló ALM molekulák esetén elvégzett szerkezetvizsgálati munkákból származó eredmények egy korábbi cikkben kerültek összefoglalásra [4], így ebben a cikkben a különböző szintetikus ALM analógokra, valamint ezen peptidek szerkezetileg módosított változataira vonatkozó térszerkezeti eredmények kerülnek bemutatásra.

Az ALM molekulák esetében az eddigiek során már számos analógot szintetizáltak, amelyekben egyrészt adott aminosavakat helyettesítettek más aminosavakkal, másrészt pedig további aminosavakat építettek be az ALM peptidek szekvenciájába. A természetben előforduló ALM molekulákhoz hasonlóan, a különféle ALM analógok térszerkezetét szintén részletesen tanulmányozták röntgenkristallográfiával, illetve CD, infravörös (IR), FTIR, elektron spin rezonancia (ESR) és NMR spektroszkópiával, valamint SA és MD módszerek alkalmazásával [5, 6].

Az ALM analógok térszerkezeti tulajdonságait nemcsak kristályszerkezetben, hanem vizes oldatban és különböző szerves oldószerekben, illetve micellák és membránok jelenlétében is vizsgálták [5, 6].

Az ALM C-terminális végen amidált analógjai közül két peptidben az összes Aib aminosavat Ala-nal és Leu-nal cserélték ki (ALM dUA-NH₂ és ALM dUL-NH₂), míg a további két peptid esetén az ALM dUL-NH₂ analóg szekvenciáját meghosszabbították egy Leu és egy Ser aminosavval (L-ALM dUL-NH₂ és S-ALM dUL-NH₂) [8]. Az ezen peptidekre vonatkozóan elvégzett IR és CD mérések eredményei azt mutatták, hogy az Ala-tartalmú analóg valószínűleg egy random vagy β -szerkezetet vesz fel, míg a Leu-tartalmú analógok túlnyomórészt α -helikális konformációval jellemezhetők.

Az Aib aminosavak helyett Leu-t tartalmazó ALM analógnak (ALM dUL), illetve további két módosított változatának, amelyekben a Pro² és Pro¹⁴ aminosavakat Ala-nal helyettesítették (ALM dUL P2A és ALM dUL P14A), a konformációs sajátosságait tanulmányozták [9]. A metanolban végrehajtott CD mérések alapján arra következtettek, hogy ezek az ALM analógok főként α -helikális konformációban vannak jelen, azonban az ALM dUL P2A analóg helikális tartalma nagyobb, míg az ALM dUL P14A analóg helikális tartalma kisebbnek bizonyult, mint az ALM dUL analógé. Az ezt követő szerkezetvizsgálati munkák során az ALM dUL és ALM dUL P14A analógok térszerkezeti tulajdonságait vizsgálták CD és NMR spektroszkópia alkalmazásával metanolban, illetve nátrium-dodecil-szulfát (SDS) micellák jelenlétében [10, 11]. Emellett az NMR mérésekből származó kényszerfeltételek felhasználásával SA és MD számításokat is végrehajtottak. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét ALM analóg túlnyomórészt α -helikális konformációt vesz fel, azonban a korábbi megfigyeléssel szemben az ALM dUL P14A analóg helikális tartalma nagyobb volt, mint az ALM dUL analógé. Ugyanakkor azt tapasztalták, hogy a metanolban megfigyelt helikális tartalommal összehasonlítva a peptid helicitása megnövekedett az SDS micellák jelenlétében. Mindemellett az ALM dUL P14A analóg szerkezete sokkal stabilabbnak és rendezettebbnek bizonyult, mint az ALM dUL analóg szerkezete, különösen az Ala¹⁴ aminosav körüli részen, illetve a C-terminális szakaszon. Az ALM dUL analóg esetében FTIR méréseket is végeztek metanolban, illetve foszfolipid membrán jelenlétében [12]. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy mindkét közegben az ALM dUL analóg egy sokkal rigidebb helikális konformációval, valamint erősebb H-kötésekkel jellemezhető, mint az ALM.

Olyan ALM analógok térszerkezeti tulajdonságait is vizsgálták, amelyekben a Pro aminosavat az eredeti 14-es pozíciójából eltolták a 11-es (ALM P11), 12-es (ALM P12), 13-as (ALM P13), 15-ös (ALM P15), 16-os (ALM P16) és 17-es (ALM P17) pozícióba [13]. Mindemellett egy további analóg térszerkezetét is tanulmányozták, amelyben a Pro¹⁴ aminosavat Ala-nal helyettesítették (ALM P14A). A CD mérések alapján azt állapították meg, hogy ezek a peptidek egy kevésbé rendezett struktúrával jellemezhetők vizes oldatban, ugyanakkor az összes peptid túlnyomórészt helikális konformációt vesz fel liposzómák jelenlétében. Ugyanakkor azt tapasztalták, hogy az Ala-tartalmú ALM analóg helicitása nagyobb volt, mint az ALM helicitása, míg a többi ALM analóg esetén eltérő nagyságú helikális tartalmakat figyeltek meg a Pro aminosav különböző pozíciójának megfelelően. Egy további szerkezetvizsgálati munka során az ALM P14A analóg esetében kloroformban végrehajtott MD számítás alapján azt figyelték meg, hogy ez a peptid főként α -helikális konformációt vett fel [14]. Emellett azt tapasztalták, hogy az ALM molekulára jellemző hajlított szerkezet ugyan megjelent a Gly¹¹-Ala¹⁴ tetrapeptid egységre vonatkozóan, azonban ebben az esetben ez a struktúra nem volt annyira jellegzetes.

Különbéféle ALM analógok lipid-kötött konformációját tanulmányozták, amely peptidekben a Gln⁷ aminosavat Ala-nal (ALM Q7A), míg a Gly¹¹ aminosavat Gln-nal és Asn-nal (ALM G11Q és ALM G11N), végül pedig a Pro¹⁴ aminosavat Gln-nal helyettesítették (ALM P14Q) [15]. A CD mérések alapján különbségeket figyeltek meg az ALM analógok helicitását illetően. Azt tapasztalták, hogy a Pro¹⁴/Gln¹⁴ csere nem változtatja meg jelentősen a peptid konformációját, ugyanakkor a Gln⁷/Ala⁷, Gly¹¹/Gln¹¹ és Gly¹¹/Asn¹¹ cserék a helikális tartalom csökkenését eredményezték.

További ALM analógok térszerkezeti tulajdonságait vizsgálták CD spektroszkópiával palmitoil-oleoil-foszfatidilkolin (POPC) vezikulák jelenlétében [16]. Az egyik ALM analóg (HG-ALM) esetén egy His aminosavat kapcsoltak egy Gly aminosavon keresztül az ALM molekula N-terminális végéhez, míg ezen peptid további három módosított változata esetében (HG-[Leu] ALM, HG-[Nva] ALM és HG-[Nle] ALM) az összes Aib aminosavat Leu, norvalin (Nva) és norleucin (Nle) aminosavval helyettesítették. Mind a négy ALM analóg esetén a CD spektrumok azt mutatták, hogy egy helikális szerkezet alakul ki Zn²⁺-ionok jelenléte nélkül. A Zn²⁺-ionok hozzáadásával azonban változásokat figyeltek meg a HG-ALM és HG-[Nva] ALM analógok CD spektrumai tekintetében, ugyanakkor nem tapasztaltak jelentős változásokat a HG-[Leu] ALM és HG-[Nle] ALM analógok CD spektrumait illetően.

Az eredmények alapján, az utóbbi két peptid esetében tapasztalt helikális tartalommal összehasonlítva, az előző két peptidre vonatkozóan a helikális tartalom növekedését figyelték meg Zn^{2+} -ionok jelenlétében.

Hat különböző ALM analóg ($[S-(CF_3-Ala)^5]$ ALM, $[R-(CF_3-Ala)^5]$ ALM, $[S-(CF_3-Ala)^{10}]$ ALM, $[R-(CF_3-Ala)^{10}]$ ALM, $[S-(CF_3-Ala)^{16}]$ ALM és $[R-(CF_3-Ala)^{16}]$ ALM) konformációs sajátosságait tanulmányozták, amelyekben az Aib⁵, Aib¹⁰ és Aib¹⁶ aminosavakat a trifluorometil-alanin (CF_3-Ala) aminosav *S*- és *R*-sztereoizomerével helyettesítették [17]. Az ALM és hat analógja esetén az oldatban elvégzett CD mérések hasonló spektrumokat eredményeztek. Ezek a CD spektrumok egyrészt arra utaltak, hogy a peptid magas helikális tartalommal jellemezhető, másrészt pedig arra, hogy az Aib aminosavak CF_3-Ala -nal történő cseréje nincs hatással az ALM analógok molekulagerinc konformációjára.

A Gln aminosavak helyett γ -metil glutamátot (Glu(OMe)) tartalmazó ALM analógok közül két peptidben az adott pozíciójú Gln aminosavakat Glu(OMe)-tal cserélték ki ($[Glu(OMe)^{18,19}]$ ALM F50/5 és $[Glu(OMe)^{7,18,19}]$ ALM F50/5) [18]. További két peptid esetében pedig a $[Glu(OMe)^{7,18,19}]$ ALM F50/5 analóg szekvenciájának N- és C-terminális végéhez egy 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmc) csoportot kapcsoltak (Fmc- $[Glu(OMe)^{7,18,19}]$ ALM F50/5 és $[Glu(OMe)^{7,18,19}]$ ALM F50/5-Fmc) [18]. Ezen ALM analógok térszerkezeti tulajdonságait vizsgálták CD spektroszkópia alkalmazásával metanolban és membrán jelenlétében. Az ALM F50/5 és Glu(OMe)-tartalmú analógjainak a CD spektruma majdnem azonosnak bizonyult egymással, ami azt jelzi, hogy az ALM F50/5 esetén elvégzett, fent említett szekvencia módosítások nincsenek különösebb hatással az ALM F50/5 helikális szerkezetére, illetve konformációs sajátosságaira.

Egy spin-jelölt ALM analóg ($[TOAC^{16}, Glu(OMe)^{7,18,19}]$ ALM F50/5) térszerkezetét vizsgálták röntgenkristallográfiával, amelyben az Aib¹⁶ aminosavat 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil-4-amino-4-karbonsavval (TOAC), illetve a Gln⁷, Gln¹⁸ és Gln¹⁹ aminosavakat Glu(OMe)-tal helyettesítették [19]. A kristályszerkezet alapján két egyedi molekulát azonosítottak, amelyek mindegyike egy hajlított, túlnyomórészt α -helikális konformációval jellemezhető, azonban a két molekula esetében különbség figyelhető meg az intramolekuláris H-kötés mintázatra vonatkozóan. Mindkét molekula helikális szerkezetét tekintve a három Glu(OMe) aminosav oldallánca azonos oldalon található, míg a legtöbb hidrofób oldallánc és a TOAC aminosavak az ezzel ellentétes oldalon helyezkednek el, kialakítva ezáltal egy hidrofil konvex oldalt, illetve egy hidrofób konkáv oldalt.

Az eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy összességében a [TOAC¹⁶, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg esetén azonosított két egyedi molekula konformációs sajátosságai hasonlónak bizonyultak azokhoz, amiket korábban a három egyedi ALM molekula esetében megfigyeltek a kristály aszimmetrikus elemi cellájában [20]. Egy további részletes konformáció-analízist végeztek el CD, FTIR és NMR spektroszkópia alkalmazásával oldatban a [Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg, illetve ezen peptid módosított változatai esetén, amelyek az adott pozíciójú Aib aminosavak helyett TOAC aminosavat tartalmaztak ([TOAC¹, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5, [TOAC⁸, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5, [TOAC¹⁶, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 és [TOAC^{1,16}, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5) [21]. Az öt ALM analóg CD spektruma az ALM esetében megfigyelt CD spektrumhoz nagyon hasonlónak bizonyult, és mindez arra utalt, hogy ezek a peptidek egy helikális konformációt vesznek fel, amely nagy mennyiségű α -hélixet és kis mennyiségű 3_{10} -hélixet tartalmaz. Az FTIR mérésekből származó eredmények alapján azt állapították meg, hogy a peptidek preferált konformációja egy nagyon rendezett struktúrával jellemezhető, amelyet intramolekuláris H-kötések stabilizálnak. A [Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg esetén elvégzett NMR mérés eredményei szintén azt mutatták, hogy ez a peptid nagymértékben helikális. Összességében tehát a fent említett spektroszkópai vizsgálatok alapján azt a következtetést vonták le, hogy sem a Gln/Glu(OMe) csere, sem pedig az Aib/TOAC csere nem gyakorol jelentős hatást az ALM preferált konformációjára. Egy következő szerkezetvizsgálati munka során a [TOAC¹, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg esetében NMR mérések alapján tanulmányozták az intramolekuláris távolságokat [22]. Az eredmények alapján azt állapították meg, hogy a [TOAC¹, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg esetében megfigyelt távolságok jó egyezést mutattak a [TOAC¹⁶, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg kristályszerkezetében tapasztalt távolságokkal [19]. Mindez arra utalt, hogy ezen ALM analógoknak a konformációs sajátosságai hasonlítanak egymáshoz oldatban és kristályszerkezetben. A [TOAC¹⁶, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 analóg térszerkezetét vizsgálták ESR spektroszkópia alkalmazásával is különböző polaritású oldószerekben, illetve tojás-foszfatidilkolin (ePC) membránok jelenlétében [23]. A két TOAC aminosav között mért távolság alapján arra a következtetésre jutottak, hogy ez az ALM analóg egy túlnyomórészt α -helikális konformációval jellemezhető. Emellett azt tapasztalták, hogy a TOAC aminosavak közti távolság függetlennek bizonyult az alkalmazott oldószer polaritásától.

A [(Tfa)⁰, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5, [Dab(Tfa)⁹, Glu(OMe)^{7,18,19}] ALM F50/5 és [Glu(OMe)^{7,18}, Dab(Tfa)¹⁹] ALM F50/5 analógok konformáció-analízisét FTIR,

CD és NMR spektroszkópia alkalmazásával végezték el szerves oldószerekben és SDS micellák jelenlétében [24]. Ezen ALM analógok esetén a trifluoroacetyl (Tfa) csoportot az N-terminális végen, a szekvencia közepén található 9-es pozícióba, valamint a C-terminális részen lévő 19-es pozícióba építették be. Az utóbbi két analóg esetében a Val⁹ és Gln¹⁹ aminosavakat γ -trifluoroacetylált α,γ -diaminobutaráttal (Dab) helyettesítették. Az FTIR, CD és NMR mérések eredményei azt mutatták, hogy ezek a peptidek egy intramolekuláris H-kötések által stabilizált helikális struktúrával jellemezhetők, és ez a helikális szerkezet túlnyomórészt α -hélixet tartalmaz. Emellett azt tapasztalták, hogy sem a Dab aminosav jelenléte, sem pedig az N-terminális acetyl-csoport Tfa-csoporttal történő helyettesítése nem változtatta meg jelentősen a túlnyomórészt α -helikális szerkezettel jellemezhető konformációt.

Összefoglalás

Az eddigi szerkezetvizsgálati munkák során az ALM analógokat, valamint ezen peptidek szerkezetileg módosított változatait különféle kísérleti (röntgenkristallográfia; CD, IR, FTIR, ESR és NMR spektroszkópia) és elméleti módszerekkel (SA és MD) tanulmányozták eltérő körülmények között, illetve különböző környezetben. Az eredmények alapján az derült ki, hogy az ALM analógok többsége valamilyen helikális szerkezettel, leginkább α -helikális struktúrával jellemezhető, amelyet karakterisztikus intramolekuláris H-kötések stabilizálnak. Az eredmények arra is utaltak, hogy különböző környezetben az ezen peptidekre jellemző helikális szerkezet minősége és mennyisége más-más lehet. Az ALM analógok, illetve szerkezetileg módosított változatai esetén kapott eredmények arra is rámutattak, hogy vannak olyan szerkezeti módosítások, amelyek változásokat idéznek elő a peptidek helikális tartalmát és konformációs sajátságait illetően. Ugyanakkor megfigyeltek olyan szerkezeti módosításokat is, amelyek nem változtatták meg jelentős mértékben az ALM peptidek preferált másodlagos szerkezetét és konformációs sajátságait.

Köszönetnyilvánítás

A kézirat elkészítése a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kézirat elkészítése az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) K 106000 támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- [1] Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. (2005) Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* - A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **52**: 137-168.
- [2] Peptaibiotics, (2007) *Chem Biodivers*, **4**: 1021-1412.
- [3] Peptaibiotics II, (2013) *Chem Biodivers*, **10**: 731-961.
- [4] Leitgeb, B. (2014) Bioaktív peptaibol molekulák. *Bio kémia*, **XXXVIII(2)**: 36-49.
- [5] Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2007) The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chem Biodivers*, **4**: 1027-1051.
- [6] Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vágvölgyi, C., Leitgeb, B. (2013) Recent results in alamethicin research. *Chem Biodivers*, **10**: 744-771.
- [7] Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., Brückner, H. (2003) Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J Pept Sci*, **9**: 799-809.
- [8] Molle, G., Duclohier, H., Dugast, J.-Y., Spach, G. (1989) Design and conformation of non-Aib synthetic peptides enjoying alamethicin-like ionophore activity. *Biopolymers*, **28**: 273-283.
- [9] Duclohier, H., Molle, G., Dugast, J.-Y., Spach, G. (1992) Prolines are not essential residues in the "barrel-stave" model for ion channels induced by alamethicin analogues. *Biophys J*, **63**: 868-873.
- [10] Brachais, L., Duclohier, H., Mayer, C., Davoust, D., Molle, G. (1995) Influence of proline-14 substitution on the secondary structure in a synthetic analogue of alamethicin. *Biopolymers*, **36**: 547-558.
- [11] Brachais, L., Mayer, C., Davoust, D., Molle, G. (1998) Influence of the secondary structure on the pore forming properties of synthetic alamethicin analogs: NMR and molecular modelling studies. *J Pept Sci*, **4**: 344-354.
- [12] Haris, P. I., Molle, G., Duclohier, H. (2004) Conformational changes in alamethicin associated with substitution of its α -methylalanines with leucines: a FTIR spectroscopic analysis and correlation with channel kinetics. *Biophys J*, **86**: 248-253.
- [13] Kaduk, C., Duclohier, H., Dathe, M., Wenschuh, H., Beyermann, M., Molle, G., Bienert, M. (1997) Influence of proline position upon the ion channel activity of alamethicin. *Biophys J*, **72**: 2151-2159.
- [14] Bak, M., Bywater, R. P., Hohwy, M., Thomsen, J. K., Adelhorst, K., Jakobsen, H. J., Sorensen, O. W., Nielsen, N. C. (2001) Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by ^{15}N solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J*, **81**: 1684-1698.

- [15] Kaduk, C., Dathe, M., Bienert, M. (1998) Functional modifications of alamethicin ion channels by substitution of glutamine 7, glycine 11 and proline 14. *Biochim Biophys Acta*, **1373**: 137-146.
- [16] Noshiro, D., Asami, K., Futaki, S. (2012) Control of leakage activities of alamethicin analogs by metals: side chain-dependent adverse gating response to Zn²⁺. *Bioorg Med Chem*, **20**: 6870-6876.
- [17] Maisch, D., Wadhvani, P., Afonin, S., Böttcher, C., Kokschi, B., Ulrich, A. S. (2009) Chemical labeling strategy with (*R*)- and (*S*)-trifluoromethylalanine for solid state ¹⁹F NMR analysis of peptaibols in membranes. *J Am Chem Soc*, **131**: 15596-15597.
- [18] Stella, L., Burattini, M., Mazzuca, C., Palleschi, A., Venanzi, M., Coin, I., Peggion, C., Toniolo, C., Pispisa, B. (2007) Alamethicin interaction with lipid membranes: a spectroscopic study on synthetic analogues. *Chem Biodivers*, **4**: 1299-1312.
- [19] Crisma, M., Peggion, C., Baldini, C., MacLean, E. J., Vedovato, N., Rispoli, G., Toniolo, C. (2007) Crystal structure of a spin-labeled, channel-forming alamethicin analogue. *Angew Chem Int Ed*, **46**: 2047-2050.
- [20] Fox, R. O., Richards, F. M. (1982) A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature*, **300**: 325-330.
- [21] Peggion, C., Jost, M., De Borggraeve, W. M., Crisma, M., Formaggio, F., Toniolo, C. (2007) Conformational analysis of TOAC-labelled alamethicin F50/5 analogues. *Chem Biodivers*, **4**: 1256-1268.
- [22] Jose, R. A., De Zotti, M., Peggion, C., Formaggio, F., Toniolo, C., De Borggraeve, W. M. (2011) Comparison of distance information in [TOAC¹, Glu(OMe)^{7,18,19}] alamethicin F50/5 from paramagnetic relaxation enhancement measurements with data obtained from an X-ray diffraction-based model. *J Pept Sci*, **17**: 377-382.
- [23] Milov, A. D., Samoilova, R. I., Tsvetkov, Y. D., De Zotti, M., Toniolo, C., Raap, J. (2008) PELDOR conformational analysis of bis-labeled alamethicin aggregated in phospholipid vesicles. *J Phys Chem B*, **112**: 13469-13472.
- [24] De Zotti, M., Ballano, G., Jost, M., Salnikov, E. S., Bechinger, B., Oancea, S., Crisma, M., Toniolo, C., Formaggio, F. (2014) Solution synthesis, conformational analysis, and antimicrobial activity of three alamethicin F50/5 analogs bearing a trifluoroacetyl label. *Chem Biodivers*, **11**: 1163-1191.



Leitgeb Balázs 2000-ben kémia tanári és 2002-ben biológia tanári diplomát szerzett a Szegedi Tudományegyetemen, majd ezt követően 2006-ban szerezte meg PhD fokozatát. 2004 óta az MTA SZBK Biofizikai Intézetében végzi kutatómunkáját, és 2009-2012 között egy hároméves OTKA posztdoktori kutatási pályázat témavezetője volt. 2010-ben megkapta az Akadémiai Ifjúsági Díjat, illetve 2010-től kezdődően három évre elnyerte a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjat. Ezt követően 2013-ban 16 hónapra elnyerte a Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíjat, amelynek keretében az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén is folytatja kutatói és oktatói tevékenységét. Fő kutatási területe bioaktív peptidek térszerkezetének, folding folyamatainak, szerkezet-aktivitás összefüggéseinek és hatásmechanizmusának tanulmányozása molekulamodellézési módszerek alkalmazásával.

PROLÓGUS

A FEBS fennállásának 50. évfordulójára az MBKE *ad hoc* bizottsága egy válogatást állított össze a FEBS Letters-ben és FEBS Journal-ben megjelent reprezentatív magyar cikkekből, amely a „*FEBS 50th Anniversary Virtual Issue: Hungary (July 2014)*” kiadványban jelent meg és a FEBS, az MBKE honlapon és az alábbi linken olvasható: <http://www.febs.org/our-publications/febs-50th-anniversary-virtual-issues/hungary/>.

Új rovatunkban egy-egy cikk szerzőit megkérjük, hogy írjanak a felfedezésük és a cikkük előzményeiről, utóéletéről, továbbá mit gondolnak a siker, a magas idézettség kulcstényezőjének.

A szerkesztőbizottság

EGY DOLGOZAT ELŐ- ÉS UTÓÉLETE

Keszthelyi, L. and Ormos, P. Electric signals associated with the bacteriorhodopsin photocycle. FEBS Lett. 109 (1980) 189-193.

A közleményről Keszthelyi Lajos és Ormos Pál egymás után írják le gondolataikat – ebből ered némi redundancia, kérjük, nézzék ezt el.

Keszthelyi Lajos

A bakteriorodopszin (BR) témát Dancsházy Zsolt hozta az SZBK-ba Szegedre 1974-75 körül. Akkor tért haza a Szovjetunióból, ahol Szkulacsev professzor aspiránsaként foglalkozott a témával. Hozott anyagot is, részben már preparált „purple membrane”-t (pm), részben *Halobacterium halobium* (ma *H. salinarum* *H. halobium* helyett) sejteket. Megszervezte a sejtek tenyésztését, a membránok szeparálását.

Ismert volt már akkor, hogy a BR a szeparálás után is megőrzi működő képességét, azaz fény hatására protonokat pumpál át a pm egyik oldaláról a másikra az ún. fotociklus során. A fotociklust időben egymást követő, különbözőideig tartó abszorpcióváltozások jellemezték. Nevet is kaptak: J, K, L, M, N, O intermediérek alkotják a fotociklust.

Karvaly Béla korábban már bilayer membránokkal foglalkozott. Dancsházyval szövetkezve a technikát a BR kutatásra használták nagyon eredményesen. A szeparált pm-et a bilayer membránba építve és azt megvilágítva elektromos feszültséget tudtak mérni, amely jelezte a rendszer működőképességét [1]. Ennek birtokában sikerült kimutatniuk, hogy a zöld fénnel keltett elektromos potenciált kék fénnel csökkenteni lehet [2]. Ez lett az első jel arra, hogy az optikai mérésekből már ismert jelenség, a kék fényhatás rövidre zárja a fotociklust, azaz megszünteti a protonok pumpálását.

A szerzőkhöz csatlakozott Ormos Pál is. A következő ún. követő dolgozatban már ő is társszerzőként szerepelt [3]. Meg kell említeni Nagy Károly munkáját, amelyben orientált, száraz mintán sikerült fotoelektromos aktivitást mérnie [4].

1977-78-ban érdeklődni kezdtem a BR téma iránt. A BR fény hatására protonokat pumpál a membrán egyik oldaláról a másikra, ezeket vissza kell venni, hogy a következő ciklus indulhasson. Tehát a protonok bizonyos ideig szabadon vannak az oldatban. Azt gondoltam, hogy ekkor megnő az oldat vezetőképessége, aminek az időfüggése fontos információkat adhat. Egy KFKI-s sokcsatornás analizátort már beszereztünk, amely időben is tudta követni az egyes impulzusok amplitúdóját. A felbontás csak 40 μ s volt. Elkezdtem mérgetni. Az egyszerűség kedvéért a biológusok által használt rugalmas csövekbe szívtam pm szuszpenziót, két platina drótot szúrtam a csőbe kb. egy cm távolságban. Erre feszültséget kapcsoltam, majd lézerrel rávillantottam. Nagyon nagy jelet kaptam, egyáltalán nem olyat, mint amelyet az elgondolás alapján vártam. Közben a KFKI-ból vettünk egy 0,1 μ s felbontású műszert, amellyel aztán teljesen meglepő jeleket kaptam. Egy új világ tárult fel előttem...

Arra gondoltam, hogy a BR-et tartalmazó pm-ek talán orientálódnak a külső elektromos tér hatására és a mért jel nem más, mint a protonok fehérjén belüli egyirányú mozgása okozta áram. A feladat már adódott: meg kell nézni van-e orientáció. Semmit nem tudtam arról, hogy kell ilyesmit mérni. Megnéztem a könyveket és elkezdtem mérni az orientáció okozta optikai változásokat. Megint csak az én egyszerű csövecskéimmal. Csodák csodájára megjelent az orientáció jele, ahogy az a könyvekben szerepelt. Áttértem rendesebb küvettára és végigtanulmányoztam a témát [5].

Közben Ormos Pali csatlakozott hozzám és bölcs tanácsára az elektromos jeleket is küvettában kezdtük mérni. A mérés lényege az, hogy az oldatban orientált mintában a lézer impulzus hatására mintegy 10^{14} molekulát gerjesztünk, ennyi proton mozog egyszerre, egy irányban, amely könnyen mérhető nagyságú áramot okoz a külső körben. Az áramot időben felbontva különböző komponenseket találtunk. Ugyanazon a mintán mértük az optikai jeleket is, amelyek ismert módon megadják a fotociklus komponenseit. Az elektromos és az optikai jeleket összehasonlítva a jeleket fotociklus átmenetekhez lehetett rendelni. Így lett az optikai és az elektromos ciklus egy jelenség, a fotociklus kétféle megnyilvánulása. Az elektromos jeleket sikerült egyetlen leírni (ebben sokat segítettek a fizikusi múltamban a multiplierekkel szerzett tapasztalataim). Az egyenlet segítségével a meghatároztuk, hogy a protonok fehérjén belül az egyes lépésekben mekkora távolságot tesznek meg.

Az orientációt egyedül [5], az elektromos jelet Ormos Palival együtt publikáltam [6]. Az elektromos jelnek nevet is adtunk: protein electric response signal, PERS. A PERS terén a második cikkünk a laborunkban korábban már felismert kék hatás [2] időbeli felbontásával foglalkozott. Kimutattuk, hogy a zöld fény hatására elmozduló töltés a kék fény hatására ugyanakkora távolságot tesz meg a vissza úton, mint az előre úton [7] A kék hatás időfelbontását jóval később, már jobb műszerekkel pontosítottuk [8, 9].

Megtudtam, hogy régi amerikai barátom, Hans Frauenfelder kapcsolatba került Walther Stoeckenius-szal, a BR egyik felfedezőjével. Sikerült Hansszal megbeszélni, hogy pályázzunk egy hármás National Science Foundation (NSF) és a Magyar Tudományos Akadémia (MTA) közti együttműködésre. A pályázatot elfogadta mindkét fél. Ezzel beindult egy kb. 10 évre kiterjedő nagyon sikeres együttműködés két kiváló amerikai laboratóriummal. Kollégáim és én is sokat profitáltam a hosszú együttműködésből. A nyolcvanas években csaknem minden évben néhány hétre Urbanaba és San Franciscóba utaztam. A kapcsolatokra támaszkodva megszerveztem egy nemzetközi iskolát. Pályázat útján kaptunk támogatást az ICRO-tól (International Cell Research Organization), de csak gyakorlati oktatásra. Tíz gyakorlatot szerveztem, mindegyiket más külföldi vezetővel, kivéve persze a PERS gyakorlatot, melyet Ormos Pál vezetett. Úgy gondolom, hogy akkor mindenki Szegeden tartózkodott, aki a BR szakmában számított. Fiatal munkatársaimnak az iskola sokat segített, megismerték őket, tágult látóköriük. Ilyen ügy addig még nem sikerült, elzártságunk oldódott. Még Izraelből és Kínából is jöttek résztvevők.

Tanulásként leszűrtem, hogy ilyen kisebb összejöveteleket érdemes szervezni, mert rendkívül nagy a hasznuk. Megtörik a zártság. Ez 1980-ban történt, de 81-ben és 82-ben is szerveztem meeting-et. Mindig kiváló kollégák jöttek, hozták tudásukat és vitték jó hírünket. Ilyenekben is kihasználtam az NSF nyújtotta lehetőségeket, azaz a programban szereplők költségeit innen fedeztük. Ehhez nagyon kellett az SZBK kiváló infrastruktúrája, a vendégszobák, a konyha, a nagyszerű előadóterem. Használtuk azt, amit rendelkezésre állt. Következésképpen kirajzottak az ifjak Amerikába, ott megalapozták a jövőjüket. Mindannyian kiválóan teljesítettek, igazán büszke lehettem rájuk.

Közben két ifjú munkatársam lényeges technikai újítással könnyebben kezelhető és kicsit más lehetőségeket nyújtó módszereket fejlesztett ki. Dér András az orientált membránokat gélben fixálta [10], Váró György az orientált pm-et megszáritotta [11-13]. A gél módszer megalkotása után már alig használtuk az eredeti szuszpenziós orientálást és mérést, az orientált száraz mintát a nedvességfüggés alapkérdései után csaknem mindig technikai problémákhoz használtuk. Mindkét módszer széles körben elterjedt más kutató csoportoknál is és sok hivatkozást kapott.

Összefoglalva: ezekben az évben oly sok cikket ugyan nem irtunk, mint egy nagy nyugati labor tette volna, de ami megjelent, abban volt lényeges újdonság. Az eredmény abban is mérhető, hogy két cikk írására is felkértek a *Methods in Enzymology* sorozatban [14, 15], valamint egy összefoglalásra a *Journal of Membrane Biology*-ban [16].

Feltétlenül meg kell említeni a száraz minta egyik kiemelkedő alkalmazását. Groma Gézával arról beszélgettünk, hogy lehet-e mérni a BR első elektromos válaszát a fotociklusban. Optikai mérésekből már tudtuk, hogy pikoszekundum időről van szó. Kellott tehát gyors ps lézer, és elektromos jelet mérő műszer. Nekünk egyik sem volt, csupán a száraz orientált minta. Lézert kértünk a Szegedi Egyetemről és egy gyors elektromos jeleket mérő oszcilloszkópot a Műszaki Fizikai Kutató Intézetből. Gézának sikerült a mérés, gondosan kiértékelte és a *Nature*-ben megjelentette [17]. Ilyen gyors bioelektromos jelet addig még senki sem mért.

Valahogy úgy alakult, hogy csoportunk a PERS mérésekkel vált ismertté a BR kutatók nemzetközi társaságában. Sok kollégánk sok dolgozatot közölt a témakörben. Mindannyit nem említhetem, de a *FEBS Letters*-ben megjelent cikk adatait összegyűjtöttem az irodalomjegyzékben [18-21].

Ormos Pál

Fizikus hallgató koromban kezdtem a biofizika iránt érdeklődni. Diplomamunkámat az akkor vadonatúj SZBK-ban készítettem, témám biológiai modellmembránokon fotoelektromos effektusok tanulmányozása volt. Ez akkor forradalmian új dolog volt, tulajdonképpen ma is kurrens terület. Témavezetőm Karvaly Béla volt, ő is nem sokkal korábban lett biofizikus (szegedi optikusból), különösen jó intuícióval választotta kutatási területének a membránmodellek (elsősorban a BLM – bimolekuláris lipid membránmodell) biofizikáját. Nagy szerencsém volt, hogy csoportjában kezdődött a pályafutásom. Végzés után gyakornokként a

Biofizikai Intézet munkatársa lettem. Egy évvel korábban került az intézetbe Dancsházy Zsolt: ő Moszkvában végzett a Lomonoszov Egyetemen, témavezetője Vlagyimir Szkulacsov, a kiváló orosz bioenergetikus volt, aki nagyon hamar bekapcsolódott a bakteriorodopszin fényenergia átalakító membránfehérje kutatásába. Dancsházy „importálta” a bakteriorodopszint Szegedre, és Karvaly Bélával a bakteriorodopszin protonpumpát sikerült beépíteniük a BLM-be. Ez alapvető eredmény és igen nagy nemzetközi siker volt: kvantitatívan jól vizsgálható bioenergetikai modellrendszert sikerült előállítaniuk – kiváló FEBS Letters közlemény született [1]. Ráadásul szinte azonnal felfedeztek egy nagyon érdekes effektust: a bakteriorodopszin fotokémiai reakciósorát egy köztestermék fényvel való gerjesztésével jelentősen módosítani lehetett, és ez a protonpumpa aktivitását is döntően befolyásolta. Ebből is nagyon sikeres cikket írtak, szintén a FEBS Letters-be [2]. Nagyon érdekes témakörrel lévén szó, szinte automatikusan bekapcsolódtam a munkába, én is a téma művelője lettem. E kettős fénygerjesztéses effektust vizsgáltuk részletesebben, kinetikai modellel sikerült a jelenséget kvantitatívan megmagyaráznom. Ebből született életem első közleménye [3], meglehetősen sikeres lett, ötvennél több hivatkozást kapott. A munka sikeresen folytatódott egy darabig, született néhány jó közlemény. Nemsokára azonban Karvaly Béla csoportja megszűnt, Béla 1980-ban végleg el is hagyta az országot.

Időközben Keszthelyi Lajos is elkezdett érdeklődni a BR iránt. Észrevette, hogy a bakteriorodopszint tartalmazó bíbor membrán fragmentumok nagy permanens elektromos dipólmomentummal rendelkeznek, és ezért elektromos térrel orientálhatóak, a jelenséget részletesen leírta, értelmezte. Felmerült, hogy e rendszeren is lehetne a protonpumpa aktivitását vizsgálni. Megkérdezte, lenne-e kedvem vele dolgozni e témán. A következő jó néhány évben ezután Keszthelyi Lajos közvetlen munkatársa lettem. Évekig együtt dolgoztunk, egy laboratóriumban közösen – egymás mellett ülve - kísérleteztünk, együtt gondolkodtunk a tapasztaltakon, együtt értelmeztük az eredményeket, írtuk a cikkeket, beszélgettünk. Akkor is nagyon élveztem a dolgot, utólag visszatekintve akkor váltam igazi kutatóvá, életem egyik nagy élménye volt, nagy szerencsém, hogy részem volt benne.

Arról nem is beszélve, hogy rögtön nagyon érdekes eredményünk született: az orientált membrán szuszpenzióon sikerült nagy időfeloldással megmérni a proton pumpálási folyamat által eredményezett elektromos jeleket, ráadásul, mivel egyszerre igen sok molekulán mértünk, abszorpciókinetikai méréseket lehetett végezni a fotoelektromos mérésekkel egy időben. Kiderült, hogy a protonok mozgása pontosan követi a BR abszorpciókinetikai úton jellemzett reakciólépéseit, vagyis a proton transzport tökéletesen szinkronizálva van a fotokémiai reakciósorhoz. A kísérleti rendszer arra is lehetőséget adott, hogy meghatározzuk, mekkora töltésmozgás történik az egyes lépésekben. Ezt az eredményt írtuk le a most főszereplő közleményben [6]. Ez nagyon fontos eredménynek bizonyult a BR kutatásában. Természetesen komoly előrelépés volt a pumpálás mechanizmusának a megértésében. Az eredmény nagy érdeklődést keltett, lényeges hatása volt további életemre. Egyrészt e téma folytatása, további kifejtése évekre munkát adott csoportunknak. Ugyanilyen fontosnak

bizonyult, hogy azonnal komoly tekintélyünk lett a releváns kutató közösségben, részben e közleménynek köszönhetően is számos kiváló kutatóval kerültem munkakapcsolatba, közeli, sokszor baráti viszonyba – bár már döntően más területen dolgozom, e kapcsolatok jó része ma is él.

A tárgyalt dolgozat által bemutatott megközelítési mód igen sok eredményt hozott a transzportfolyamat részleteiről, rajunk kívül mások is eredményesen alkalmazták. Fontos újításokat értek el munkatársaink a továbbfejlesztésben, ezekről Keszthelyi Lajos már írt. Egy további munkáról még szólok, erre különösen büszke vagyok: fotoszelekciós eljárást találtam ki arra, hogyan lehet a proton mozgását mindhárom dimenzióban leírni. Az eredeti eljárásnak ugyanis az a korlátja, hogy a fotoelektromos mérésekben a mozgásnak csak a pumpálás irányába mutató komponense látszik (ez a bíbor membrán esetében a membránra merőleges irány) – egyébként más rendszereken végzett fotoelektromos mérésekben is ez a helyzet. A mérést a Dér András által kidolgozott „géles” eljárással [10] – amelyben a bíbor membrán fragmentumok orientáltan gélben rögzítve helyezkednek el – Andrással, Lajossal és más munkatársakkal meg tudtuk valósítani [22]. A teljes térbeli töltésmozgás ismeretében sokkal jobban egymáshoz lehetett rendelni a töltésmozdulásokat és a fehérje szerkezetet. Ezt az egyik legértékesebb cikkünknek tartom.

Nagyon örülök, hogy szerencsés módon szó került most erről a cikkről. Számos szempontból lényeges szerepet tölt be az életemben, kutatói pályám egyik meghatározó eseménye, boldog vagyok, hogy leírhattam én is a történetét.

Irodalomjegyzék

- [1] Dancsházy, Z. and Karvaly, B. (1976) Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane: a photoelectric spectroscopy study. *FEBS Lett* 72: 136-138.
- [2] Karvaly, B. and Dancsházy, Z. (1977) Bacteriorhodopsin: a molecular photoelectric regulator. *FEBS Lett* 76: 36-40.
- [3] Ormos P., Dancsházy Z. and Karvaly, B. (1978) Mechanism of generation and regulation of photopotential by bacteriorhodopsin in bimolecular lipid membrane. *Biochem Biophys Acta* 503: 304-315.
- [4] Nagy, K. (1978) Photoelectric activity of dried, oriented layers purple membrane from Halobacterium halobium. *Biochem Biophys Res Comm* 85: 383-390.
- [5] Keszthelyi, L. (1980) Orientation of membrane fragments by electric field. *Biochem Biophys Acta* 598: 429-436.
- [6] Keszthelyi, L. and Ormos. P. (1980) Electric signals associated with the bacteriorhodopsin photocycle. *FEBS Lett* 109: 189-193.
- [7] Ormos, P., Dancsházy, Z. and Keszthelyi, L. (1980) Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys J* 31: 207-21.
- [8] Tóth-Boconádi, R., Dér, A., Fábíán, L., Taneva, S.G. and Keszthelyi, L. (2009) Excitation of the M intermediates of bacteriorhodopsin. *Photochem Photobiol* 85: 609-613.

- [9] Tóth-Boconádi, R., Dér, A., Taneva, S.G. and Keszthelyi, L. (2010) Excitation of the M intermediates of wild-type bacteriorhodopsin and mutant D96N: temperature dependence of absorbance, electric responses and proton movements. *Theor Chem Accounts* 125: 365-373.
- [10] Dér, A., Hargittai, P. and Simon, J. (1985) Time resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membranes immobilised in gels. *J Biochem Biophys Meth* 10: 295-300.
- [11] Váró, G. Dried oriented purple membrane samples. (1982) *Acta Biol Acad Sc Hung* 32: 301-310.
- [12] Váró, G. and Keszthelyi, L. (1983) Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of Halobacterium halobium. *Biophys J* 43: 47-51.
- [13] Váró, G. and Keszthelyi, L. (1985) Arrhenius parameters of the bacteriorhodopsin photocycle in dried oriented samples. *Biophys J* 47: 243-246.
- [14] Keszthelyi, L. (1982) Orientation of purple membrane by electric field. *Meth Enzym* 88: 287-297.
- [15] Keszthelyi, L. (1986) Displacement current in protein sas a measure of proton movements in bacteriorhodopsin. *Meth Enzym* 121: 610-618.
- [16] Keszthelyi, L. and Ormos, P. (1989) Protein electric response signals from dielectrically polarized systems. *J Membrane Biol* 109: 193-200.
- [17] Groma, G.I. Szabo, G. and Varó, G. (1984) Direct measurement of picosecond chargeseparation in bacteriorhodopsin. *Nature* 308: 557-558.
- [18] Dér, A., Fendler, K., Keszthelyi, L. and Bamberg, E. (1985) Primary chargeseparation in halorhodopsin. *FEBS Lett* 187: 233-236.
- [19] Tóth-Boconádi, R. Hristova, S.G. and Keszthelyi, L. (1986) Diamines reverse the direction on the bacteriorhodopsin proton pump. *FEBS Lett* 195: 164-168.
- [20] Dér, A., Tóth-Boconádi, R. and Keszthelyi, L. (1989) Bacteriorhodopsin as a possible chloride pump. *FEBS Lett* 259: 24-26.
- [21] Dér, A., Tóth-Boconádi, R., Keszthelyi, L. Kramer, R. and Stoeckenius, W. (1995) Orientation of purple membrane in combined electric and magnetic field. *FEBS Lett* 317: 419-420.
- [22] Dér A., Oroszi L., Kulcsár Á., Zimányi L., Tóth-Boconádi R., Keszthelyi L., Stoeckenius W. and Ormos P. (1999) Interpretation of the spatial charge displacements in bacteriorhodopsin in terms of structural changes during the photocycle, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2776-2781.



Keszthelyi Lajos atomfizikus, biofizikus, akadémikus. Az MTA SZBK főigazgatója (1989–1993), az USA-ban vendégprofesszor (1987, 1988, az MTA KFKI Biofizikai Kutatócsoport vezetője (1973–1988), az ELTE Fizikai Intézet egyetemi tanára (1982-től). Kísérleti atommagfizikával, majd a nukleáris módszerek biofizikai alkalmazásával foglalkozott. Nevéhez fűződik az első magyarországi szcintillációs számláló berendezés megépítése. Magyarországon először végzett gyorsító mellett magfizikai alaputatást, a magreakciókban keletkező nagyenergiájú sugárzásokkal további magreakciókat hozott létre. Új eredményeket ért el a könnyű atommagok gerjesztett állapotai mágneses nyomatókának mérése terén. Kidolgozta a PIXE (proton indukált röntgensugárzás) módszert, meghonosította a Mössbauer-spektroszkópiát, az ion-visszaszórásos spektrometriát,

a perturbált szöghorreláció módszerét a magreakciók, a pozitron-annihiláció módszerét a kondenzált rendszerek vizsgálatára. A biofizika terén a biológiai aszimmetria eredete, illetve a bioenergetika kutatásának művelője. Eredményeivel jelentősen hozzájárult a bakteriorodopszin fényenergia–elektromos energia átalakítási működésének megértéséhez. Számos elismerésben részesült, többek között a Széchenyi-díj, a Magyar Tudományos Akadémia Aranyérme, a Magyar Érdemrend Középkeresztje a Csillaggal kitüntetés tulajdonosa.



Ormos Pál fizikus, akadémikus, az SZBK főigazgatója 2010 óta. Összesen 6 évet töltött a Department of Physics, University of Illinois, Urbana, Il., USA egyetemen. Fő kutatási területei: fehérjék szerkezetének és működésének kapcsolata, energiaátalakító fehérjék működése, optikai mikromanipuláció, nanobiotechnológia, mikrofluidika. Kitüntetései: Széchenyi-díj (2002), Pro Urbe díj, Szeged (2011). Tudományos közleményeire a szakirodalomban több mint 4000 hivatkozást kapott.

BESZÁMOLÓ A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET 2014. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSÉRŐL

Az MBKE 2014. augusztus 24-27. között tartotta meg a Vándorgyűlését Debrecenben, az egyetem Élettudományi épületében. A konferencia szatellit programja a FEBS Molekuláris Élettudományok Oktatási Munkaértekezlete volt, lásd Dux László beszámolóját. A korábbiaktól eltérően a vándorgyűlés angol nyelven került megrendezésre. A konferenciára több mint kétszázan regisztráltak. A mintegy háromnapos program plenáris előadásokkal kezdődött, a Tankó Béla díjjal kitüntetett Venetianer Pál (életműdíj, SZBK) és Nagy László (kimagasló teljesítményért, DE) előadásait Wilbert Zwart (NKI, Amszterdam) prezentációja követte. A nyitónap zárásaként a Bio-Science díjas Takáts Szabolcs (ELTE) adott elő. A tudományos előadások a membránbiokémia; genomika és epigenetika; sejthalál és differenciáció; omikák, lipidomika és proteomika; őssejtek; genomszerkezet, funkció és fenntartás; poszttranszlációs módosítások; biokristallográfia és szerkezeti biológia; biokémiai farmakológia; patobiokémia és organellum biokémia szekciókban párhuzamosan zajlottak. Összességében több mint hetven előadás hangzott el, a szekciók párhuzamos lebonyolítása lehetővé tette számos fiatal kolléga bemutatkozását is. A legjobb fiatal előadók, Pomozi Viola (I), Nagy Gergely (II) és Lontay Beáta (III) a Sigma-Aldrich Kft díjait vehették át. Plenáris szekcióban adtak elő az MBKE 2013. illetve 2014. évi publikációs díjazottjai, Sarlós Kata (ELTE) és Róna Gergely (TTK). Az MBKE éves közgyűlése is a konferencia keretében került megrendezésre. Az előadások mellett 65 poszter is bemutatásra került, három poszter bemutatója, Bátori Róbert (I), Mórocz Mónika (II) és Fodor Tamás (III) az UD-Genomed díjait vehette át. A konferencia sikeres megrendezését húsz kiállító cég jelenléte is segítette.

A tudományos programok mellett sor került a Bio-Science által szponzorált borkóstolásra, az egyetem patinás főépülete előtti grillpartira, valamint ellátogattunk a Fráter tanyára is, ahol folklór műsor is szolgálta a kikapcsolódást.

A szervezőbizottság nevében köszönöm a résztvevőknek, hogy egy tudományosan magas szintű, izgalmas konferenciát rendezhettünk.

Tózsér József
a konferencia főszervezője
DE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet



Sigma díjazottak



UD GenoMed 1. díj



UD GenoMed 2. díj





ÖSSZEFOGLALÓ A „WORKSHOP ON MOLECULAR MEDICINE AND LIFE SCIENCE EDUCATION” CÍMMEL MEGRENDEZETT ELSŐ MAGYARORSZÁGI FEBS OKTATÁSI MUNKAÉRTEKEZLETRŐL

2014. augusztus 24-25-én zajlott le a Debreceni Egyetem Élettudományi épületében az első magyarországi FEBS oktatási munkaértekezlet „*Workshop on Molecular Medicine and Life Science Education*” címmel. A rendezvény megvalósítását a FEBS Education Committee és a TÁMOP 4.1.1.C-13/1/KONV: „*Az élettudományi-klinikai felsőoktatás gyakorlatorientált és hallgatóbarát korszerűsítése a vidéki képzőhelyek nemzetközi versenyképességének erősítésére*” című pályázat támogatta. Az 58 regisztrált résztvevő, többségében fiatal oktató, PhD hallgató, demonstrátor jól reprezentálta a hazai biokémia, molekuláris medicina oktatói utánpótlását.

Vendégelőadóként részt vett a rendezvényen Gül Güner Akdogan professzor aszony, a FEBS Education Committee elnöke, valamint Mathias Sprinzl professzor a bayreuthi egyetem tanára.

Az első napon előadások hangzottak el a „problem based” biokémia oktatás izmiri, szegedi és manchesteri tapasztalatairól. Kiscsoportos foglalkozások keretében a résztvevők maguk is kipróbálhatták probléma-megoldási készségüket a szegedi orvoskar Biokémiai Intézet oktatói, Görbe Anikó és Keresztes Margit irányításával.

A második nap bevezető előadásában Mathias Sprinzl professzor a tudományos közlemények elkészítésének fontosabb szempontjait tekintette át. Ezt követően egy valódi „hungarikum”, a tudományos diákköri mozgalom működését mutatták be hazai egyetemek tudományos diákköri vezetői: Csont Tamás (Szeged), Kovács Mihály (ELTE), Erdődi Ferenc (Debrecen), Gallyas Ferenc (Pécs).

A FEBS Education Committee elnöke, Gül Güner professzor irígylésre méltó sikertörténetnek nevezte az egyetemi hallgatók bevonását a magyarországi tudományos kutatásokba, egyúttal kezdeményezte, hogy a 2015. évi berlini FEBS kongresszus oktatási szekciója a hallgatói kutatómunkát válassza témájául.

Dux László
MBKE-FEBS Education Committee összekötő



BESZÁMOLÓ A „DANUBE SCIENTIFIC CONFERENCES ON EPIGENETICS” RENDEZVÉNYRŐL

DANUBE SCIENTIFIC CONFERENCES ON EPIGENETICS

Budapest, 2014 • November, 19-21



2014. november 19-21. között az MBKE égisze alatt Budapesten került megrendezésre a Danube Scientific Conference on Epigenetics c. tudományos konferencia, amely betekintést adott az epigenetika, e robbanásszerűen fejlődő tudományág legfontosabb témáiba. Az epigenetikai kutatások azt vizsgálják, hogy milyen mechanizmusok által öröklődik (vagy sem) egy meglévő gén információja egyik generációból a másikba. A konferencián az előadók és a hallgatóság olyan kérdésekre keresték a válaszokat, milyen epigenetikai vonatkozásai vannak a transzkripció szabályozásnak, milyen szerepe, hatása van az epigenetikának az anyagcsere, az embrionális fejlődés és a cirkadián ritmus szabályozásában.

Mind a Tudományos Szervező Bizottság, mind a meghívott előadók a téma világszerte elismert szakértői, akik fontosnak tartják eredményeik megosztását az érdeklődő nem szakmabeliekkel is. A transzkripció szabályozás és epigenetikai mechanizmusok szakterületek vezető képviselői jöttek el Budapestre, sokan

közülük külföldön élő magyar kutatók. A Gellért Hotelben megrendezett nyitó díszelőadás és gálavacsora után a konferencia két napos programjának a Magyar Tudományos Akadémia új, Duna-parti Természettudományi Kutatóközpontja adott helyet.

A szervezőbizottság tagjain, valamint a meghívott 15 előadón túl a rendezvényre 55 szenior és 80 junior kutató regisztrált szerte Európából, de érkeztek résztvevők az Egyesült Államokból és Izraelből is, összesen 17 országból. Előadónak 7 ERC grant-tal rendelkező kutatót, illetve 7 EMBO tagot vagy EMBO Young Investigator-t sikerült felkérni. A résztvevők 60%-a magyar intézményekből érkezett. Az epigenetikában érdekelt kutatók részéről 80 absztrakt illetve poszter került beküldésre és kiállításra. A beküldött absztraktok alapján minden szekcióba beválasztásra kerültek további előadások, valamint sor került a legjobb előadás (Pankotai Tibor) és a legjobb poszterek díjának átadására (Bártfai Richárd, Federica Gilardi, Zsindely Nóra). A tudományos program a résztvevők értékelése szerint megfelelően változatos és eredeti. A konferencia résztvevői az előadások szünetében megismerhették a kiállító szponzor cégek¹ termékeit és szolgáltatásait.

A konferenciasorozat következő állomásaként a tervek szerint 2016 októberében kerül ismét sor nemzetközi találkozóra. Az együttműködés fenntartása és kiszélesítése érdekében a Szervező Bizottság kezdeményezi az MBKE keretén belül Epigenetikai Szakosztály létrehozását.

Tudományos Szervező Bizottság:

Wendy Bickmore (MRC University of Edinburgh, UK),

Boros Imre (MTA SZBK és Szegedi Egyetem),

Nagy László (Debreceni Egyetem ill. Sanford Burnham, FL, USA),

Székvölgyi Lóránt (Debreceni Egyetem),

Iannis Talianidis (Fleming Institute, Görögország),

Tora László (IGBMC, Franciaország)

Meghívott előadók (a Tudományos Szervező Bizottság tagjain túl):

Paolo Sassone-Corsi (University of California, Irvine, USA)

Ido Amit (Weizmann Institute, Rehovot, Israel)

Arányi Tamás (MTA TTK)

Bálint Bálint László (Debreceni Egyetem)

Maxime Dahan (Centre National de la Recherche Scientifique France; Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie-Paris, France)

¹ Roche, Diagenode, GeneTiCA, UD-GenoMed Kft., Active Motif, Biotech Europe, Life Technologies, Kvalitex, FranceLab, Bio-Science Kft., Biocenter Kft., Izinta Kft., LarkBio Kft., TS Labor Kft., Sigma Aldrich.

Petra Hajkova (Imperial College London, U.K.)
Frank Holstege (University Medical Center Utrecht, The Netherlands)
Brian McStay (National University of Ireland, Galway, Ireland)
Ana Pombo (Imperial College London, United Kingdom)
Claire Rougeulle (Université Paris Diderot; Sorbonne Paris Cité; Paris, France)
Rickard Sandberg (Ludwig Institute for Cancer Research and Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden)
Pier Lorenzo Puri (Sandford Burham Medical Research Institute, USA)
Robert Schneider (Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Strasbourg, France)
Dirk Schubeler (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland)
Erica D. Watson (University of Cambridge, United Kingdom)

A konferencia honlapja:

<http://danube-epigenetics.weebly.com/>

***Arányi Tamás és Bálint Bálint László
szervezők nevében***

***Petrucz Anita Brigitta
DEBRECENI EGYETEM ÁOK
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium
<http://genomics.med.unideb.hu/>***





Paris 2014 hosted by SFBBM
30 August – 4 September

**„SOUS LE CIEL DE PARIS”
FEBS-EMBO 2014 KONFERENCIA:
KÖZÖS ÉVFORDULÓK ÜNNEPLÉSE**

Az MBKE „anyaszervezete”, a FEBS idén ünnepelte 50 éves születésnapját. Az 1964-es alapító tagok sorában már ott szerepeltünk (akkor Magyar Biokémiai Társaság néven). Azóta hagyománnyá váltak a FEBS éves nagy konferenciái, mint a nemzetközi biokémiai és molekuláris sejtbiológiai kutatások kiemelkedő seregszemléi. Az idei jubileum megünneplésének külön méltó keretet adott, hogy a Párizsban, 2014. augusztus 30. – szeptember 4. között megvalósuló konferenciát a FEBS együtt szervezte az EMBO-val, az európai szintén más jelentős molekuláris biológiai intézményi szereplőjével, amely szintén idén lett 50 éves. A szervező házigazda, a Francia Biokémiai és Molekuláris Biológiai Társaság (SFBBM) pedig fennállásának kerek 100. évfordulóját ünnepelte a konferencián.

Egységben az erő – és valóban, az együtt szervezett konferencia sziporkázó sokszínűsége példaként szolgálhat a következő évekre is. A két nyitó előadásban, melyeket Catherine Dulac és Svante Pääbo tartottak, kiválóan felépített összefoglalókat hallhattunk a neuronális hálózatok molekuláris felépítéséről, valamint az emberi evolúció lépéseiről és neandervölgyi genomikai örökségünkről. A konferencia további napjai délelőttöként 9-11 h között párhuzamos szekciókat kínáltak (összesen 33 szekcióban), délután pedig plenáris szekciókat és előadásokat. A párhuzamos szekciók lefedték a kurrens „forró” területeket, és a meghívott előadók mellett a beküldött absztraktokból is kiválasztásra kerültek rövid szóbeli előadások. A plenáris szekciókban a díjazott nagyelőadások mellett helyet kapott négy kiemelt szekció is (az epigenetika, a rendszerbiológia, az

immunológia és a sejtbiológiai plaszticitás témaköreiben). A poszter szekciókra sok figyelem jutott: egyrészt a programban igyekeztek kellő időt biztosítani a rengeteg poszter megtekintésére, másrészt minden nap poszter-díjak kiosztására került sor (a poszterek értékelését szakértői zsűrik végezték, a díjakat a FEBS és az EMBO folyóiratai, valamint a Nucleic Acids Research folyóirat biztosította). A díjazott poszterek az egyes folyóiratok standjain kiemelt helyre kerültek, és ezekből a végső győztesek is kiválasztásra kerültek. A konferenciát hagyományos módon megelőzte a Young Scientist's Forum, a fiatal kutatók bemutatkozásának szentelt alkalom – idén is a FEBS szinte minden tagállamából nyertek ösztöndíjat a fiatalok erre a fórumra.

A FEBS-EMBO konferencia sok figyelmet fordított oktatási kérdésekre: a FEBS Education Committee két workshop-ot is szervezett. További szekciók foglalkoztak a nők szerepével a tudományban és a tudománynak a társadalomban betöltött lényegi jelentőségével és lehetőségeivel.

A nyitó fogadás, a FEBS 50. évfordulóját ünneplő gálavacsora és a konferencia bankett rendezvényei méltó alkalmakat szolgáltattak baráti beszélgetésekre, meglévő együttműködések erősítésére és újak szervezésére. Mindehhez Párizs kék ege (néha ugyan felhőkkel és esővel tarkítva) nyújtott páratlan díszletet, a sanzonok, katedrálisok, kávéházak egyvelegében, a magyar költők, írók, festők emlékeivel társítva, Ady Bakonyában.

Vértessy G. Beáta
MTA TTK és BME VBK

Molekuláris Élettudományi Konferencia 2015

2015. március 27-29. | Hotel Eger-Park



Tisztelt Kollégánk!

A [Magyar Biokémiai Egyesület \(MBKE\)](#), a [Magyar Genetikusok Egyesülete \(MAGE\)](#) és a [Sejt- és Fejlődésbiológiai Szakosztály](#), a 2013-as sikerre való tekintettel második ízben tartja meg közös konferenciáját (2015. március 27-29., Eger),

„Hungarian Molecular Life Sciences 2015 (Molekuláris Élettudományi Konferencia 2015)”

címmel.

A három nagy múltú, rokon szakterületek kutatóit összefogó egyesület 2013-ban hozta létre a legnagyobb hazai élettudományi konferenciát, melyet elhatározásunk szerint két évente, így 2015-ben is megszervezünk. Felsőoktatási intézményekből, Magyar Tudományos Akadémia, valamint a minisztériumok által fenntartott kutatóintézetekből, mintegy négyszáz kutató részvételére számítunk. Az egyesített konferencia mindhárom egyesület hagyományait folytatni kívánja, így a rendezvény a XI. Magyar Genetikai Kongresszus, a XVIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, valamint a Magyar Biokémiai egyesület 2015-ös évi vándorgyűlése is lesz egyben. A 2013-as első Magyarországi Molekuláris Biológiai Konferencia sikere bizonyította, hogy a közös szervezés a hazai élettudományi konferenciák történetében új minőséget hozhat létre. A 2015-ös konferencia célja fórumot teremteni a **klasszikus és molekuláris biokémia és sejtbiológia a szerkezetbiológia, a fejlődésbiológia, a klasszikus és molekuláris genetika, az emberi betegségek molekuláris biológiája, a rendszerbiológia, a szintetikus biológia, a genomika és a bioinformatika** területén dolgozó kutatók számára.

Alkotó szellemű, a szakmai megbeszéléseket központba állító, baráti hangulatú, de egyben elegáns kongresszust kívánunk szervezni, ahol régi ismerősök találkozhatnak, és új munkakapcsolatok születhetnek. A konferenciánkat a minden igényt kielégítő egri, Hotel Eger-Park konferenciaközpontban rendezzük meg. A helyszínt úgy választottuk, hogy az előadó termek és a poszter kiállítások, valamint a cégek kiállításai az éttermekkel és a szállodai szobákkal egy épületegyüttesben helyezkedjenek el, ahol bőségesen vannak szakmai megbeszélésre alkalmas közösségi terek, valamint kikapcsolódást szolgáló létesítmények is.

FELHÍVÁS

A Biokémia folyóirat szerkesztőbizottsága fontosnak tartja, hogy az MBKE tagjai értesüljenek tagtársaik kiemelkedő tudományos közleményeiről. Ezért a korábbi években közölt publikációs listák folytatásaként kérjük, hogy küldjék be:

a 2014-ban a FEBS Letters, FEBS Journal, TIBS, IUBMB Life, FASEB J. újságokban megjelent, valamint IF > 5 (a 2012-es SCI szerinti) cikkek listáját. A listát a Biokémia márciusi számában tesszük közzé.

Beküldési határidő:

2015. február 15.

A listát Szűcs Mária főszerkesztőnek kérjük beküldeni a szucs.maria@brc.mta.hu e-mail címre.

PÁLYÁZATI FELHÍVÁS!

A Magyar Biokémiai Egyesülettel együttműködve

a BIO-SCIENCE Kft. pályázatot hirdet

a 2014. évben, 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 a 2015. évi Molekuláris Élettudományi Konferencián (Hungarian Molecular Life Sciences Conference (Eger, 2015. március 27-29.)) való részvétel költségeinek (regisztráció+szállásköltség) fedezésére.

A nyertes pályázó eredményeit szóbeli előadásban ismerteti a 2015. évi Molekuláris Élettudományi Konferencián.

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:

2015. január 25.

**Az eredményről a pályázókat 2015. február 11-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.

Kedves Tagtársak,

Ismét felhívjuk a figyelmet a **MBKE honlap Fórumára** (www.mbkegy.hu), amelyen lényegesen egyszerűbb lett az interaktív véleménynyilvánítás. Az OTKA-val kapcsolatos vélemények is megjelentek rajta az Élet és Irodalomból.

Üdvözlettel,

Maksay Gábor
Fórum rovatfelelős

ALAPÍTVÁNY A TUDOMÁNYOS SZEMÉSZETÉRT

Az alapítvány célja a szemészeti biokémia illetve retinakutatás terén kifejtett tudományos tevékenység segítése, további eredmények elérésének ösztönzése továbbá a tudományos eredményt elért orvosok és kutatók elismerése pénzjutalommal és emléklappal.

Az alapítvány nyitott, a csatlakozók vagyoni hozzájárulásukkal, támogathatják az alapítványt.

A díjra pályázni lehet biokémiai vagy szemészeti élettani kutatómunka, illetve retinakutatás alapján készített, az elmúlt évben megjelent magyar vagy idegen nyelven publikált tudományos dolgozattal. A pályázó a pályázati határidő lejártakor nem lehet több 35 évesnél.

A beérkező pályázatokat a Kuratórium elbírálja és 2015-ben 2 díjat oszt ki: **szemészeti (retinakutatás) és biokémiai témában**. A díjakat és az okleveleket a Magyar Szemorvostársaság Kongresszusán adjuk át.

**A pályázatok beadási határideje 2015. április 30,
Prof. Dr. Janáky Márta, SZTE ÁOK Szemészeti Klinika,
6720 Szeged, Korányi fasor 10-11 címre.**

*Prof. Dr. Janáky Márta
az Alapítvány a Tudományos Szemészetért
Kuratórium elnöke*



Alakzat repülés



Vörösgém



Bütykös hattyú

TCs

Bütykös hattyú



Gyilkos-tó



Nádirigó



Ne légy áldozat



Széncinege II.



Tengelic



Prof. Dr. Tóth Csaba 1964-ben végzett a Szegedi Orvostudományi Egyetemen. Sebészetből és urológiából szerzett szakorvosi képesítést. 1980-ban lett kandidátus (PhD) és megalapította Szentesen az urológiai osztályt. 1984-ben hazánkban elsőként megvalósította az endoscopos vesesebészetet. Ezt az új módszert meghívásra számos külföldi - európai és Európán kívüli - országban is terjesztette. 1991-től az orvostudomány (MTA) doktora. 1995-től 2006-ig a Debreceni Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikájának igazgató egyetemi tanára, majd 2011-ig egyetemi tanárként a klinika Vesekő Központjának igazgatója. 2011-től Professor Emeritus. Többek között megkapta a „Magyar Köztársasági Érdemrend Tisztikeresztje” kitüntetést, 2014-ben „Hatvani István díjat” kapott.

Gyermekkorától fotózik. Hét szakmai könyvét saját felvételeivel tette szemléletesebbé. Öt - nem szakmai - fotóalbuma jelent meg, 39 városban volt önálló, 17 helyen pedig csoportos kiállítása. Országos fotópályázatokon rangos helyezéseket nyert. Több folyóiratot, naptárakat illusztrálnak fotói. Képeivel több külföldi kiállításon is szerepelt. Fotográfiai tevékenységéért „Holló László-díjjal” tüntették ki. További fotók a következő honlapon tekinthetők meg:

<http://www.proftothcsaba.org/>