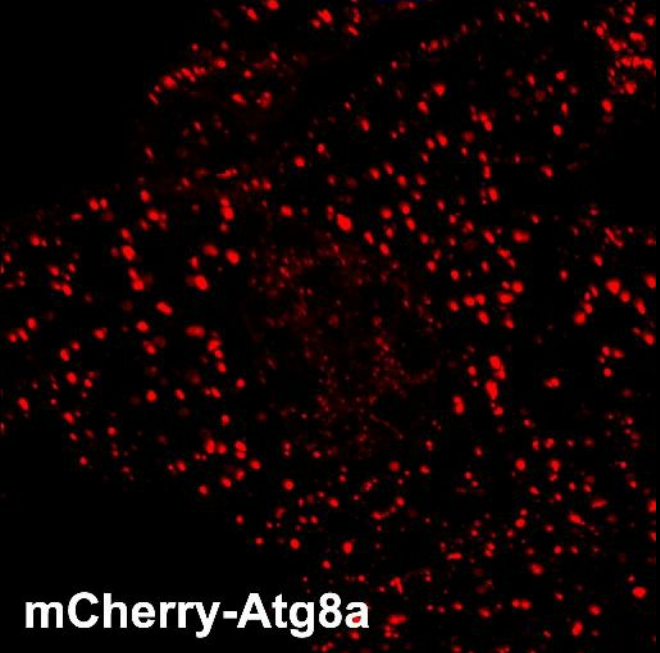
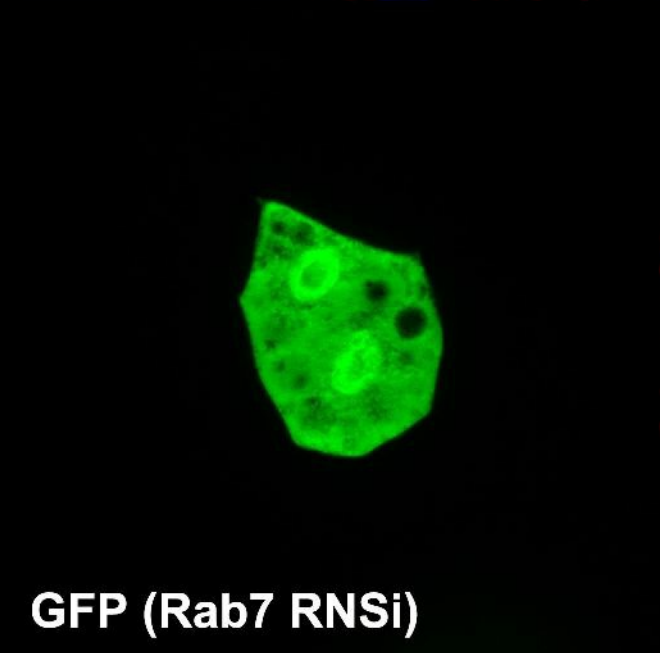
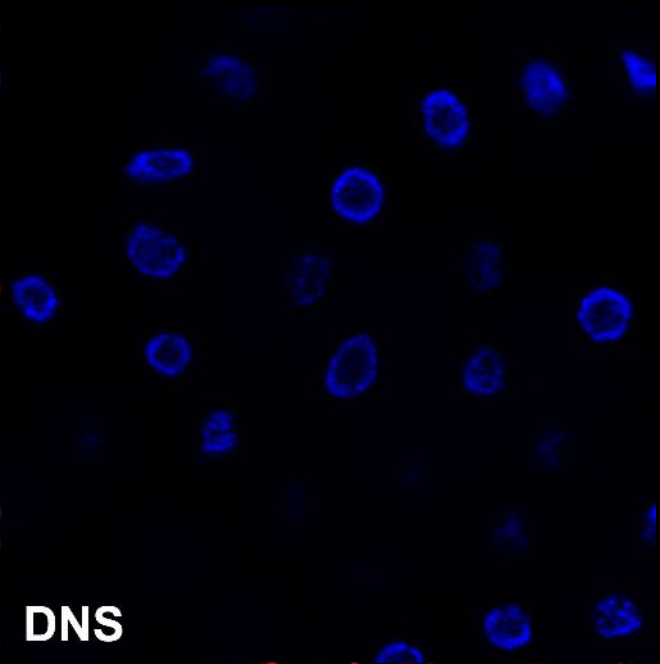


BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XL. évfolyam 4. szám

2016. 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

info@remekdesign.hu

XL. ÉVFOLYAM 4. SZÁM

2016. december

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép:

*A Rab7 kis GTPáz szükséges a pirossal jelölt autofág vezikulák fúziójához
(Lőrincz Péter felvétele, lásd Takáts Szabolcs és Juhász Gábor írását, 30. oldal)*

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak 4.
Wollemann Mária: Emlékezés az elmúlt időkre 5.

FIATAL KUTATÓK MŰHELYEI

Szűcs Diána és Pankotai Tibor: A DNS károsodások által kiváltott
sejtválaszok tanulmányozása emlős sejtekben és in vivo Drosophila
modellrendszerben 17.

REVIEW

Takáts Szabolcs és Juhász Gábor: Az autofágia élettani vizsgálatáért
odaítélt Nobel-díj 30.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY

Scheer Ildikó, Róna Gergely, Vértessy G. Beáta: A DNS-beli uracil
kvantifikálása egy érzékeny jelölő módszerrel 40.

VISSZATEKINTÉS AZ ELMÚLT 50 ÉV KIEMELKEDŐ CIKKEIRE

Patthy László: Moduláris fehérje evolúció és exon-shuffling 52.

KONFERENCIA BESZÁMOLÓK

Az MBKE 2016. évi vándorgyűlése, Szeged 63.

2nd Danube Scientific Conference on Epigenetics, Budapest 66.

KONFERENCIA HIRDETÉSEK

Hungarian Molecular Life Sciences, 2017- Molekuláris Élettudományi
Konferencia, 2017 69.

FEBS konferencia 2017 70.

FELHIVÁSOK

A 2016. évi kiemelkedő cikkek listájának beküldése 72.

Alapítvány a Tudományos Szemészetért pályázat 73.

ÁLLÁSHIRDETÉS 74.

TUDOMÁNY ÉS MŰVÉSZET

Gráf László: A nagy évfolyam 75.



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 és Dr. Buday László
Az engedély száma III/SZI/397/1977
HU ISSN 2060 8152 (Online) | HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI 2016. JÚNIUS 1. ÉS 2016. NOVEMBER 30. KÖZÖTT

Kiemelkedő hatású oktatási, nevelési és gyógypedagógiai munkájáért, valamint a pedagógiai gyakorlatot segítő kiemelkedő tudományos tevékenysége elismeréseként **Apáczai Csere János-díjat** vehetett át **Erdődi Ferenc** (a DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet).

Pankotai Tibort (SZTE TTK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék) a Magyar Genetikusok Egyesülete **Győrffy Barna díjjal** jutalmazta. Az évente kiadott díjjal kiemelkedő tudományos teljesítményt nyújtó, a szakmai közéletben aktív, a kutatómunka iránt elkötelezett fiatalokat kívánnak példaképpül állítani.

Az **Academia Europaea** tagja lett **Papp Balázs** és **Pál Csaba** (MTA SZBK Biokémiai Intézet), valamint **Sperlágh Beáta** (MTA KOKI), Velük együtt az intézménynek 1988-as megalapítása óta 118 magyarországi tudós lett a tagja. **Papp Balázs** a **Straub-plakett** 2016. évi díjazottja is.

Sümegei Balázs (PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) a **Magyar Érdemrend középkeresztje a csillaggal** elismerést kapta, valamint a Magyar Tudomány Ünnepe alkalmából **Szentágothai-díjjal** tüntették ki.

Szöllősi Gergely, (ELTE TTK Biológia Fizika Tanszék) az Európai Kutatási Tanács (ERC) fiatal kutatóknak szóló **Starting Grant** pályázati támogatást nyert olyan új módszerek kidolgozására, amelyek az evolúciós régmúltat hivatottak rekonstruálni genetikai szekvenciák alapján.

Az MBKE 2016. évi vándorgyűlésén **Wollemann Mária** (MTA SZBK, Biokémiai Intézet) **Tankó Béla életmű díjat**, **Vértessy G. Beáta** (MTA TTK Enzimológiai Intézet és BME VBK) **Tankó Béla díjat** vehetett át eddigi munkássága elismeréseként.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

EMLÉKEZÉS AZ ELMÚLT IDŐKRE

Wollemann Mária

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Szeged



Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani az MBKE elnökségének, hogy engem méltónak tartott erre a megtisztelő díjra azért is, mert ismer-tem Tankó Béla professzort, elsősorban a MÉT, majd az MBKE konferenciákról és nagyra tartot-tam a hexóz foszfátok közül a fruktóz-1-foszfát felfedezőjeként, melyet róla Tankó-Robinson ész-ternek neveztek el. Közismert szerénységéről és a professzorok akkori szegénységéről szeretnék itt Feuer György, néhai volt férjem Scientific Report című könyvéből idézni, melyet a Toronto Sigma Editor adott ki 1998-ban: „Tankó Béla - a debreceni egyetem nemzetközileg ismert biokémia professzora, akivel egy időben, ugyanab-ban az intézetben dolgoztam - megjegyezte, hogy az esőkabátom elég jól fest és megkérdezte, hogy kölcsönadnám-e neki, mert fontos tárgyalása lesz az oktatási miniszterrel és szeretne jól öltözött benyomást kelteni. Boldogan megtettem neki ezt a szívességet, de nem emlékszem, hogy az esőkabát sikerre vitte-e a tárgyalásait.”

1923. július 6-án születtem Budapesten a Városmajori Szanatóriumban, ahol most a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Szív- és Érsebészeti Klinikája van. Öt éves koromig Gácson, a Forgách grófok volt intézőjének lakásában nevelkedtem, ahol egy nagy park volt, mivel édesapám az ottani posztógyárban dolgozott. Szüleim egy német nőrszre bízták nevelésemet, így előbb tanultam meg németül, mint magyarul, amire csak később, hat éves koromban került sor az első elemiben, amit Baján végeztem, mert szüleim odaköltöztek, ahol új munkahelyet talált apám az ottani posztógyárban. Ám ez sem tartott sokáig, mert két év után Bukarestbe költöztünk, ahol egy német birodalmi iskolába jártam két évig, és német mellett franciául és románul is kellett tanulni. Miután szüleim elváltak, édesanyámmal Budapestre költöztünk, ahol középiskolába az

akkor újonnan alakult Modernnyelvi Középfokú Leányiskolába jártam, az Isteni Megváltó Leányai Zárdájában eleinte mint bennlakó növendék (mivel édesanyám közben gyógyszerészi diplomát szerzett a Szegedi Tudomány Egyetemen), majd mint félbennlakó és végül mint bejáró tanultam az ottani gimnáziumban. A nővérek ebben a rendben a világ több országából származtak, és így az osztályunkban a magyar nyelv, történelem és földrajzon kívül minden más tárgyat németül kellett tanulni, ezen kívül franciát is tanítottak, és az internátusban amerikai nővérek is voltak. Itt szigorú napirend volt, még az óráközi szünetekben sem volt szabad magyarul beszélni, ezért rossz pont járt, és aki több rossz pontot gyűjtött össze, elvesztette látogatóját. Ezt úgy játszottuk ki hárman barátnők, hogy „triumvir”-ek helyett „triumvirgó”-kat alakítottunk ki és latinul beszéltünk egymás közt, mivel ez akkor még kötelező nyelv is volt, és nem mindegyik apáca értette. A „triumvirgó”-k egy szegedi egyetemi professzor lányából és egy gyulai tudószanatórium igazgatójának lányából, valamint jómagamból állt és a barátság folytatódott a szegedi egyetemen is. Mindezt azonban azért írtam le, hogy igazoljam, mennyire fontos a fiatal korban a nyelvtanulás, amikor még játszva, könnyen, jó kiejtéssel lehet tanulni, aminek később sok hasznát vettem és ezért utólag is nagyon hálás vagyok szüleimnek.

1941-ben jelesen érettségiztem, de a budapesti Pázmány Péter Egyetem Orvosi Karára nem vettek fel. Ezek után megkértem iskolai barátnőmet, akinek apja a Szegedi Egyetem orvoskarán sebész professzor volt, hogy támogassa ottani felvételemet, ami persze egyből sikerült. Szegeden egy más világ fogadott. Az egyetemen meglátszott, hogy a rektor Szent-Györgyi Albert (1. ábra) volt és a szabadság és humanizmus szelleme fogadott. Ha nem is mindenki állt a pártján, a diákok egy része rajongott érte. Nekünk az első évfolyamon általános és szerves kémiát adott elő. Az írásbeli kollokviumokon szabad volt könyvet használni, mert a kérdések mindenkitől további gondolkodást kívántak meg, ami nem volt benne a tankönyvekben. Egy kérdésre ma is emlékszem: „Mit csinál, ha sósavval leönti a ruháját?”. Aki lúgot akart önteni rá, egyből elbukott, a helyes válasz szódabikarbonát oldat volt. A képleteket nem kellett fejből tudni, csak a

vegyületet alkotó elemeket és azok vegyértékét. A szájhagyomány szerint egyszer egy hallgató felírta a morfin képletét, mire Szent-Györgyi azt mondta: „Tőlem egy elefántot is felrajzolhatott volna”.



1. ábra. Szent-Györgyi Albert professzor a Szegedi Egyetem Orvosi Vegytani Intézet laboratóriumában.

Ezek a szép napok azonban sajnos nem tartottak soká. A Szent-Györgyi által alapított Szegedi Egyetemi Ifjúság (SZEI) és a Turul Szövetség jobboldali tagjai összefogtak és 1942 tavaszán már napirenden volt a szerb és zsidó hallgatók megverése és kitiltása egyes előadásokról. A Szent-Györgyi által kezdeményezett nagyon sikeres Dóm-téri egyetemi hallgatói Hamlet előadás főszereplői közül a rendező (Horváth István) és Gertrúd királynő (Tóth Kata) öngyilkosok lettek, mert nem házasodhattak össze az akkor életbelépő zsidótörvények miatt. Laertes és barátja pedig szintén öngyilkosok lettek, mert nem fogadták el őket „másságuk” miatt. Ezért is támadták Szent-Györgyit, aki végül is a balul sikerült béke tárgyalásai után, politikai okokból illegalitásba vonult.

1944 őszén már nem tudtam Szegedre utazni, mert a várost elfoglalták a szovjet csapatok. Így Pesten maradtam és beiratkoztam a pesti egyetem orvosi karán a negyedik évfolyamra. Decemberben azonban minden hallgató SAS behívót kapott, mert az egyetemet Halleba, Németországba telepítették át. Néhányan közülünk azonban, mivel a János Kórházba jártunk belgyógyászati gyakorlatra, az egyik főorvostól igazolást kaptunk, hogy betegek vagyunk, és így én is hyperthyreosisal a Hárshegyi Idegszanatóriumba feküdtem be. Rajtam kívül még két orvostanhallgató és egy szegedi professzor feküdt ott. December 24-én délben még hazalátogattam a Kosztolányi térre, de este már csak a Széll Kálmán térig vitt a villamos. Ott a német katonák nem engedtek senkit tovább, de mivel jól beszéltem németül, megmagyaráztam, hogy nem messze lakom és engedjenek haza szenteste. Ezek után elengedtek és ettől kezdve a senki földjén mentem a Húvösvölgyi úton egészen a szanatóriumig, ahol nagy ünnepléssel fogadtak és miután a velem hozott kaját és vermutot mind megettük és megittuk, aludni tértünk. Reggel arra ébredtem, hogy a többiek közölték, az éjjel bejöttek a szovjet csapatok és át kell költöznünk a Lipótmezei Ideg- és Elmeógyógyintézetbe, mert a szanatóriumban a szovjet hadsereg csapatai hadiszállást rendeztek be.

A lipótmezei intézetben egy fogadószobát nyitottak ki nekünk, ahol a falak mentén kanapék voltak és így én és egy nővér, aki a deportálás elől menekült, valamint a professzor és a két orvostanhallgató került egy szobába. Az öltözködéssel nem volt probléma, mert fűtés nem volt, élelem is mindössze napi egy tányér marharépa leves és öt deka kenyér volt. Én voltam a kaja és cigi beszerzője a férfiaknak, mivel kevés szlovák nyelvtudásommal az orosz katonáktól sikerült ennivalót szerezni. Február 11-én a német csapatok kitörtek az ostromlott várból és a Húvösvölgyi úton keresztül próbáltak menekülni, de itt tűzpárbajba keveredtek a szovjet csapatokkal. Én éppen az ablak előtti, spanyolfallal elkerített lavórban ültem, mikor egy repesz szilánk betörte az ablakot. A spanyolfal ledőlt és hullottak körülöttem az üvegcserepek, de én sértetlenül úsztam meg a kitörést.

Február közepe után vissza akartunk menni Szegedre, mert úgy gondoltuk, hogy ott már működik az egyetem. Ez csak Pestről volt lehetséges, így a legközelebbi budafoki pontonhídon átkeltünk a Dunán. A pályaudvaron a professzor rábeszélte az állomásfőnököt, hogy engedjen fel minket mint kísérőket egy orosházi gyermekmentő vonatra, mivel Szegedre nem indult vonat. Estére értünk csak oda, amikor már nem indult tovább vonat, csak reggel. Ekkor a professzornak eszébe jutott, hogy egy tanítványának apja Orosházán tisztiorvos, kérdezősködés után sikerült is megtalálni. Négyünket nagy örömmel fogadtak és tiszteletünkre pompás marhapörköltet főztek, bort is adtak hozzá. A sok éhezés után a nagy kaja megártott és éjjel rosszul lettem, amikor kimentem az udvari mellékhelységbe, a professzor is már ott sétált a kút körül.

Másnap Szegedre érve megállapítottuk, hogy az intézet alkohol készletéből még maradt öt liter, amiből a professzor ánizs eszenciával nagyszerű itókát gyártott. Erre a szomszéd intézetből is meghívta az ottani professzort, aki akkor ott is lakott és nagy murit csaptunk hazatérésünk örömére. A vidám „agglegény” élet azonban nem tartott sokáig, mert kiütéses tífuszjárvány ütötte fel a fejét és egy orvostanhallgatóval együtt a Csongrádi sugárúti vámháznál kellett ellenőrizni három hétig a be- és kijáró férfiakat és nőket, hogy van-e rajtuk tetű.

A járvány lecsengésével újra elkezdődtek az előadások és szeptembertől ismét a Budapesti Pázmány Péter Tudományegyetem hallgatója, majd szigorló orvosa lettem és 1947. január végén *summa cum laude* avattak orvosdoktorrá. Közben azonban a szegedi Gyógyszertani Intézetbeli demonstrátori kinevezésem után egy évvel az Anatómiai Intézetben lettem gyakornok, majd amikor Straub professzor Orvosi Vegytani (volt Szent-Györgyi intézet) intézetében megürült egy állás, ott helyezkedtem el. Itt ismerkedtem meg Feuer Györggyel, akinek később felesége lettem. Miután Szent-Györgyi 1948-ban véglegesen külföldre távozott, Straub professzort (2. ábra) nevezték ki a budapesti tanszékre. Vele együtt jöttünk fel mi is, és továbbra is izom biokémiával foglalkoztunk [1]).



2. ábra. Straub F. Brunó professzor.

1949-ben az Akadémia egy új biokémiai intézetet alapított, amire Szörényi Imre professzort hívták meg a Szovjetunióból. Férjemmel vonzónak találtuk a lehetőséget, hogy itt kizárólag kutatással foglalkozhattunk és a hagyományos izom biokémiai kutatások után ideg biokémiával kezdtünk el foglalkozni. Közben Szörényi professzor egy kijevei útja során megbetegedett és hosszabb ideig nem jött vissza. Hazaérkezése után kandidátusi témámnak az aktin izomfehérje aminosav végcsoportjainak meghatározását tűzte ki, ezt azonban orvosi és ideg biokémiai érdeklődésem miatt nem fogadtam el, és inkább más állás után néztem.

Sikerült az 1954-ben alakuló Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben elhelyezkedni Terian idegsebész professzor jóvoltából, akit meghívtak Moszkvából a magyar idegsebészeti intézet beindítására, és aki engem egy kutató laboratórium alapításával bízott meg. Így itt fejeztem be kandidátusi disszertációm, melynek címe: „Az acetilkolin keletkezése és szerepe a központi idegrendszerben” volt és 1956-ban védtem meg. Ebből született később a francia nyelven megjelent könyvem, melyet az Akadémiai Kiadó közösen a Masson et Cie Paris Kiadóval 1970-ben adott ki [2]. Ebben a könyvben nemcsak az acetilkolin anyagcseréjével foglalkoztam, hanem az akkor ismert összes

mediátorral és anyagcseréjével és azokra ható gátló és stimuláló anyagokkal, valamint drogok hatásmechanizmusával [3].

A következőkben nekiláttam az agytumороk biokémiai vizsgálatai című témához. A módszereket marhaagyon állítottam be, amihez a vágóhídról jeges edényben hoztam az agyakat és a Puskin utcai Biokémiai Intézetben ultracentrifugával mitokondrium frakciókat állítottam elő, mivel az Idegsebészeti Intézetben ilyen nem volt. A műtéti anyagon pedig a patológussal osztozkodtunk [4, 5]. Közben több külföldi intézetben is dolgoztam, ahol új módszereket tanultam meg: 1956-57-ben egy fél évet a berlini Humboldt Egyetem Farmakológiai Intézetében, 1963-64-ben egy évet a New York-i Montefiore Kórház Aneszteziológiai és Patológiai Osztályán, valamint a New York State Research Institute for Neurochemistry and Drug Addiction osztályon és 1966-ban egy fél évet a párizsi Boucicaut Kórház kutatólaboratóriumában. Párizsban részt vehettem a Pasteur Intézetben Jacques Monod által szervezett szemináriumokon is. Az Idegsebészeti Intézetben és külföldön töltött 15 évi munka összefoglalásából írtam meg és védtem meg akadémiai doktori disszertációm 1968-ban az agytumороk biokémiájáról, melyet 1974-ben „Biochemistry of Brain Tumours” címen az Akadémiai Kiadó és a MacMillan Press Ltd London, valamint a Park Press Baltimore USA és a moszkvai Mir Kiadó 1977-ben közösen adott ki [6]. Könyvemet még japánra is lefordították.

1968-ban meghívtak a Szegeden épülő MTA Biológiai Központ Biokémiai Intézet lipid részlegének vezetésére. Ennek feltétele volt, hogy adjunk be tématerveket és ezeket az MTA Tihanyi Biológiai Intézetben tárgyaltuk meg. Én két témát adtam be, az egyik a foszfolipidek analízise és szerepe a sejtmembránban, a másik az alfa- és béta-adrenerg receptorok vizsgálata a szívizomban. A lipid témát Straub főigazgató sugallatára kellett beadnom, a receptor téma a szívügyem volt, melyet később az idegrendszerre is ki akartam terjeszteni. Az összehívott leendő témavezetők demokratikusan szavaztak a témákról és nagy örömmre a receptor téma többséget kapott.

1971 júniusában Szegedre költöztem és a receptor munka megkezdődött. Előbb a katekolaminokat bontó enzimeket vizsgáltuk, mert az volt a hipotézisünk, hogy a transzmittereket bontó enzimek szubsztrátkötő helye hasonló lesz a receptor ligandkötő helyével, mivel mind a ketten ugyanazt a vegyületet kötik meg. Ez a feltételezés a megfelelő enzimek és receptorok aminosav szekvenciájának későbbi ismeretében nem bizonyult igaznak. Mi azonban ebből indulunk ki és a monoaminoxidáz és a katekol-O-metiltranszferáz, valamint a béta-adrenerg receptor tisztításának fogtunk neki, előbb szívizomból, majd mikor Straub professzor átadta a Biokémiai Intézet vezetését, patkány aggyal is elkezdtünk dolgozni, ami addig tiltott terület volt.

Straub professzor 1978-ban így mutatott be mint az Igazgató Tanács új tagját: „Wollemann Mária, aki arról nevezetes, hogy a rossz tulajdonságaimat és kritikáját mindig a szemembe mondja”. Milyen főnök volt a Prof és mit lehetett tőle tanulni? Munkabírása nem ismert határokat, mindenütt ott volt, a fiataloknak is kikérte a véleményét, öt óra után végigjárta az intézetet, hogy ki van még bent és mit dolgozik. Munkabeszámolókat és cikkvitákat tartott, de a közös teákon mindenről lehetett vele beszélni. Szelleme nagyon hiányzott, amikor elment

Mivel Lefkowitznak és munkatársainak közben sikerült a pulyka vörös vérsejtjeiből a béta-adrenerg receptor szerkezetét leírni, áttértünk az abban az időben kidolgozott radioligand kötési módszer segítségével az opiát receptorok vizsgálatára. Ehhez szükségünk volt egy magas specifikus aktivitású triciált ligandra, mely nagy affinitással kötődik az opiát receptorokhoz. Ilyen vegyület volt az opiát antagonistá naloxon, melyet Tóth Géza az intézet izotóp laboratóriumában állított elő számunkra. A tisztítást kecskebéka agyból végeztük, mely akkori kísérleteink szerint magas koncentrációban tartalmazta a kappá opiát receptort és ismert volt, hogy az erre ható agonisták nem okoznak addikciót [7, 8]. A tisztítási munkákban - a csoportban futó egyéb projektek mellett - Benyhe Sándor, Borsodi Anna, Simon József és Szűcs Mária játszott döntő szerepet (3.

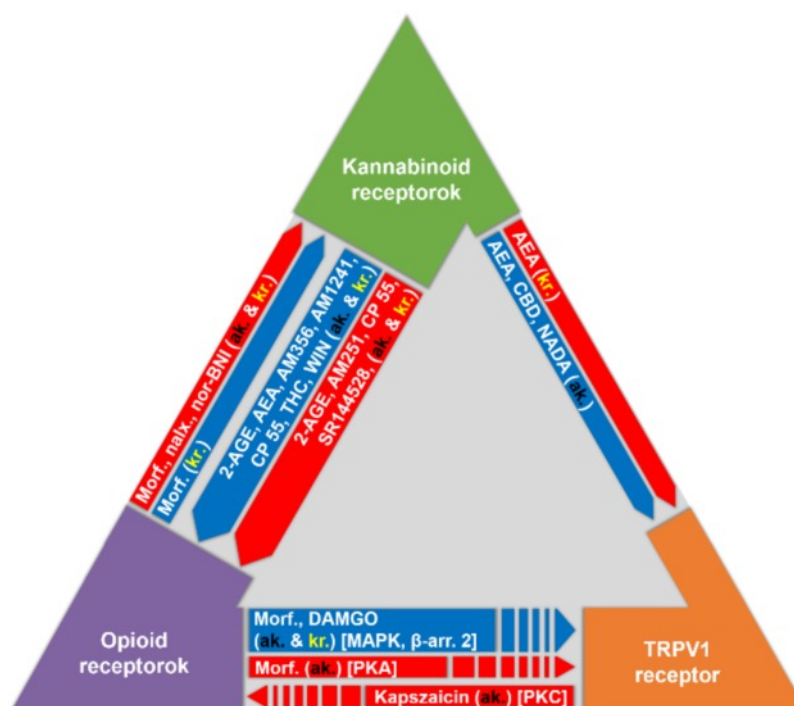
ábra). Az 5600-szorosra tisztított kappa opiát receptorból Maderspach Katalin monoklonális ellenanyagot állított elő [9], melynek segítségével a kappa opiát receptorokat sikerült kimutatni nemcsak patkány agyi idegsejteken, hanem oligodendroglia sejtekben is, mely eredményt a *Glia* című tudományos folyóirat a címlapon közölte [10].



3. ábra. Wollemann Mária 70. születésnapján a csoporttagok előadásai.

A kappa opiát receptor klónozási és szekvenálási tervét beadtuk egy OTKA pályázatban a nyolcvanas évek végén, ezt azonban elutasították. A receptor tisztítási munkáknak, melyeket kollaborációban végeztünk Medzihradszky Kálmán professzorral és munkatársaival (ELTE Szerves Kémiai Intézet) [8], csak az utóbbi felét díjazták akadémiai jutalommal, noha a pályázat közös volt, a mi csoportunk kimaradt belőle. Mikor ezért a Főosztályhoz fordultam, azt a választ kaptam, hogy a pályázatom elveszett. Ez azonban nem vette el a kedvünket, és az opiát kutatás azóta is folyik, noha az idők során más szereplőkkel. Én 1985-ben nyugdíjba mentem, de továbbra is az intézetben dolgozok és publikálok [11-14]. Sajnos a régi „aranycsapat” szétment, Simon József egy angliai tanulmányútról nem tért vissza, Maderspach Katalin először asszisztens nélkül maradt (mivel az ő szövettani laboratóriumának fenntartása került a legtöbb

pénzbe és nem nyert pályázatot), így ő is nyugdíjba ment, és a tudomány helyett a festészetet választotta, ahol több sikerélménye lett. Szűcs Mária napjainkban a Szeged Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében dolgozik Penke Botond professzor mellett, főleg Alzheimer kutatással foglalkoznak. Borsodi Anna és Benyhe Sándor mint témavezetők maradtak csak itt, majd tavaly Borsodi Anna is nyugdíjba ment. Benyhe Sándor igazgató helyettes és csoportvezető lett. Én az utóbbi években a csoportba jött fiatalokkal, részben külföldi kooperációban az endogén opioid peptid ligandok lebomlásának gátlását előidéző opiorphinnal [13] és az opioid, kannabisz és kapszaicin (TRPV1) rendszer kölcsönhatásával [14] foglalkozom.



4. ábra. A kannabinoid, kapszaicin (TRPV1) és opioid receptor "triumvir"-ek kölcsönhatásai. A piros nyilak gátlást, a kék nyilak stimuláló hatást, a megszakított nyilak a két receptor közötti indirekt hatást jelölik. A ligandokkal való akut (ak.) és krónikus (kr.) kezelést zárójelben van feltüntetve fekete és sárga színnel. 2-AGE: 2-arachidonoil-glicerol-éter; AEA: anandamid; AM251: kannabinoid-1 receptor inverz agonista/antagonista; AM356: metandamid (kannabinoid-1 receptor agonista); AM1241: kannabinoid-2 receptor agonista; CP55: CP55,940 (kannabinoid receptor agonista); DAMGO: [D-Ala²,N-MePhe⁴.Gly-ol]-enkefalin (mu opioid receptor agonista); MAPK: mitogén-aktivált protein kináz, morf: morfin (mu opioid receptor agonista); NADA: N-arachidonoil-dopamin (endokannabinoid); nalx: naloxon (nem szelektív opioid antagonist); nor-BNI: norbinaltorfimin (kappa opioid receptor antagonist); PKA: protein kináz A; PKC: protein kináz C; SR144528: kannabinoid-2 receptor inverz agonista/antagonista; THC: tetrahidro-kannabinol (kannabinoid receptor agonista); WIN: WIN55,212 (kannabinoid receptor agonista).

Tudományos publikációimnak száma 135, ebből 65 nyugdíjazásom után jelent meg, a kapott idézetek száma 1300 körüli. Kitüntetésem: Akadémia díj 1977, Munka Érdemrend arany fokozata 1983, Magyar Köztársaság Érdemrend tisztikeresztje (polgári fokozat) 1994, Magyar Köztársaság Érdemrend középkeresztje 2003, Straub-díj, Romhányi díj.

Irodalomjegyzék

- [1] Wollemann, M., Feuer, G., Straub, F.B. (1950) Suitability of actomyosin filaments for a model of muscles. *Acta Physiolog Hung*, **1**: 34-43.
- [2] Wollemann, M. (1970) Métabolisme des Mediateurs Chimique du Systeme Nerveux: A l'État Physiologique et Pathologique. (Ed. Akadémiai Kiadó, Budapest, Masson et Cie, Paris).
- [3] Wollemann, M (1963) In vitro oxidation of DPNH by free radicals of chlorpromazine. *Biochemical Pharmacol*, **12**: 757-759.
- [4] Wollemann, M., Zoltán, L. (1962) Cholinesterase activity of cerebral tumors and tumorous cysts. *Arch of Neurolog*, **6**: 161-167.
- [5] Wollemann, M., Dévényi, T. (1963) The gamma-aminobutyric acid content and glutamate decarboxylase activity of brain tumours. *J Neurochem*, **10**: 83-88.
- [6] Wollemann, M. (1974) Biochemistry of Brain Tumours. (Ed. Akadémiai Kiadó, MacMillan Press Ltd. London, Park Press Baltimore. Biokhimija Opuholej. Izdatyelsztvo Mir Moszkva 1977).
- [7] Simon, J. Benyhe, S., Borsodi, A., Szűcs, M., Wollemann, M. (1985) Separation of kappa opioid receptors subtype from frog brain. *FEBS Lett*, **183**: 395-397.
- [8] Simon, J, Benyhe, S., Hepp, J., Varga, E., Medzihradszky, K. Borsodi, A., Wollemann M. (1990) Method for isolation of kappa-opioid binding sites by dynorphin affinity chromatography. *J Neurosci Res*, **25**: 549-555.
- [9] Maderspach, K, Németh, K., Simon J., Benyhe S., Szűcs, M., Wollemann M.(1991)A monoclonal antibody recognizing kappa- but not mu- or delta-opioid receptors. *J Neurochem*, **56**: 1897-1904.

- [10] Knapp, P.E., Maderspach, K., Hauser, K.F. (1998) Endogenous opioid system in developing normal and jimpy oligodendrocytes: mu and kappa opioid receptors mediate differential mitogenic and growth responses. *Glia*, **22(2)**: 189-201.
- [11] Wollemann, M., Benyhe, S., Simon, J.(1993) The kappa opiate receptor: evidence for the different subtypes. *Life Sci*, **52**: 599-611.
- [12] Wollemann, M., Benyhe, S. (2004) Non-opioid actions of opioid peptides. *Life Sci*, **75**: 257-270.
- [13] Tóth, F., Tóth G., Benyhe, S., Rougeot, C., Wollemann, M. (2012) Opiorphin highly improves the specific binding of MERF and MEGY to rat brain opioid receptors. *Reg Peptides*, **178**: 71-75.
- [14] Zádor, F., Wollemann, M. (2015) Receptome: Interactions between three pain-related receptors or the „Triumvirate” of cannabinoid, opioid and TRPV1 receptors. *Pharmacol Res*, **102**: 254-263.

A DNS KÁROSODÁSOK ÁLTAL KIVÁLTOTT SEJTVÁLASZOK TANULMÁNYOZÁSA EMLŐS SEJTEKBEIN ÉS IN VIVO DROSOPHILA MODELLRENDSZERBEIN

Szűcs Diána és Pankotai Tibor

*SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék,
Genom Integritás és DNS Hibajavítás Kutatócsoport*

A DNS károsodások által kiváltott sejtválaszok

Az eukarióta élőlények sejtmagi DNS állománya számos kondenzációs lépésen keresztül kromoszómákba szerveződik. A kromatin szerkezet felépítésében a hiszton fehérjék (H1, H2A, H2B, H3, H4) esszenciális szerepet játszanak. A H2A-H2B, H3-H4 hiszton heterodimerek két-két kópiája alkotja az oktamer szerkezetet, melyre a DNS 147 bázispár hosszúságú szakaszon tekeredik fel. Így jön létre a nukleoszóma, melynek szerkezetét a H1 hisztonok kötődése stabilizálja. A nukleoszóma alakítja ki az ún. „gyöngyfüzér struktúrát”, mely a kromoszómát alkotó DNS molekula eredeti hosszát egyharmadára csökkenti, majd további lépések során a még tömörebb „szolenoid” szerkezet jön létre. A legkondenzáltabb kromoszóma szerkezet a metafázisban figyelhető meg, mely a sejtek osztódása során már fénymikroszkóp alatt is látható.

Az eukarióta sejtekben a DNS-t templátként használó folyamatok lejátszódásához (pl. transzkripció, replikáció) szükséges a kondenzált kromatin szerkezet fellazulása. Ezen struktúra dinamikus változásainak szabályozásában kulcsfontosságúak a hiszton fehérjék oktamerből kinyúló, N-terminális farki részén található aminosavainak poszt-transzlációs módosításai (PTM). Ezek a PTM-ek számos egyedi mintázatot hozhatnak létre a hisztonokon, mivel ugyanazon az aminosav oldalláncon több típusú módosítás is létrejöhet (1. táblázat). Feltételezések szerint a hiszton fehérjéken megfigyelhető PTM mintázatok egyedi információ tartalommal rendelkeznek, melyet hiszton kód hipotézisnek nevezünk. Az egyes PTM-ek egy dinamikusan változó rendszert alkotnak, melyek kialakításáért és eltávolításáért különböző komplexek felelősek

(1. táblázat). A PTM mintázatok kialakulása hozzájárul a transzkripció, valamint a replikáció aktivációjához és lejátszódásához is, továbbá szabályozza a környezeti stresszhatásokra bekövetkező gyors és dinamikus kromatin szerkezeti változásokat is. Ennek legjobb példája, hogy a károsodott DNS környezetében a kromatin szerkezet fellazul, így lehetővé válik a hibajavító fehérjék kötődése a károsodott DNS régióhoz.

1. táblázat. A hisztonok aminosav oldalláncain létrejövő poszt-transzlációs módosítások és az azokat létrehozó vagy eltávolító kromatin módosító komplexek bemutatása.

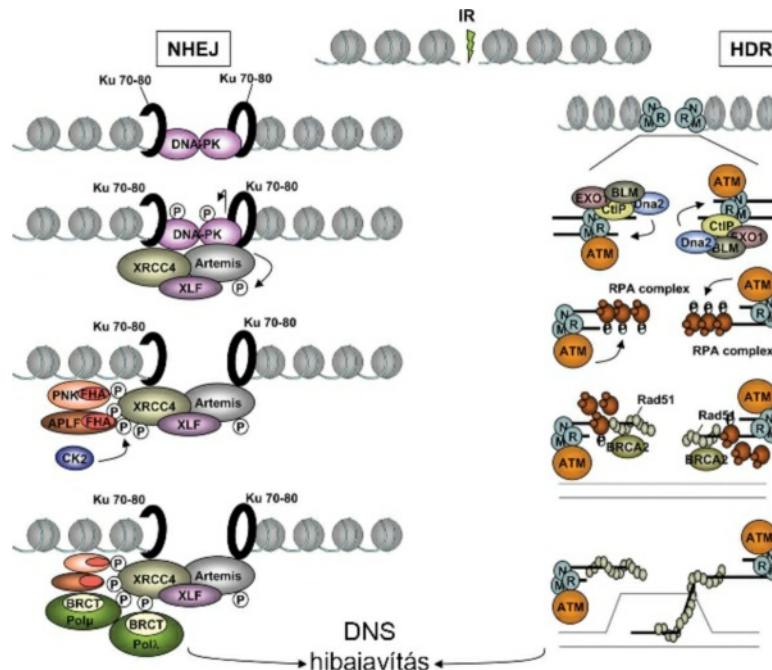
Aminosav	Módosítás típus	Módosítást létrehozó enzim	Módosítást eltávolító enzim
Lizin	acetiláció	Hiszton acetiltransferáz	Hiszton deacetiláz
	metiláció	Hiszton metiltransferáz	Hiszton demetiláz
	ubiquitiláció	E3 ubiquitin ligáz	Deubiquitináz
	riboziláció	ADP-ribóz polimeráz	ADP-ribóz hidroláz
Szerin	foszforiláció	Kináz	Foszfatáz
Threonin	foszforiláció	Kináz	Foszfatáz
Arginin	metiláció	Hiszton metiltransferáz	Hiszton demetiláz

Az endogén- és exogén forrásból származó DNS károsító ágensek változást idéznek elő a DNS szerkezetében, így veszélyeztetik a genom stabilitását [1, 2]. A különböző DNS sérülések eltérő hibajavító útvonalak aktiválódását eredményezik: replikációs hibák – Mismatch hibajavítás; oxidáció, alkiláció – Bázis-kivágó hibajavítás; timin-dimerek – Nukleotid-kivágó hibajavítás, valamint a DNS mindkét szálának eltörésekor aktiválódó kettős-szálú DNS törés hibajavító útvonalak. A DNS hibajavítás mellett megfigyeltek egy azzal párhuzamosan aktiválódó DNS károsodás hatására bekövetkező sejtválaszt (DNA Damage Response – DDR) is, amely biztosítja a sejtciklus átmeneti felfüggesztését és a transzkripció, valamint a replikáció gátlását is. A hiszton PTM-ek a DNS hibajavító útvonalak és a DDR működésére is jelentős hatást gyakorolnak, a hibajavításban szerepet játszó fehérjék számára felismerő-/kötőhelyet biztosítva [3-8]. A DNS sérülés gyors és precíz kijavításához szükséges a kromatin szerkezet felnyílása is a DNS károsodás környezetében [6-14]. A DNS sérülés környezetében a nukleoszómák destabilizálódnak, majd a javítás befejeztével a hiszton oktamerek reorganizációjával az eredeti kromatin szerkezet helyreállítása is megtörténik [8, 9, 11, 12, 15-18]. A sérülés környezetében a PTM-ek (pl.

ubiquitiláció, acetiláció) hatására további hiszton chaperonok (pl. Nucleolin, ASF1, CAF-1) és kromatin módosító komplexek (pl. Tip60, p400) lépnek működésbe. Ezek együttes hatása egy nyitottabb kromatin szerkezet kialakulását segíti elő [2, 7-11, 14-17]. A DNS hibajavítás befejezése után a nukleoszómák vissza-helyezésével egyidejűleg a heterokromatikus régiókra jellemző fehérjék felhalmozódásával (HP1, PC1) elindul egy, az eredeti kromatin szerkezet visszaállítását elősegítő mechanizmus [16].

A kettős-szálú DNS törések javítását főként a Nem-homológ végek összekapcsolása (Non-homologous End Joining – NHEJ) és a Homológ rekombináció (Homology Directed Repair – HDR) hibajavító útvonalak végzik (1. ábra), ezek mellett léteznek alternatív utak is (Alternative End-Joining – Alt-EJ/MMEJ, Single Strand Annealing – SSA) [2, 7, 8, 12, 19]. A két fő útvonal elsősorban sejtciklus függő módon aktiválódik, a NHEJ a G_0 és G_1 fázisban, míg a HDR az S és G_2 fázisban jellemző. A két hibajavító útvonal közti választást azonban jelentősen befolyásolja a sérülés környezetében megjelenő hiszton PTM-ek mintázata, a törés sejtmagon belüli elhelyezkedése, a körülötte levő kromatin szerkezet, valamint a sejt típusa is [2, 14, 19-23].

A DNS hibajavítást követően az adott régióra jellemző kromatin szerkezet visszarendeződik [11, 18]. Az újonnan szintetizálódott hiszton fehérjékből a nukleoszómák a hiszton chaperonok segítségével újra szerveződnek [9, 11, 15-17]. Mivel a citoplazmában újonnan létrejött hiszton fehérjék egyedi PTM-eket hordoznak, a kromatin szerkezetbe történő beépülésük után a hiszton módosító komplexek kialakítják a genomi környezetre jellemző hiszton poszt-transzlációs módosításokat [15-18]. Egyes tanulmányok szerint azonban az eredeti PTM mintázat nem alakul ki újra, hanem az újonnan szintetizálódott hiszton fehérjék eltérő módosításai jelként szolgálnak az ellenőrző folyamatokban szerepet játszó fehérjekomplexek számára, így további felülvizsgálat alá helyezik a helyreállított DNS régiót [16, 18].



1. ábra. A kettős-szálú DNS törések hibajavító útvonalai (Timothy M. Thomson, Marta Guerra-Rebollo nyomán [33]). A NHEJ útvonalban elsőként a Ku70/80 heterodimer komplex kötődik gyűrűként illeszkedve a sérült DNS végekhez, ezáltal dokkoló helyet biztosítva a DNA-PK fehérjének. A kötődést követően a DNA-PK autofoszforiláció révén aktiválódik és foszforilálja az Artemis endonukleázt, így az komplementer végeket kialakítva lehetővé teszi, hogy az XRCC4 és Cer-XLF fehérjék által a törés helyére irányított DNS ligáz IV összekapcsolja a sérült DNS szálakat. A HDR működéséhez szükség van a templátként szolgáló testvér kromatida jelenlétére. A komplementer DNS szakasz keresése érdekében a törött DNS végeket egyes-szálú DNS-sé (ssDNS) alakítja az útvonalban elsőként kötődő MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) komplex a CtIP fehérjével együttműködve. Ezt követően az EXO1 és DNA2 összehangoltan működve további hosszabb ssDNS szakaszokat hoz létre. Az ssDNS-hez az RPA kötődik, amely elősegíti a RAD51 fehérje kötődését is. A RAD51-ssDNS filament a testvér kromatida komplementer szakaszával kapcsolatot létesít, így kialakítva a D-loop szerkezetet. A DNS szintézis során a DNS polimeráz δ által beépített nukleotidok kapcsolódnak a 3' ssDNS véghez. Ezt a második hibridizációs eseményt követően a követő szál szintézise is elindul. Végezetül a kialakult Holliday szerkezet felbomlása következik be, és a fennmaradó nickeket a DNS ligáz IV kapcsolja össze.

A DNS károsító vegyületek és a rák kialakulása közötti kapcsolatot elsőként Percival Pott írta le 1775-ben [24]. A DNS kettős-hélix felfedezését követően 1955-ben igazolták, hogy a mutagének megváltoztatják a DNS kémiai szerkezetét, ezáltal kapcsolat mutatható ki a mutagenézis és karcinogenezis között [25]. Habár 1958-ban már felismerték, hogy a DNS hibák javíthatók, újabb tíz év telt el, míg a Xeroderma pigmentosum betegségről igazolták, hogy a DNS hibajavítás defektusa okozza [26, 27]. Mindezidáig számos DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjéről kimutatták, hogy funkcióvesztéses mutációjuk figyelhető meg a tumorgenezis során. Az elmúlt tíz év eredményei

azt bizonyítják, hogy a DNS hibajavításban szerepet játszó ATM kináz és a rák kialakulása között szoros kapcsolat feltételezhető [28]. Továbbá igazolták, hogy a hisztonok ubiquitilációjában szerepet játszó BRCA1/2, RNF8/168 E3 ubiquitin ligázok fehérje szintjének csökkenése és növekedése is megfigyelhető bizonyos tumor típusokban [29]. Mivel a DNS hibajavítást vizsgáló tudományterület mindösszesen pár évtizedet ölel fel, ezért az egész folyamatról csak kevés információval rendelkezünk.

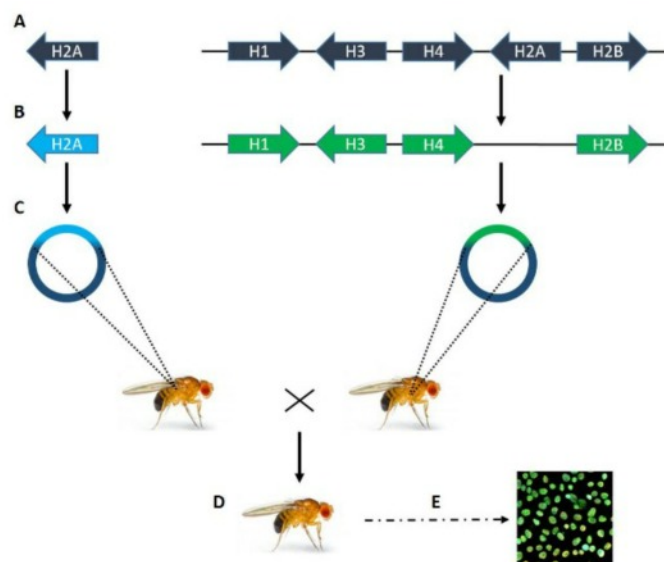
A Genom Integritás és DNS Hibajavítás Kutatócsoport

A Genom Integritás és DNS Hibajavítás Kutatócsoport (2. ábra) 2015 elején alakult az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken TÁMOP, OTKA és MTA Bolyai támogatással. Fő kutatási területünk a DNS károsodás által aktivált szignalizációs útvonalak térképezése. Célunk annak megértése, hogyan történik a DNS törések azonosítása az eukarióta kromatin szerkezetben, valamint a törések milyen kromatin szerkezeti változásokat hoznak létre a hibajavítás során. További kutatási témáink a következők: a DNS károsodás során bekövetkező transzkripcionális válaszok jellemzése és a rák diagnosztikában alkalmazható potenciális biomarkerek karakterizálása. A kérdéseink megválaszolásához humán sejtkultúrákat és *Drosophila* modellrendszert használunk, melyeken a legmodernebb biokémiai és genetikai megközelítéseket (kromatin immunprecipitáció, új generációs szekvenálás, szuperrezolúciós STORM mikroszkópia) alkalmazzuk.



2. ábra. A Genom Integritás és DNS Hibajavítás Kutatócsoport tagjai. Első sor: Újfaludi Zsuzsanna, Majoros Hajnalka, Szűcs Diána, Borsos Barbara, Ördög Nóra. Második sor: Varga Árpád, Páhi Zoltán, Pankotai Tibor.

Kutatócsoportunk egy olyan kísérleti rendszer előállítását tűzte ki célul, amely az egyedi hiszton PTM-ek DNS hibajavításra gyakorolt hatásának *in vivo* vizsgálatát teszi lehetővé. A kérdéseink megválaszolásához *Drosophila* modellállatokat használunk, amelyekben egyedülálló lehetőség nyílik az endogén hiszton régió eltávolítására és az általunk vizsgálni kívánt hiszton mutációk visszajuttatására. A *Drosophila* modell-rendszerben nyert eredményeinket egér és humán sejtkultúra rendszerekben teszteljük, ezáltal olyan DNS hibajavításban fontos kromatin szerkezeti változásokat azonosíthatunk, amelyek általánosan érvényesek minden magasabb rendű eukarióta szervezetre. Első lépésként előállítottuk az egyedi hiszton géneket és a teljes hiszton klasztert tartalmazó plazmidokat (3.A ábra).



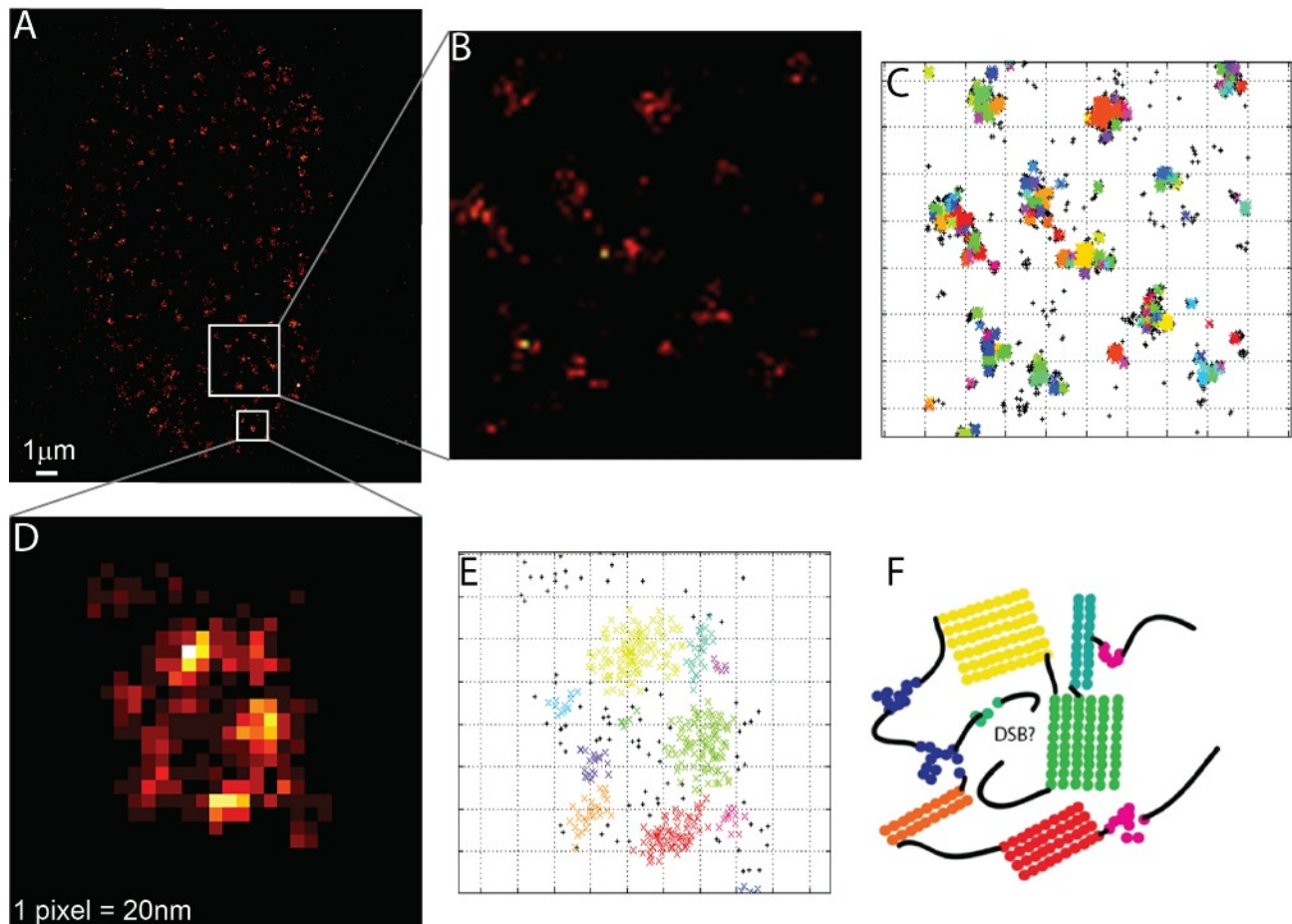
3. ábra. A H2A hiszton poszt-transzlációs módosítások vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer sematikus ábrázolása. A lépések megegyeznek a H1, H2B, H3 és H4 hisztonok esetében is. (A) PCR segítségével előállítottunk egyedi hiszton géneket (bal oldal – H2A) és a teljes hiszton klasztert tartalmazó plazmidokat (jobb oldal). (B) A hiszton gének kódoló régióiban mutációkat hoztunk létre, valamint a hiszton klaszterből eltávolítottuk a vizsgálni kívánt hiszton kódoló DNS szakaszt. (C) A pontmutáns hiszton géneket (kék kör részlet) és a deléciós hiszton klasztert (zöld kör részlet) hordozó transzgenikus állatok keresztezéséből létrejöttek olyan egyedek, amelyek a mutációt tartalmazó H2A fehérjét termelik. (D) Ezeket az utódokat felhasználva, meghatározott genomi pozíciókban kettős-szálú DNS törések indukálhatók a CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazásával. (E) A pontmutáns H2A fehérjét tartalmazó állatokban vizsgálható a DNS hibajavítás kinetikája.

A hiszton génekben (H1, H2A, H2B, H3, H4) *in vitro* mutagenézis segítségével meghatározott pozíciókban pontmutációkat hoztunk létre, amelyek a hiszton fehérjében aminosav cserét eredményeznek. A létrehozott mutációk egy adott PTM jelenlétét mimikálják, vagy a módosítás kialakulását akadályozzák (3.B ábra). Ezzel párhuzamosan az előállított hiszton klaszterekből egy-egy hiszton gént részben vagy teljesen eltávolítottunk (3.B ábra). A mutációt hordozó hiszton géneket és a deléciós klasztereket *Drosophila* klónozó vektorba (pUAST-attB) építettük, amely alkalmas transzgenikus állatok létrehozására. A módosított hiszton géneket és deléciós klasztereket tartalmazó transzgenikus *Drosophila* vonalak egyedeinek keresztezéséből létrejönnek olyan utódok, amelyek csak a mutációt hordozó hiszton fehérjét termelik (3.C ábra). Ezekben az állatokban kettős-szálú DNS töréseket hoztunk létre CRISPR-Cas9 rendszer segítségével, majd vizsgáltuk a DNS hibajavítás kinetikáját (3. D-E ábra).

A projekt részét képezi olyan deubiquitinázok (DUB) azonosítása, amelyek szerepet játszhatnak a hiszton- és nem hiszton típusú fehérjék deubiquitilálásában egyes- és kettős-szálú DNS törések hibajavítása során. Ehhez rendelkezésünkre áll a Dr. Deák Péter (SZTE TTK Genetika Tanszék) laboratóriumában előállított *Drosophila* törzsgyűjtemény, amely minden, az ecetmuslicában azonosított DUB génre tartalmaz deléciós- vagy siRNS csendesítést eredményező transzgenikus vonalakat. A törzsgyűjtemény felhasználásával egy röntgen, valamint UV-B sugárforráson alapuló screen-t végeztünk. Eredményeink alapján négy DUB fehérjét azonosítottunk, amelyek szerepet játszhatnak az UV és a röntgensugárzás által keletkezett DNS hibák javításában. Az azonosított fehérjék molekuláris karakterizálása és a DNS hibajavító útvonalban betöltött szerepének tisztázása jelenleg is folyamatban van.

A *Drosophila* modellrendszerben azonosított, DNS hibajavításban szerepet játszó hiszton PTM-ek szabályozó funkciójának vizsgálatához humán sejtenyészeteket is alkalmazunk. A DNS hibajavítás során az egyes hiszton

módosítások szintbeli változását követjük nyomon, elsősorban immunhisztokémiai és kromatin immunprecipitációs kísérletekben.



4. ábra. A DNS hibajavító fókuszokban megjelenő H2AX S139P hiszton PTM eloszlásának tanulmányozása STORM mikroszkópiával. (A) A sejtekben látható hibajavítási fókuszok konfokális mikroszkópiával készült képe. (B-D) A sejtmagok egy-egy részletének STORM technikával történő vizsgálata látható. (C-E) Mikroszkópos felvételek Matlab programmal készült klaszter analízise figyelhető meg. (F) Az ábra mutatja az egyetlen hibajavítási fókuszban megfigyelhető, S139P módosítást hordozó H2AX hisztonok elhelyezkedését.

Kísérleteinkben véletlenszerű genomi régiókban, valamint irányítottan, specifikus genomi pozíciókban kettős-szálú DNS töréseket idézünk elő, majd a kezelést követően az egyes hiszton fehérjék acetiláltsági szintjének időbeni változását vizsgáljuk és azonosítjuk az azokat kialakító kromatin módosító komplexeket is [30]. Eredményeink segítenek annak megértésében, hogy a kromatin szerkezet hogyan befolyásolhatja a kromoszómális transzlokációk kialakulását, melyek rákos folyamatokhoz vezethetnek. A biokémiai módszerek mellett a DNS törés környezetében kialakuló kromatin szerveződési változások

3 dimenziós eloszlását is vizsgáljuk. Ehhez egyedi sejteken nagyfelbontású STORM mikroszkópiát alkalmazunk. Közel egy év optimalizálást követően, egy speciális immunfestési eljárás segítségével, képesek vagyunk a DNS hibajavítási fókuszokban közel 20 nm-es felbontás elérésére. Ez lehetővé teszi a sérült DNS régiókban létrejövő nyitottabb és zártabb kromatin régiók további vizsgálatát és az adataink összevetését a biokémiai kísérleteinkben nyert eredményeinkkel. Mivel a 20 nm-es felbontás elérésével láthatóvá tehető a DNS károsodás környezetében található nukleoszómák mennyisége és a PTM-ek eloszlása, ezáltal egyedi sejtekből és eltérő genomi régiókból nyerhetünk információt a kromatin szerkezetéről és a hiszton PTM-ek terjedési távolságáról is (4. ábra).

Laboratóriumunk harmadik fő projektje annak megértése, hogy a kettős-szálú DNS törések hibajavítása milyen hatással van a transzkripció folyamatára. A projektben korábban elvégzett munka folytatásaként kimutattuk, hogy az RNS polimeráz II (RNSPII) által átíródó régiókban történő kettős-szálú DNS törések kialakulása a sérült génről történő transzkripció leállítását okozza a hiba kijavításának ideje alatt, majd a javítás befejezése után a génátírás újraindul [31, 32]. Igazoltuk, hogy a transzkripció leállításához számos, a DNS hibajavításban szerepet játszó fehérje jelenléte szükséges, mint a Ku70, p53 és DNA-PK. Kromatin immunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a javítás idejére az RNSPII eltávolításra kerül a hibás DNS szálról, és mind a transzkripció iniciációja, mind az elongációja gátolt. Specifikus inhibitorok és siRNS csendesítés segítségével bizonyítottuk, hogy az RNSPII proteaszómális degradáció útján kerül lebontásra. Az előzetes várakozásokkal ellentétben az RNSPII megállása a CTD S2 hiperfoszforilációját eredményezi és a folyamat lezajlásához a fent említett hibajavító faktorok jelenléte szükséges. A hiperfoszforilált CTD kötőhelyként szolgál számos E3 ubiquitin ligáz számára, amelyek hatására a 26S proteaszómákban elkezdődik az RNSPII degradációja. Ellentétben a citoplazmatikus fehérje lebontással, az RNSPII degradációja a DNS sérülés közvetlen környezetében valósul meg, mivel a DNS károsodás után a sérült génen megfigyelhető a 26S proteaszóma 19S és 20S alegységeinek kötődése is.

Kísérleti eredményeink rávilágítanak arra, hogy – a Nukleotid-kivágó hibajavításhoz hasonlóan – az RNSPII komplex a transzkripción kívül szerepet játszhat a DNS hibák azonosításában is, mivel a DNS hibajavító fehérjék DNS károsodás nélkül is kölcsön hatnak a normál RNSPII ciklusban résztvevő transzkripciós komplexszel. Továbbá, ha a DNS károsodás átíródó géneken jön létre, a DNS hibajavító faktorok segítik a transzkripció teljes leállítását a DNS hibajavítás alatt, amely során az RNSPII komplexen történő foszforilációs és ubiquitilációs módosítások sorozatát elindítva biztosítják az RNSPII szabályozott, 26S proteaszóma által közvetített eltávolítását. Feltételezésünk szerint elsősorban ez a kapcsolat biztosítja a DNS hibajavítás gyors lejátszódását, valamint meggátolja olyan hibás mRNS termékek keletkezését, amelyek tumork indukciójára alkalmas fehérjék termelődését segíthetik elő.

Ahogy korábban említettük, számos hibajavításban szerepet játszó fehérjéről ismert, hogy mutációja vagy hiánya rákos folyamatok elindulásához vezethet. Feltételezésünk szerint a DNS hibajavítás sebességét befolyásoló folyamatok feltárása segíthet a tumoros folyamatok kialakulásának megértésében. Reményeink szerint kutatásaink hasznosnak bizonyulnak majd ahhoz, hogy jobban megértsük a folyamat molekuláris szabályozását és jelentőségét. Mindezekon túl a DNS hibajavítás kinetikájának megismerése segíthet feltárni, hogy a kromatin szerkezet hogyan befolyásolhatja a transzlokációk kialakulásának valószínűségét is. Továbbá arra a kérdésre is választ adhatnak, hogy a tumorigenezis során kialakuló tumor őssejtek hogyan képesek a DNS hibajavítás hatékonyságának növelésével túlélni a kemo- és radioterápiás kezeléseket. Így az általunk használni kívánt kísérleti rendszer nagymértékben hozzájárulhat olyan, eddig nem ismert kromatin szerkezetet érintő folyamatok megértéséhez, amelyek nemcsak új rákterápiás célpontok azonosítását teszik lehetővé, hanem rákellenes gyógyszerek tesztelésének lehetőségeit is.

Irodalomjegyzék

- [1] Nagy, Z., Soutoglou, E. (2009) DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate. *Trends Cell Biol*, **19 (11)**: 617-29.
- [2] Cannan, W.J., Pederson, D.S. (2016) Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, **231 (1)**: 3-14.
- [3] Jackson, S.P., Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461 (7267)**: 1071-8.
- [4] Jackson, S.P., Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell*, **49 (5)**: 795-807.
- [5] Liu, Y., Li, Y., Lu, X. (2016) Regulators in the DNA damage response. *Arch Biochem Biophys*, **594**: 18-25.
- [6] Greenberg, R.A. (2011) Histone tails: Directing the chromatin response to DNA damage. *FEBS Lett*, **585 (18)**: 2883-90.
- [7] Miller, K.M., Jackson, S.P. (2012) Histone marks: repairing DNA breaks within the context of chromatin. *Biochem Soc Trans*, **40 (2)**: 370-6.
- [8] Polo, S.E., Jackson, S.P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*, **25 (5)**: 409-33.
- [9] Adam, S., Dabin, J., Polo, S.E. (2015) Chromatin plasticity in response to DNA damage: The shape of things to come. *DNA Repair (Amst)*, **32**: 120-6.
- [10] Cao, L.L., Shen, C., Zhu, W.G. (2016) Histone modifications in DNA damage response. *Sci China Life Sci*, **59 (3)**: 257-70.
- [11] Dabin, J., Fortuny, A., Polo, S.E. (2016) Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Mol Cell*, **62 (5)**: 712-27.
- [12] Jeggo, P.A., Downs, J.A. (2014) Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. *Exp Cell Res*, **329 (1)**: 69-77.
- [13] Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., Nussenzweig, A. (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, **172 (6)**: 823-34.
- [14] Gursoy-Yuzugullu, O., House, N., Price, B.D. (2016) Patching Broken DNA: Nucleosome Dynamics and the Repair of DNA Breaks. *J Mol Biol*, **428 (9 Pt B)**: 1846-60.
- [15] Polo, S.E. (2015) Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins. *J Mol Biol*, **427 (3)**: 626-36.
- [16] Polo, S.E., Almouzni, G. (2015) Chromatin dynamics after DNA damage: The legacy of the access-repair-restore model. *DNA Repair (Amst)*, **36**: 114-21.

- [17] Soria, G., Polo, S.E., Almouzni, G. (2012) Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell*, **46 (6)**: 722-34.
- [18] Polo, S.E., Almouzni, G. (2007) DNA damage leaves its mark on chromatin. *Cell Cycle*, **6 (19)**: 2355-9.
- [19] Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*, **26 (1)**: 52-64.
- [20] Lemaitre, C., Grabarz, A., Tsouroula, K., Andronov, L., Furst, A., Pankotai, T., Heyer, V., Rogier, M., Attwood, K.M., Kessler, P., Dellaire, G., Klaholz, B., Reina-San-Martin, B., Soutoglou, E. (2014) Nuclear position dictates DNA repair pathway choice. *Genes Dev*, **28 (22)**: 2450-63.
- [21] Kalousi, A., Soutoglou, E. (2016) Nuclear compartmentalization of DNA repair. *Curr Opin Genet Dev*, **37**: 148-57.
- [22] Misteli, T., Soutoglou, E. (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10 (4)**: 243-54.
- [23] Chapman, J.R., Taylor, M.R., Boulton, S.J. (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, **47 (4)**: 497-510.
- [24] Pott, P. (1993) [The first description of an occupational cancer in 1777 (scrotal cancer, cancer of chimney sweeps)]. *Bull Soc Liban Hist Med*, **4**: 98-101.
- [25] Burdette, W.J. (1955) The significance of mutation in relation to the origin of tumors: a review. *Cancer Res*, **15 (4)**: 201-26.
- [26] Hill, R.F. (1958) A radiation-sensitive mutant of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta*, **30 (3)**: 636-7.
- [27] Cleaver, J.E. (1969) Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **63 (2)**: 428-35.
- [28] Shiloh, Y., Tabor, E., Becker, Y. (1982) Cellular hypersensitivity to neocarzinostatin in ataxia-telangiectasia skin fibroblasts. *Cancer Res*, **42 (6)**: 2247-9.
- [29] Lord, C.J., Ashworth, A. (2013) Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat Med*, **19 (11)**: 1381-8.
- [30] Pankotai, T., Komonyi, O., Bodai, L., Ujfaludi, Z., Muratoglu, S., Ciurciu, A., Tora, L., Szabad, J., Boros, I. (2005) The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol*, **25 (18)**: 8215-27.

- [31] Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., Soutoglou, E. (2012) DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol*, **19 (3)**: 276-82.
- [32] Pankotai, T., Soutoglou, E. (2013) Double strand breaks: hurdles for RNA polymerase II transcription? *Transcription*, **4 (1)**: 34-8.
- [33] Thomson, T.M., Guerra-Rebollo, M. (2010) Ubiquitin and SUMO signalling in DNA repair. *Biochem Soc Trans*, **38 (Pt 1)**: 116-31.



Szűcs Diána 2015-ben csatlakozott a laborhoz B.Sc. szakdolgozó hallgatóként. 2015-ben megszerezte biológus diplomáját és az Alexandrópoliban megrendezett SymbioSE konferencián eredményeit előadás és poszter formájában prezentálta. 2016-ban I. évfolyamos Biológia M.Sc. hallgatóként részt vett a Tudományos Diákköri Konferencia tavaszi fordulóján, melyen a „A DNS hibajavítást segítő hiszton poszt-transzlációs módosítások in vivo vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer létrehozása *Drosophila* és humán modellrendszerben” című pályamunkájával III. helyezést ért el. 2016 nyarán az MBKE 2016. évi Vándorgyűlésén a labor által létrehozott kísérleti elrendezést poszter formájában mutatta be. Jelenleg M.Sc. hallgatóként dolgozik

a laborban, kutatási tevékenysége a kettős-szálú DNS törések hibajavításában résztvevő hiszton poszt-transzlációs módosításokra irányul.



Pankotai Tibor 1999-ben csatlakozott a Dr. Boros Imre által vezetett Eukarióta Transzkripció Szabályozás Kutatócsoporthoz. Kutatási témája a *Drosophila melanogaster* hiszton acetiltranszferáz komplexek jellemzése volt. A biológus diplomát 2003-ban, majd a kutatási témáját folytatva a Ph.D. fokozatot 2007-ben szerezte meg. Posztdoktor kutatóként 4 hónapot töltött Alexander Pintzas athéni laboratóriumában, majd 2009-ben csatlakozott Evanthia Soutoglou akkor induló kutatócsoportjához (IGBMC, Strasbourg, Franciaország). A strasbourgi posztdoktori időszak alatt elnyerte az FRM és a La Ligue kutatási ösztöndíjakat. Hazatérése után 2015-ben megalapította a

Genom Integritás és DNS Hibajavítás Kutatócsoportot. 2014-ben elnyerte az MTA Bolyai ösztöndíjat, míg 2016-ban a Magyar Genetikusok Egyesülete Gyórfy Barna díjjal jutalmazta.

AZ AUTOFÁGIA ÉLETTANI VIZSGÁLATÁÉRT ODAÍTÉLT NOBEL-DÍJ

Takáts Szabolcs^{1,2}, Juhász Gábor^{1,3}

**¹ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, ²MTA Prémium
Posztdoktori Program, ³MTA SZBK Genetikai Intézet**

Az eukarióta sejtek működését alapvetően meghatározzák a bennük zajló membrántranszport folyamatok, melyek biztosítják az anyagáramlást az egyes kompartmentek között. A terület jelentőségét jól mutatja, hogy az elmúlt években két orvosi vagy élettani Nobel-díjat is az eukarióta membrántranszport folyamatok területén elért felfedezésekért osztottak ki. 2013-ban a vezikulatranszport és membránfúzió folyamatának megértéséért James Rothman, Randy Schekman és Thomas Südhof megosztva nyerték el a legrangosabb tudományos kitüntetést [1]. Cikkünk azonban nem róluk, hanem az idei díjazottról: Yoshinori Ohsumi professzorról szól, aki az elismerést az autofágiához vagy más néven sejtes önmérsztéshez szükséges gének többségének felfedezéséért kapta. A japán professzor életrajzából egy rendületlenül a kihívásokat kereső kutató nem mindennapi életpályája rajzolódik ki, ami inspirációul szolgálhat azoknak a kutatótársunknak, akik a pályájuk során nem várt nehézségekbe ütköznek.

Ohsumi professzor (szül. 1945) vegyészként végezte el az egyetemet. Mivel azonban úgy vélte, hogy ezen a területen már kevés a felfedezni való, ezért a Tokiói Egyetemen megkezdett Ph.D. tanulmányai során a fehérjeszintézis vizsgálatával kezdett foglalkozni. 1974-ben doktorált molekuláris biológusként, de elmondása szerint Ph.D. munkája során nem sikerült igazán kiemelkedő eredményeket produkálnia. Ezt követően 3 évet töltött posztdoktorként New Yorkban, a Rockefeller Egyetemen. Itt egér *in vitro* fertilizációs módszerek kidolgozásával próbálkozott, ám ismét nehézségekbe ütközött: egyrészt bevallottan nem sokat értett az embriológiához, másrészt a rendelkezésére álló petesejtek száma is csekély volt. New York-i tartózkodása azonban mégis

meghatározónak bizonyult számára, ugyanis egy másik kutatásba bekapcsolódva itt ismerkedett meg az élesztő modellrendszerrel, melynek vizsgálatával későbbi felfedezéseit érte el.

1977-ben tért vissza Japánba, és egyszemélyes „kutatócsoportként” 1988-ban figyelte meg az autofágia jelenségét élesztőben. Az autofágia ekkor már évtizedek óta ismert folyamat volt, melyet Alex Novikoff már 1959-ben felfedezett vesesejtekben [2]. Ohsumi professzor munkásságát megelőzően az autofágiát elsősorban elektron- és fénymikroszkóppal vizsgálták, és ezek a munkák alapvetően leíró jellegűek voltak. A technikák lehetővé tették a fő útvonalban szereplő autofág struktúrák azonosítását: a lebontandó citoplazma részt körbefogó membránciszternát (ami fagofórként vagy izoláló membránként ismert), és az ennek záródásával létrejövő, két membránnal körülvett autofagoszómát. A folyamat végpontjaiként pedig létrejönnek az autofagoszómák és lizoszómák fúziójából az autolizoszómák, melyekben megtörténik az odaszállított anyag lebontása. Ezt a bomlástermékek bioszintetikus és energiatermelő folyamatokban történő újrafelhasználása követi. Az autofágia vizsgálatába már az 1960-as években bekapcsolódtak az ELTE Állatszervezettani (később Sejtbiológiai) Tanszékének kutatói is, Kovács János vezetésével [3, 4]. Tanítványaival, Réz Gáborral, Sass Miklóssal és Kovács Attilával számos tanszéki tanulmányt publikáltak [5-7]. Az autofágia a mai napig is a tanszék fő kutatási iránya maradt, de már a több mint egy évtizede meghonosított modern genetikai és molekuláris biológiai módszerekkel zajlik.

Az autofágia genetikájáról és valódi jelentőségéről azonban 1988-ban még semmit sem tudtak. Ohsumi professzor ötlete az volt, hogy mivel az élesztőnek nagy, fénymikroszkópban is jól látható vakuóluma (élesztőben ez felel meg a lizoszómáknak) van, ezért megfigyelhetőek lehetnek bennük az autofágia útján bekerült, citoplazmatikus anyagot tartalmazó ún. autofág testek (ezek az autofagoszómák külső membránjának lizoszóma/vakuólum-membránnal történő fúziója révén jönnek létre). Olyan élesztő törzset izolált, melyben egy

kritikus lizoszómális proteázt kódoló gén hiányzott, így ezekben a sejtekben a vakuólumba bejutó, de meg nem emésztődő autofág testek felhalmozódtak. A professzor szellemes és zseniálisan egyszerű megközelítése bevált: ő lett az első, aki élesztőben megfigyelte az autofágia működését [8]. Ez óriási változást jelentett a témában addig használt vizsgálatokhoz képest: az elektronmikroszkópiához és radioaktív fehérjék lebomlásához hasonlóan lassú, munkaigényes módszerekkel szemben a folyamat élő sejtekben is könnyen követhetővé vált. Mivel újfajta megközelítése lehetővé tette számára, hogy rövid idő alatt nagyszámú sejten vizsgálhassa az autofágiát, Ohsumi professzor kitűzhetette újabb célját: a folyamatot szabályozó gének felfedezését. E célból végzett kísérletei során a vakuoláris proteáz mutáns élesztő törzset kémiai ágenssel mutagenizálta. Az autofagoszóma kialakuláshoz szükséges géneket érintő mutációk megakadályozták az autofág testek felhalmozódását. Ezzel a módszerrel 15 autofágiát szabályozó gént sikerült azonosítani. Utóbb Nobel-díjat érő eredményeit 1993-ban közölte a FEBS Letters-ben, de akkoriban még aligha gondolta, hogy felfedezése egy tudományos forradalom kezdetét jelenti [9]. Ohsumi professzor úttörő munkáját hamarosan más laborok publikációi követték, és mára összesen mintegy három tucatnyi autofágiát szabályozó élesztő gén került leírásra. Mivel e kutatócsoportok egymással párhuzamosan dolgoztak és eltérő nomenklatúrát használtak a gének elnevezésénél, szükségessé vált egy egységes rendszer kialakítása. Így a terület akkoriban legjelentősebb kutatói megegyeztek, hogy az autofágiát szabályozó géneket egységesen Atg (Autophagy related gene) címkével jelölik [10]. Ohsumi professzor és mások kutatásai fényt derítettek arra, hogy ezek az Atg fehérjék funkcionális egységekbe, komplexekbe szerveződve fejtik ki hatásukat. Ilyen pl. az ubikvitinszerű Atg12 és Atg8 fehérjék konjugációs kaszkádja, melynek eredményeképpen az Atg8 C-terminális végéhez egy foszfatidil-etanolamin molekula köt kovalensen, ezáltal az Atg8 autofág membránokba horgonyzódik [11, 12]. Megjegyzendő, hogy az Atg8 és homológjai (pl. emlősök esetén az LC3 fehérjék) a legelterjedtebb autofág markerek: fluoreszcens mikroszkópia révén vizsgálható eloszlásuk a sejtekben, valamint Western blot segítségével

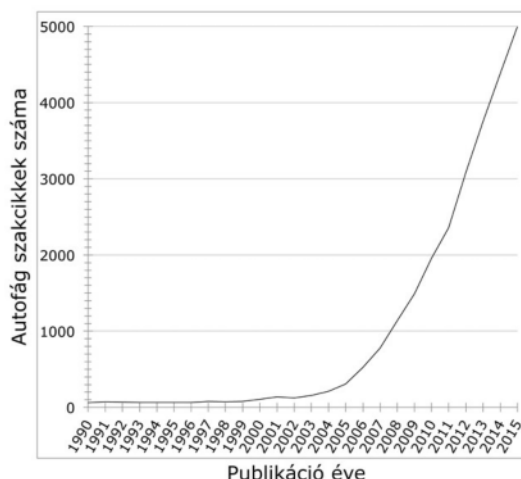
meghatározható a lipidált, autofagoszóma-asszociált forma szintje. Az autofág fehérjekomplexek további taglalásától most eltekintünk, mivel a közelmúltban a Biokémia újságban megjelent korábbi cikkünkben ezt részletesen bemutattuk [13].

Az autofágia kutatásában az Atg gének felfedezése mellett a genomszekvenálási programok is jelentős előrelépést hoztak. A fonálféreg, a muslica, az egér és az emberi génkészlet megismerésével ugyanis világossá vált, hogy az élesztő Atg gének többségének homológjai megtalálhatóak a magasabb rendű eukariótákban is, azaz az autofágia szabályozása evolúciósan konzervált. Ezzel kezdetét vette az autofágia élettani jelentőségének tenyésztett sejtekben és teljes állati szervezetekben történő vizsgálata, és már a 2000-es évek környékén megjelentek az első Atg funkcióvesztéses tanulmányok [14-17].

Immáron az új évezredben folyó kutatások eredményeként kiderült, hogy az autofágia sokkal több, mint egy érdekes, de nem túl nagy jelentőségű sejtélettani folyamat. Az élettani, genetikai és molekuláris sejtbiológiai kutatásoknak köszönhetően kiderült, hogy autofágia alapvető szerepet játszik a sejtek túlélésében és megújulásában az elöregedett, hibás fehérjék, mitokondriumok és egyéb sejtalkotók eltakarításával. Ezáltal a folyamatnak óriási jelentősége van az osztódással megújulni nem képes sejtek és szövetek, például a neuronok és a szívmuszkuláció élethosszig tartó megfelelő működésében. Emellett éhezés vagy egyéb kedvezőtlen környezeti tényezők fennállása esetén az autofágia a nélkülözhető sejtalkotók lebontásával bioszintetikus és energiatermelő folyamatokhoz biztosít szerves monomereket, ami nemcsak sejt-autonóm módon történhet. A környezeti ingerek mellett az autofágia különböző jelátviteli útvonalak hatására is aktiválódhat, és az egyedfejlődés során bizonyos sejtek és szövetek programozott pusztulását az extrém mértékben megnövekedett autofágia készíti elő. Az immunrendszer működése során temérdek intracelluláris kórokozó (baktériumok, vírusok) lizoszómális lebontásában is közreműködik az autofágia, és még az antigén

prezentálásban is szerepel. Az autofágia kettős szerepet játszhat a rákos betegségekben. Egyrészt a kezdeti, iníciációs lépést gátolja a sejtek karbantartása révén, ami csökkentheti a DNS károsodások esélyét. Másrészt a már kialakult tumorokban a ráksejtek túlélését biztosíthatja éhezés és hipoxia esetén, tehát az autofágia gátlása felmerülhet lehetséges antitumor terápiaként [18]. Ezen felül a legújabb kísérleti adatok alapján a rákos sejtek képesek a környező normális sejtekben aktiválni az autofágiát, és feltehetően az így felszabaduló és a sejt közötti térbe kerülő monomereket hasznosítják [19, 20].

Az autofágia élettani jelentősége mellett, a folyamat hibájából fakadó betegségekről is érdemes szót ejteni. Az autofágia csökkent működése mind gerinctelenekben, mind pedig emlősökben kapcsolatba hozható különböző neurodegenerációs kórképek kialakulásával. Az Atg gén-függő autofágia gátlása idegsejtekben mozgási zavarokat, stressz-érzékenységet és korai halált okoz *Drosophila* és egér modellekben is [21-23]. Egy másik jól ismert példa a mitokondriumok szelektív autofág lebontása, melynek parkin és PINK1 génmutációk okozta hibája hozzájárulhat a Parkinson-kór kialakulásához [24]. Idén pedig megjelent az első olyan publikáció, melyben egy mentális retardációban, fejlődési rendellenességekben és idegi eredetű mozgásproblémában (ataxiában) szenvedő testvérpárról sikerült igazolni *Drosophila* és élesztő modellek és biokémiai szerkezetvizsgálatok révén, hogy betegségüket az Atg5 gén hipomorf mutációja okozta [25]. Végül érdemes szót ejteni az autofágia csökkent működésének és az öregedésnek a kapcsolatáról, melyet számos kísérleti állatban igazoltak. Ezzel párhuzamosan viszont a folyamat genetikai, farmakológias vagy életmód révén történő indukciója (itt gondolhatunk a csökkent mértékű kalória bevitelre vagy a rendszeres sportolásra) megnyújtja a kezelt állatok élettartamát vad típusú társaikéhoz képest [26, 27]. Így hatalmas orvosi biológiai jelentősége és öregedés gátló hatása miatt az autofágia kutatás nagy jövő előtt áll. Ezt jól mutatja az, hogy a kutatási terület népszerűsége mindmáig töretlenül növekszik (1. ábra), melyet Ohsumi professzor alapvető genetikai felfedezései tettek lehetővé.



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

Szinte hihetetlen belegondolni, hogy mindez a hatalmas fejlődés egy jóformán ismeretlen és többé-kevésbé sikertelen középkorú japán kutató leleményességéből fakadó, ráadásul akkoriban csekély jelentőségűnek tűnő felfedezésének köszönhető. Ohsumi professzor a kutatási terület egyik legnagyobb szaktekintélye; 1993 óta laborja számos nagy horderejű, az autofágiával kapcsolatos felfedezést publikált, és rangos elismeréseket nyert el. Az idei élettani Nobel-díj méltó megkoronázása egy kiváló kutató nem mindennapi pályafutásának. Fontos azonban kiemelni, hogy a díjat az autofágia fontos élettani vonatkozásaiért ítélték oda: még az sem világos, hogy a központi Atg fehérjék hogyan működnek együtt az autofagoszóma kialakulása során [28], valamint hogy az autofagoszóma és lizoszóma fúziója hogyan szabályozódik [29-31]. Bőven vannak még tehát megválaszolásra váró kérdések, melyek felderítésében a hazai kutatócsoportok is jeleskednek. Saját kutatásaink mellett a teljesség igénye nélkül megemlíjtük a Bánhegyi Gábor (Semmelweis Egyetem), Fésüs László (Debreceni Egyetem), Petrovski Goran (Szegedi Tudományegyetem) és Vellai Tibor (Eötvös Loránd Tudományegyetem) vezette kutatásokat, melyekből szintén rendszeresen születnek színvonalas szakcikkek [27, 32-34].

Remélhetőleg a jövőben az autofágia orvos biológiai jelentősége is megerősítést fog nyerni. Ehhez két fő probléma vár megoldásra: egyrészt szükség van olyan módszerek kifejlesztésére, amelyek révén mérni lehet az autofág lebontás mértékét humán páciensek különféle szöveteiben, másrészt pedig hiányoznak az autofágiát minél specifikusabban gátló és aktiváló hatóanyagok. A jelenlegi Nobel-díj elsősorban az autofágia élettani és egészségügyi jelentőségét ismerte el. A folyamat célzott modulálásában rejlő terápiás potenciál sikeres kiaknázása hozhatja el a következő tudományos áttörést.

Irodalomjegyzék

- [1] Fári, K., Homolya, L. (2013) Vezikuláris transzport a kezdetektől a a 2013-as Nobel-díjig. *Biokémia*, **37(4)**: 27-34.
- [2] Novikoff, A.B. (1959) The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J Biophys Biochem Cytol*, **6(1)**: 136-8.
- [3] Kovacs, J. (1972) Induced cellular autophagy in the epithelial cells of seminal vesicle of mice treated with actinomycin D. *Acta Biol Acad Sci Hung*, **23(2)**: 181-93.
- [4] Kovacs, J., Hafiek, B. (1964) Effect of neutral red on mouse liver cells. *Acta Biol Acad Sci Hung*, **15**: 191-201.
- [5] Rez, G., Kovacs, J. (1973) Prevention by cycloheximide of neutral red-induced formation of autophagic vacuoles and krinom granules in mouse pancreatic acinar cells. *Virchows Arch B Cell Pathol*, **12(2)**: 123-32.
- [6] Sass, M., Kovacs, J. (1977) The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of *Mamestra brassicae*. *Cell Tissue Res*, **180(3)**: 403-9.
- [7] Kovacs, A.L., Kovacs, J. (1980) Autophagocytosis in mouse seminal vesicle cells in vitro. Temperature dependence and effects of vinblastine and inhibitors of protein synthesis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **32(2)**: 97-104.
- [8] Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, **119(2)**: 301-11.
- [9] Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993) *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **333(1-2)**: 169-74.
- [10] Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. (2003) *A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes*. *Dev Cell*, **5(4)**: 539-45.
- [11] Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, **395(6700)**: 395-8.

- [12] Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408(6811)**: 488-92.
- [13] Takáts, S., Nagy, P., Juhász, G. (2014) Az autofágia szerepének és szabályozásának vizsgálata *Drosophila* modellen. *Biokémia*, **38(4)**: 17-29.
- [14] Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, **402(6762)**: 672-6.
- [15] Melendez, A., Tallochy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., Levine, B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, **301(5638)**: 1387-91.
- [16] 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(1-3)**: 154-158.
- [17] Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, **152(4)**: 657-68.
- [18] Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451(7182)**: 1069-75.
- [19] Sousa, C.M., Biancur, D.E., Wang, X., Halbrook, C.J., Sherman, M.H., Zhang, L., Kremer, D., Hwang, R.F., Witkiewicz, A.K., Ying, H., Asara, J.M., Evans, R.M., Cantley, L.C., Lyssiotis, C.A., Kimmelman, A.C. (2016) Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature*, **536(7617)**: 479-83.
- [20] Kaderer, N., Khezri, R., O'Farrell, F., Schultz, S.W., Jain, A., Rahman, M.M., Schink, K.O., Theodossiou, T.A., Johansen, T., Juhász, G., Bilder, D., Brech, A., Stenmark, H., Rusten, T.E. (2016) Microenvironmental autophagy promotes tumor growth. *Nature*, *in press*.
- [21] Juhász, 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 Dev*, **21(23)**: 3061-6.
- [22] 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(7095)**: 885-9.
- [23] 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(7095)**: 880-4.
- [24] Juhász, G. (2016) A mitochondrial-derived vesicle HOPS to endolysosomes using Syntaxin-17. *J Cell Biol*, **214(3)**: 241-3.

- [25] Kim, M., Sandford, E., Gatica, D., Qiu, Y., Liu, X., Zheng, Y., Schulman, B.A., Xu, J., Semple, I., Ro, S.H., Kim, B., Mavioglu, R.N., Tolun, A., Jipa, A., Takats, S., Karpati, M., Li, J.Z., Yapici, Z., Juhász, G., Lee, J.H., Klionsky, D.J., Burmeister, M. (2016) Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife*, **5**.
- [26] He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., Korsmeyer, S., Packer, M., May, H.I., Hill, J.A., Virgin, H.W., Gilpin, C., Xiao, G., Bassel-Duby, R., Scherer, P.E., Levine, B. (2012) Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*, **481(7382)**: 511-5.
- [27] Toth, M.L., Sigmond, T., Borsos, E., Barna, J., Erdelyi, P., Takacs-Vellai, K., Orosz, L., Kovacs, A.L., Csikos, G., Sass, M., Vellai, T. (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*, **4(3)**: 330-8.
- [28] Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Ann Rev Cell Developmental Biol*, **27**: 107-32.
- [29] 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(4)**: 531-9.
- [30] 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(8)**: 1338-54.
- [31.] Hegedus, K., Takats, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., Kovacs, A.L., Juhász, G. (2016) The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Mol Biol Cell*, **27(20)**: 3132-3142.
- [32] Kapuy, O., Vinod, P.K., Mandl, J., Banhegyi, G. (2013) A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Mol Biosyst*, **9(2)**: 296-306.
- [33] Petrovski, G., Zahuczky, G., Katona, K., Vereb, G., Martinet, W., Nemes, Z., Bursch, W., Fesus, L. (2007) Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes. *Cell Death Differ*, **14(6)**: 1117-28.
- [34] Kaarniranta, K., Sinha, D., Blasiak, J., Kauppinen, A., Vereb, Z., Salminen, A., Boulton, M.E., Petrovski, G. (2013) Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy*, **9(7)**: 973-84.



Takáts Szabolcs (szül. 1987) 2009-ben csatlakozott a laborhoz M.Sc. szakdolgozó hallgatóként. OTDK versenyen elért első helyezése, az ELTE TTK Kiváló Hallgatója díj elnyerése és 2011-es diplomázása után Ph.D. hallgatóként folytatta kutatómunkáját. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió molekuláris mechanizmusainak felderítésében elért eredményeiért elnyerte az MBKE 2014-es Bio-Science díját. 2015-ben szerzett Ph.D. fokozatot, és jelenleg is ezt a témát kutatja *Drosophila* modellen MTA Prémium Posztdoktori ösztöndíjasként.



Juhász Gábor (szül. 1976) 1996-ban, diákkörös hallgatóként kapcsolódott be az autofágia kutatásába, az ELTE Állatszervezettani Tanszékén akkoriban először alkalmazott *Drosophila* modellen. 1999-ben szerzett biológus és angol szakfordító diplomát, majd 2004-ben Ph.D. fokozatot Sass Miklós témavezetésével. Posztdoktorként az Egyesült Államokban dolgozott Tom Neufeld laborjában, hasonló témán. 2009-ben alapított önálló kutatócsoportot az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén a Wellcome Trust kutatási támogatásával. Az MTA Bolyai ösztöndíját két alkalommal is elnyerte, és 2015-ben Bolyai Plakettet kapott. 2015-ben az SZBK-ban MTA Lendület támogatással szenior kutatócsoport-vezetőként alapított új csoportot.

A DNS-BELI URACIL KVANTIFIKÁLÁSA EGY ÉRZÉKENY JELÖLŐ MÓDSZERREL

Scheer Ildikó^{1,3}, Róna Gergely^{1,2,3}, Vértessy G. Beáta^{1,3}

¹MTA TTK Enzimológiai Intézet, ²Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine,

³BME VBK Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Összefoglalás

A genomi uracil szerepét manapság újragondolták: nem csak mint DNS-beli hiba, hanem mint fiziológiás jelentőségű nem-ortodox bázis is számon tartják. A szélesebb körű vizsgálatokhoz létrehoztunk egy olyan új, megbízható, nagy áteresztőképességű és gyors módszert, amely *in vitro* és eddig egyedülálló módon *in situ* genomi uracil detektálásra is alkalmazható.

Bevezetés

Az uracil (U) az RNS fiziológiás építőköve, a DNS-ben a jelenlétét viszont hibaként tartják számon. A legtöbb DNS polimeráz nem tud különbséget tenni a mindösszesen egy metil csoportban különböző timin (T) és az uracil között. A timin helyetti uracil beépülése azonban nem okoz mutációt. Ha viszont a DNS-beli citozin (C) dezaminálódik uracillá, akkor a következő replikáció során a dezaminált bázissal szembe guanin (G) helyett adenin (A) épül be, és így C:G→U(T):A pontmutáció következhet be. A hidrolitikus citozin dezamináció egy emlős genomban napi 70-200 alkalommal bekövetkező folyamat [1]. Fontos azt is megjegyeznünk, hogy a timin helyetti uracil beépülés megelőzhető, ha a dUTP/dTTP (2'-deoxiuridin-trifoszfát/2'-dezoxitimidin-trifoszfát) arányt a sejt a DNS szintézis helyszínén alacsonyan tarja (ez normálisan 0,1-3 % humán sejtvonalakban), és így lecsökken annak a valószínűsége, hogy a DNS polimeráz véletlenszerűen timin helyett uracilt építsen be [2, 3]. Amennyiben a hiba már létrejött – akár timin helyettesítő beépülés, akár citozin dezamináció révén - akkor a bázis kivágó javítás (BER) feladata a hiba specifikus felismerése és annak eltávolítása. A DNS-beli uracil felismerését és eltávolítását az uracil-DNS

glikozilázok végzik. Ezen glikozilázok közül is kiemelt jelentősége van az UNG enzimnek.

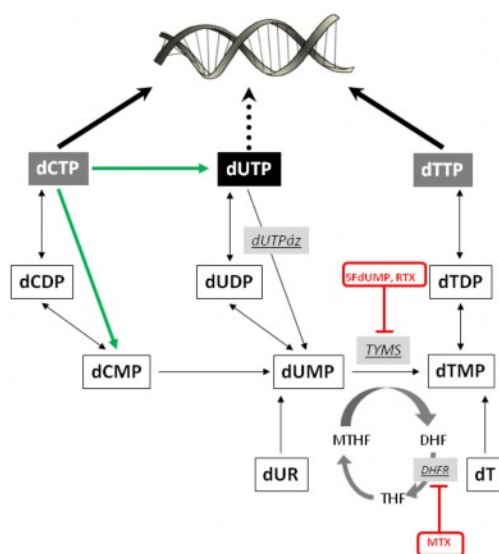
Azonban uracil fiziológias körülmények között is megjelenhet a DNS-ben. Erre példa a *Bacillus subtilis* PBS1 és PBS2 fágja és a *Yersinia enterocolitica* Φ R1-37 bakteriofágja [4, 5]. Ezen fágok genomja olyan DNS, amelyben a timinek több mint 99 %-a uracilra cserélődött. Yan és munkatársai azt is kimutatták, hogy az integrálódott HIV vírusról keletkezett DNS is rendkívül uracil gazdag [6]. Mivel a modern genom szekvenáló módszerek olyan DNS polimerázok működésén alapszanak, amelyek nem képesek megkülönböztetni a timint az uraciltól, így előfordulhat, hogy további esetekben is a genom jelentős mennyiségű uracilt tartalmazhat.

A DNS-beli uracil normál intermedier a szerzett immunitásban a humán B sejtekben. A B limfocitákban a másodlagos antigén érés során az antigénhez való affinitást növelő szomatikus hipermutációban és az osztályváltó rekombinációban nagy szerepe van az aktiválás indukált citozin dezamináz (AID) kifejezésének. Az AID citozinból uracilt létrehozva U:G hamis párokat generál az Ig lokuszban [7, 8]. Továbbá, kutatócsoportunkban azt is kimutatták, hogy az ungs gént nem kódoló *ecetmuslica* lárva, báb és imágó szintén megemelkedett genomi uracil szinttel rendelkezik (200-2000 uracil/millió bázis) [9].

A fentebb leírt néhány élettani eset kivételével azonban elmondható, hogy a normál DNS hibajavító készlettel rendelkező vagy nem kezelt sejtekben a genomi uracil szint alacsony érték.

Az irodalomban leírták, hogy a *de novo* timidilát bioszintézist akadályozó kemoterapiás szerek jelentősen megemelhetik a genom uracil tartalmát [10]. Mivel a dTMP egyetlen *de novo*, vagyis nem a felvett dezoxitimidint használó, képződési útvonala a dUMP-ből történő szintézis (1. ábra), így a timidilát szintáz valamint az 5,10-metiléntetrahydrofolátot (a timidilát szintáz kofaktora)

regeneráló ciklus ideális gyógyszer célpontok, ugyanis a timidilát szintáz gátlása az egyik módja annak, hogy eltolódhasson a dUTP/dTTP egyensúly. A fluoropirimidinek (5-fluorouracil, 5-fluorodezoxiuridin (5FdUR)) voltak az első timidilát szintáz gátlók, amelyek klinikailag hatásosak voltak [10, 11]. Az antifolátok közé tartozik a raltitrexed (RTX) és a pemetrexed. A timidilát szintáz mellett kisebb mértékben a dihidrofolát reduktázt is gátolják. A metotrexát (MTX) a dihidrofolát reduktáz inhibitora [13].



1. ábra. dUTP és dTTP szintézisben közreműködő útvonalak az emberben, az ecetmuslicában és az *Escherichia coli*-ban. A de novo timidilát szintézis útvonalakat vázolja fel az ábra. A zöld nyíl azon útvonalakat jelöli, amelyek csak az *E. coli*-ban fordulnak elő. Az útvonal inhibitorai pirossal jelöltek. TYMS: timidilát szintáz, DHF: dihidrofolát, DHFR: dihidrofolát reduktáz, THF: tetrahidrofolát, MTHF: 5,10-metiléntetrahidrofolát, MTX: metotrexát, RTX: raltitrexed.

Ahogy az az előbbieken szerepelt, a biológia számos területén van nagy jelentősége az uracil genomi előfordulásának. Így kiemelten fontos egy megbízható, gyors, olcsó és egyszerű módszer létrehozása, amely képes meghatározni a genomi uracil mennyiségét *in vitro* és *in situ* kísérletekben. A szakirodalomban ismert már néhány uracil kvantifikáló módszer, amelyeknek különböző az érzékenysége, specifitása és költsége. Habár az LC/MS/MS alapú módszerek rendkívül érzékenyek (akár 5 fmol uracilt is képesek kimutatni), de drága készüléket, kiterjedt minta előkészítést (nukleotid vagy uracil hidrolízis) és speciális szaktudást igényelnek [14]. Az aldehid reaktív próba (ARP) esszé

UNG által létrehozott bázismentes (AP) helyeket mér kémiai módosítás során, amely szintén több lépéses minta előkészítést igényel [15]. Egy kvantitatív qPCR alapú módszer relatív mennyiségi meghatározásra alkalmas [10]. Alapja az archea *Pyrococcus furiosus* DNS polimeráz dezaminált bázis-kötő zsebe: amenynyiben genomi uracillal találkozik, ott megáll, és nem halad tovább. A módszer hátránya, hogy referencia templáthoz képesti relatív uracil értéket ad, illetve, hogy a kiválasztott szekvencia jól kell, hogy reprezentálja az organizmus teljes genomját.

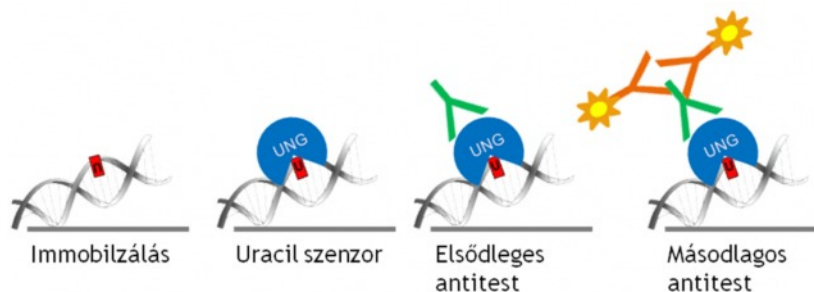
Az eddig leírt genomi uracil detektáló módszerek zöme tehát a folyamat során kihalítja az uracilt a DNS-ből, és nem ad lehetőséget *in situ* sejtes detektálásra. Érdekes módon, számos nem-ortodox DNS bázis kimutatására (pl. 5-metilcitozin, 5-hidroximetilcitozin, 5-hidroximetiluracil, timin dimerek, 8-oxo-guanin, 8-nitroguanin) alkalmaznak olyan módszert, ahol egy antitest szenzort használnak [16-21]. Eddig ilyen módszert a genomban található uracilokra nem írtak le.

A katalitikusan inaktív UNG uracil szenzor fehérje validálása

A vad típusú humán UNG2 uracil-DNS glikoziláz egy kiemelten specifikus uracil-kötő zsebbel rendelkezik, amely specifikus uracil lehasítást tesz lehetővé a DNS cukor-foszfát gerincéről. A természetes DNS bázis citozin és timin irányában mutatott aktivitása pedig elhanyagolható. A katalitikusan inaktív dupla mutáns (D145N, H268N) humán UNG2 is a vad típusú (wt UNG2) enzimhez hasonlóan specifikusan és erősen kötődik a genomi uracilhoz [22]. Így mi ezt a dupla pontmutáns enzimet szerettük volna olyan uracil szenzorként alkalmazni, amely erősen köti az uracil bázist, de nem hasítja le azt a DNS cukorfoszfát gerincéről [23]. A létrehozott szenzorokat *in vitro* az alábbi szempontok szerint validáltuk: (i) a szenzor specifikusan felismeri-e a genomi uracilt? (ii) katalitikusan inaktív-e? (iii) képes-e érzékeny és genomi uracil mennyiséggel arányos detektálásra széles tartományban? A módszert szerettük volna különböző organizmusok

genomi DNS-én is validálni. Meg akartuk vizsgálni az UNG funkció hiány és timidilát szintáz gátló szerek hatását a genomi uracil tartalomra.

Ahhoz, hogy a fent leírt uracil szenzor még uracil specifikusabb lehessen, eltávolítottuk az N-terminális, PCNA és RPA fehérje kötő 84 aminosavat a humán UNG-ról. Ennek az *in situ* vizsgálatoknál volt kiemelt jelentősége. A létrejött konstrukciókat Δ UNG-nak nevezem. A létrehozott módszer ELISA-szerű, ahol a DNS-t pöttyökben immobilizáljuk nitrocellulóz membránra (dot-blot), majd Flag fúziós címkét tartalmazó Δ UNG uracil szenzorral jelöljük meg, és antitesteket alkalmazunk a detektáláshoz. A módszert sematikusán a 2. ábra mutatja.



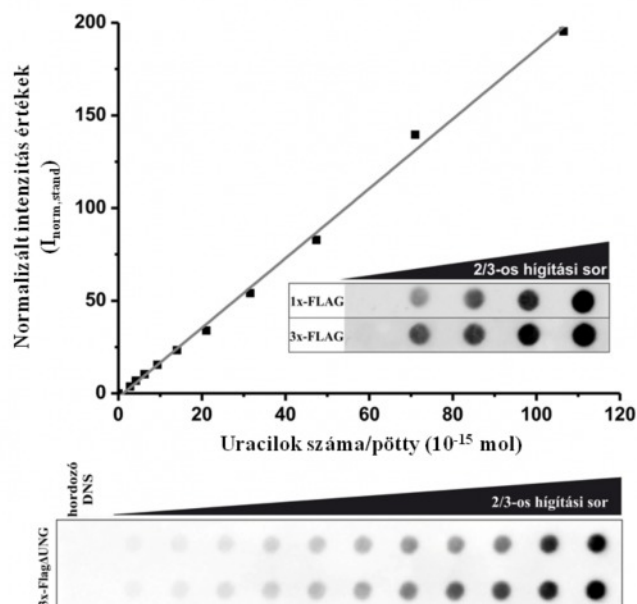
2. ábra. Az általunk kidolgozott érzékeny uracil-jelölő módszer sémája.

Enzim aktivitás esszével igazoltuk, hogy a létrehozott Δ UNG konstrukciók katalitikusan inaktívak: csak a wt UNG volt képes egy magas uracil tartalmú DNS elemésztésére AP-endonukleáz kezelés mellett, míg a többi konstrukció nem rendelkezett mérhető uracil kivágó aktivitással. Elektromobilitás eltolódás esszével mutattuk ki, hogy a konstrukciók nagyobb mértékben kötődnek a magas uracil tartalmú DNS-hez, mint a „normális”-hoz.

Egy dot-blot alapú kvantitatív esszé kidolgozása a genomi uracil *in vitro* kimutatására

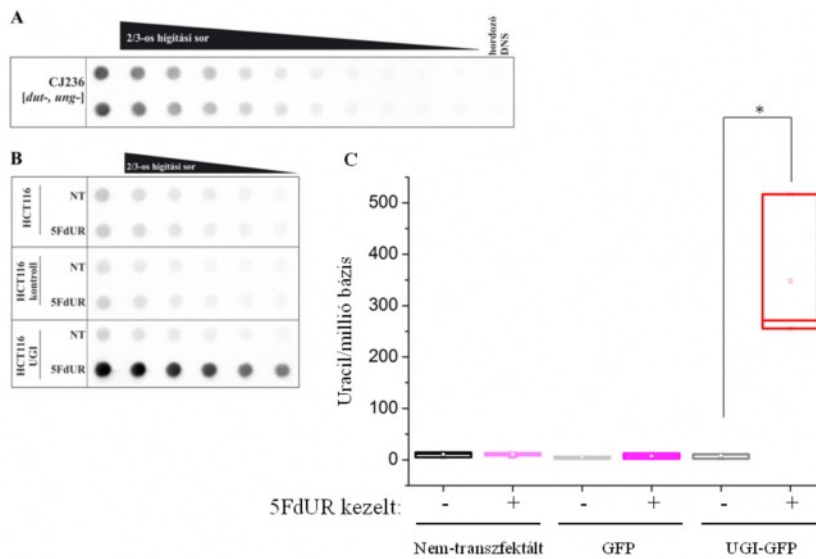
A különböző konstrukciók tesztelésénél 1x- vagy 3x-FLAG fúziós címkét hordozó Δ UNG-ot használtam, és a már ismert genomi uracil tartalmú, a dUTPáz és ung-ot nem kódoló CJ236 [dut-, ung-] *E. coli* sejtekből izolált genomi DNS-en, mint standard mintákon alkalmaztam. A 3. ábra azt mutatja, hogy a 3x-FLAG címkét hordozó Δ UNG szenzor (3x-FLAG) valamennyivel érzékenyebb a dot-blot

esszé során, mint az 1x-FLAG- Δ UNG (1x-FLAG). Emiatt a 3x-FLAG-es konstrukciót alkalmaztam a további kísérletek során.



3. ábra. Standard hígítási sor a genomi uracil szintek *in vitro* mennyiségi meghatározására. A kvantifikálás során a log fázisú CJ236 [*dut*⁻, *ung*⁻] *Escherichia coli* törzsből izolált genomi DNS-t használtam jól-definiált uracil tartalmú standardként. Az ábrázolt normalizált kalibrációs görbe egy reprezentatív mérést mutat. A kalibrációs egyenes melletti kis ábrán az látható a négy pontból álló kétharmados hígítási sorok felhasználásával, hogy a 3x-FLAG- Δ UNG azonos körülmények mellett valamivel érzékenyebb, mint az 1x-FLAG- Δ UNG konstrukció.

Az is látható, hogy lineáris összefüggés is elérhető egy hígítási sorral széles dinamikus tartományon. Minden kísérlet elvégzésekor alkalmaztam standard hígítási sort, amely nagymértékben reprodukálható volt, így erős alapul szolgált a vizsgálataink során. A módszert többféle organizmuson teszteltem, úgy, mint az XL1Blue és a BL21(DE3) vad típusú és a BL21(DE3) *ung-151* *E. coli* sejtvonalakon, valamint eukarióta S2 (*Drosophila melanogaster*) és a HCT116 (humán) sejtvonalakon.

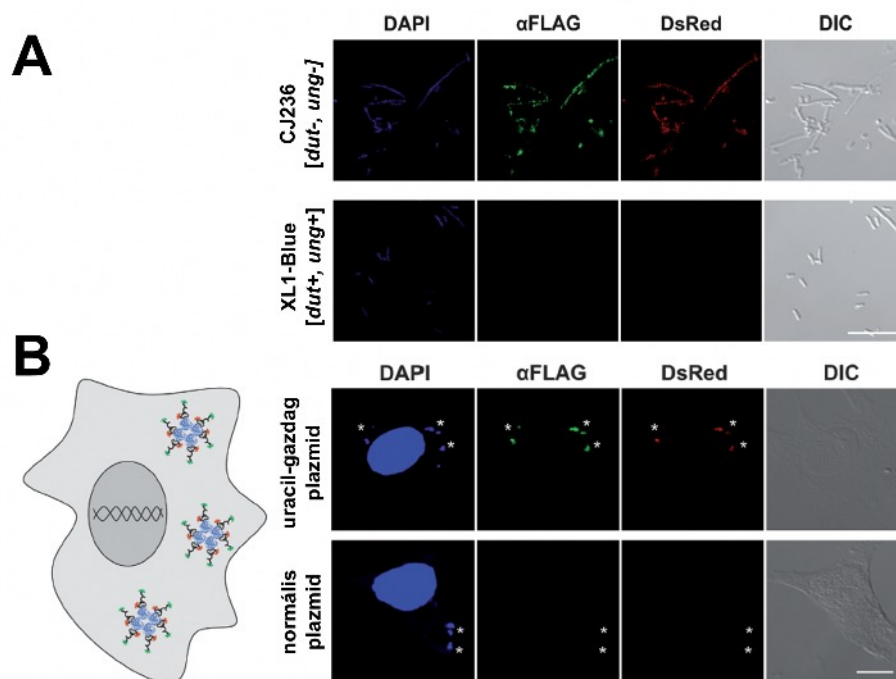


4. ábra. Dot-blot esszé, amely a de novo timidilát bioszintézis útvonal inhibitorokkal való kezelés és az UNG gátlás hatását vizsgálja a HCT116 sejtek genomi uracil szintjének meghatározásával. (A) CJ236 [dut-, ung-] *E. coli* genomi DNS volt a dot-blot esszé standardja. (B) Az 5FduR-nal kezelt és nem kezelt HCT116 sejtek genomi uracil szintjét UGI-val történő UNG inhibíció során vizsgáltam. (C) Az oszlop diagram a millió bázisonként előforduló uracil mennyiségét (átlag ± standard hiba) mutatja az egyes mintákra. Az 5FduR kezelés csak azon sejtekben okoz szignifikánsan megemelkedett DNS-beli uracil szintet a nem kezelt sejtekhez képest, amelyek UGI-t is expresszálnak (* : $p < 0,05$).

Ezen sejtvonalakon többféle *de novo* timidilát szintézist gátló gyógyszer (5-fluoro-2'-dezoxiuridin, metotrexát, raltitrexed) hatását is vizsgáltam (1. ábra) vad típusú és működő UNG-gal nem rendelkező sejtvonalakon. Azt tapasztaltam, hogy ung génnel nem rendelkező (ecetmuslica S2 sejtvonal és ung- *E. coli*) illetve UNG gátolt (UGI nevű specifikus UNG inhibitorral transzfektált) sejtvonalak esetében külön-külön az ung funkció hiánya, vagy a *de novo* timidilát szintézis gátlás nem rendelkezett szignifikáns hatással a genomi uracil tartalomra, azonban együttesen szinergikus hatást hordoztak (4. ábra). A DNS-beli uracil szint szignifikánsan, egyes esetekben nagyságrendileg is megnőtt. Például a HCT116 humán sejtvonal esetében az UGI transzfektációt követő 5FduR kezelés szignifikánsan, kb. 40-szeresére megemelte a genomi uracil szintet ($347,87 \pm 84,62$ uracil/millió bázis) a nem kezelt sejtekhez ($7,82 \pm 2,82$ uracil/millió bázis) képest.

A katalitikusan inaktív UNG konstrukciók alkalmazása a DNS-beli uracil *in situ* kimutatására

Kísérleteink során sikerült először a rendkívül uracil gazdag (6580 uracil/millió bázis) *E. coli* CJ236 [*dut-*, *ung-*] törzs genomi DNS-ét immuncitokémiával vizualizálni a Flag- és DsRed-fúziós címkét tartalmazó Δ UNG uracil szenzorunk felhasználásával [22]. A Flag-címke segítségével könnyen detektálható az uracilos DNS festődése, amely, mint ahogy várható, kolokalizál a DNS-t jelölő DAPI jellel (5.A ábra).



5. ábra. A genomi uracil *in situ* detektálása. (A) CJ236 [*dut-*, *ung-*] *E. coli* genomi DNS-t vizualizáltunk Flag- Δ UNG-DsRed konstrukcióval. Negatív kontrollként, megegyező folyamat során, XL1-Blue *E. coli* [*dut+*, *ung+*] sejteket használtunk. Csak a CJ236 [*dut-*, *ung-*] *E. coli* minta mutatott festődést, közvetlenül DsRed (piros) vagy Flag epitóp (zöld) címke használatával. DAPI-t használtunk a DNS megjelölésére. (B) A Flag- Δ UNG-DsRed konstrukcióval vizualizált citoplazmás plazmid aggregátumok sematikus ábrája látható a bal oldalon. A csillagok plazmid aggregátumokat jelölnek. Csak az uracil-gazdag plazmiddal transzfektált [*ung -/-*] eger embrionális fibroblaszt sejtek látszódnak a DsRed (piros) címke és a Flag (zöld) epitóp címke segítségével. A DAPI festés túltelített, hogy a halvány DAPI-pozitív plazmid aggregátumok is láthatóvá váljanak. A skála mindkét panelen 10 μ m-t jelöl. Mindkét panelen a jobb szélső ábra a differenciál interferencia kontraszt (DIC) képeket mutatja.

A DsRed címke pedig közvetlen vizualizációra is alkalmas. A vad típusú XL1-Blue *E. coli* nem adott jelet, amely bizonyítja, hogy a festődés genomi uracilra specifikus. Következőekben szerettük volna a genomi uracil festődését emlős

sejtes háttéren is demonstrálni, így [*ung -/-*] egér embrionális fibroblaszt sejteket transzfektáltunk vad típusú, vagy [*dut-, ung-*] *E. coliban* termelt plazmid DNS-sel. Egy ismert artefakt jelenséget használtunk ki: a plazmid transzfekeció során a plazmid aggregátumok jelennek meg a sejtek citoplazmájában. Az 5. ábra B paneljén látható az, hogy az uracil-gazdag DNS-sel történő transzfekeció során DAPI-val kolokalizáló festődés tapasztalható (csillagokkal jelölve) az uracil-szenzort alkalmazva. Negatív kontrollként normál plazmiddal transzfektált sejteket alkalmaztunk, amelyek semmilyen festődést nem mutattak.

Kutatócsoportunkban további sikeres kísérleteket végeztek emlős sejtek genomi uracil tartalmának *in situ* vizualizálására. Ezen eredmények egy új kézirat tárgyát képezik.

Eredményeinket összefoglalva kijelenthetjük, hogy sikerült egy *in situ* mérésekre is alkalmas jelzőrendszert létrehozunk a genomi uracil kimutatására. Ehhez a módszerhez az evolúció során létrejött specifikus UNG szenzor fehérjét használtuk. Módszerünk a továbbiakban arra is alkalmas lehet, hogy akár ChIP szekvenálás, akár szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével a DNS-beli uracil eloszlási mintázatát is meghatározzuk.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat az NKFIH (OTKA) K119493109486, a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány és a Pro Progressio alapítvány támogatta.

Irodalomjegyzék

- [1] Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362 (6422)**: 709–15.
- [2] Vértessy, B. G., Tóth, J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res.* **42(1)**: 97-106.
- [3] Zhang, W., Tan, S., Panitsil, E., Dutschman, G.E., Gullen, E.A., Chu, E., Cheng, Y.C. (2011) Analysis of deoxyribonucleotide pools in human cancer cell lines using a liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry technique. *Biochem. Pharmacol.*, **82 (4)**: 411–7.

- [4] Takahashi, I. Marmur, J. (1963) Replacement of thymidylic acid by deoxyuridylic acid in the deoxyribonucleic acid of a transducing phage for *Bacillus subtilis*. *Nature*, **197**: 794–5.
- [5] Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., Gador, A., Lönberg, H., Skurnik, M. (2005) Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology*, **151**: 4093–102.
- [6] Yan, N., O'Day, E., Wheeler, L. A., Engelman, A., Lieberman, J. (2011) HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 9244–9.
- [7] Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H. E. (2007) Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)*, **6**: 505–16.
- [8] Chen, Z., Eder, M. D., M. T. Elos, S. S. Viboolsittiseri, X. Chen, and J. H. Wang, (2016) Interplay between Target Sequences and Repair Pathways Determines Distinct Outcomes of AID-Initiated Lesions. *J Immunol*, **196**: 2335–47.
- [9] Muha, V., Horváth, A., Pukáncsik, M., Hodoscsek, B., Merényi, G., Róna, G., Batki, J., Kiss, I., Jankovics, F., Vilmos, P., Erdélyi, M., Vértessy, B. G. (2012) Uracil-containing DNA in *Drosophila*: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet*, **8**: p. e1002738.
- [10] Horváth, A., Vértessy, B. G. (2010) A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, **38**: p. e196.
- [11] Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., Scheiner, J. (1957) Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, **179**: 663–6.
- [12] Blackledge, G. (1998) New developments in cancer treatment with the novel thymidylate synthase inhibitor raltitrexed ('Tomudex'). *Br J Cancer*, **77**: 29–37.
- [13] Rajagopalan, P.T.R., Zhang, Z., McCourt, L., Dwyer, M., Benkovic, S. J., Hammes, G. G. (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 13481–6.
- [14] Galashevskaya, A., Sarno, A., Vågbo, C. B., Aas, P. A., Slupphaug, G., Krokan, H. E. (2013) A robust, sensitive assay for genomic uracil determination by LC/MS/MS reveals lower levels than previously reported. *DNA Repair (Amst)*, **12**: 699–706.
- [15] Lari, S.-U., Chen, C.-Y., Vértessy, B. G., Morr e, J., Bennett, S. E., (2006) Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst)*, **5**: 1407–20.
- [16] Wu, D., Chen, L., Sun, Q., Wu, X., Jia, S., Meng, A. (2014) Uracil-DNA glycosylase is involved in DNA demethylation and required for embryonic development in the zebrafish embryo. *J Biol Chem*, **289**: 15463–73.

- [17] Ladopoulos, V., Hofemeister, H., Hoogenkamp, M., Riggs, A. D., Stewart, A. F., Bonifer, C. (2013) The histone methyltransferase KMT2B is required for RNA polymerase II association and protection from DNA methylation at the MagohB CpG island promoter. *Mol Cell Biol*, **33**: 1383–93.
- [18] Cliffe, L. J., Hirsch, G., Wang, J., Ekanayake, D., Bullard, W., Hu, M., Wang, Y., Sabatini, R. (2012) JBP1 and JBP2 proteins are Fe²⁺/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases regulating hydroxylation of thymidine residues in trypanosome DNA. *J Biol Chem*, **287**: 19886–95.
- [19] Moriel-Carretero, M., Aguilera, A. (2010) A postincision-deficient TFIIH causes replication fork breakage and uncovers alternative Rad51- or Pol32-mediated restart mechanisms. *Mol Cell*, **37**: 690–701.
- [20] Soultanakis, R. P., Melamed, R. J., Bessalov, I. A., Wallace, S. S., Beckman, K. B., Ames, B. N., Taatjes, D. J., Janssen-Heininger, Y. M. (2000) Fluorescence detection of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNA of cultured cells using a recombinant Fab and confocal scanning laser microscopy. *Free Radic Biol Med*, **28**: 987–98.
- [21] Terasaki, Y., Akuta, T., Terasaki, M., Sawa, T., Mori, T., Okamoto, T., Ozaki, M., Takeya, M., Akaike, T. (2006) Guanine nitration in idiopathic pulmonary fibrosis and its implication for carcinogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*, **174**: 665–73.
- [22] Krusong, K., Carpenter, E. P., Bellamy, S. R. W., Savva, R., Baldwin, G. S. (2005) A Comparative Study of Uracil-DNA Glycosylases from Human and Herpes Simplex Virus Type 1. *J Biol Chem*, **281**: 4983–4992.
- [23] Róna, G., Scheer, I., Nagy, K., Pálinkás, H. L., Tihanyi, G., Borsos, M., Békési, A., Vértessy, B. G. (2016) Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Res*, **44**: e28.



Scheer Ildikó kutatásait 2009-ben kezdte meg TDK hallgatóként Vértessy G. Beáta laboratóriumában az MTA TTK Enzimológiai Intézetében. Itt megismerkedett számos *in vitro* fehérje kölcsönhatás vizsgálati módszerrel. 2012-ben a BME Vegyész és Biomérnöki karán M.Sc. diplomát szerzett. Utána az MTA TTK Enzimológiai Intézetében Vértessy G. Beáta kutatócsoportjában kezdte meg doktori munkáját.



Róna Gergely az ELTE TTK-n végzett biológus szakon. Már 2004-ben, a gimnáziumi évei alatt megkezdte munkáját Dr. Friedrich Péter laboratóriumában az MTA Enzimológiai Intézetében, ahol a kalpain proteáz család működésével foglalkozott. Doktori munkáját 2010-ben kezdte meg Dr. Vértessy Beáta laboratóriumában, szintúgy az MTA Enzimológiai Intézetében. Itt ismerkedett meg számos DNS hibajavításban elengedhetetlen fehérjével és azok működésével. Munkája során többek között ezen fehérjék

intracelluláris lokalizációjával foglalkozott, illetve azzal, hogyan lehet ezeket a fehérjéket felhasználni specifikus DNS károsodások kimutatására.



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 vizsgálnak. 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 elismerésben, díjban részesült. Vértessy Beáta a Fulbright Hungary kuratórium és a FEBS Advance Course Committee elnöke.

Bányai, L., Váradí, A., Patthy, L. (1983)
*Common evolutionary origin of the
fibrin-binding structures of fibronectin and
tissue plasminogen activator. FEBS Letters,*
163: 37-41. (Letöltés itt)

Patthy, L. (1987) *Intron-dependent evolution:
preferred types of exons and introns. FEBS Letters,*
214: 1-7. (Letöltés itt)

MODULÁRIS FEHÉRJE EVOLÚCIÓ ÉS EXON-SHUFFLING

Bevezetés

A FEBS 50. évfordulója alkalmából megjelent egy virtuális kiadvány (<http://www.febs.org/our-publications/febs-50th-anniversary-virtual-issues/>), melyben a tagországok bemutatják a FEBS Journalban (korábban European Journal of Biochemistry) és a FEBS Letters-ben megjelent legjelentősebb, legnagyobb visszhangot kiváltó közleményeiket. A magyar kötetben (<http://www.febs.org/our-publications/febs-50th-anniversary-virtual-issues/hungary/>) egy válogatás jelent meg a legtöbb idézetet kapott, az összeállítók által legfontosabbnak, legrepresentatívabbnak, legelőremutatóbbnak tartott magyar cikkekből.

Szűcs Mária, a Biokémia internetes folyóirat főszerkesztője hívta fel a figyelmet arra, hogy ezek között a cikkek között szerepel két FEBS Letters közleményem [1, 2], melyeket az összeállítás készítői úttörő jelentőségűnek minősítettek („pioneering work leading to definition of the ‘domain’ concept and the exon shuffling theory”). Egyúttal a főszerkesztő felkért arra, hogy írjak az ezekben a cikkekben leírt felfedezések előzményeiről, utóéletéről, valamint arról, hogy mit gondolok a siker, a magas idézettség kulcstényezőjének.

Feladatomban megkönnyíti az, hogy 2013-ban a Biokémia főszerkesztője kérésére már részletesen írtam kutatói pályámról [3] és abban az írásban említést teszek ezekről a közleményekről is. Minthogy a két cikkben leírt felfedezések előzményei és utóéletük összefonódik, írásomat nem bontom két független részre.

A két FEBS Letters cikkben leírt felfedezés előzményei, utóéletük és magas idézettségük kulcstényezői

A hetvenes évek közepéig a tumorok áttétképzésének molekuláris szintű megértése még fehér területnek számított, ezért nagy feltűnést keltettek azok a vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy egy sejtfelszíni fehérje (Large External Transformation Sensitive Protein) fibrinolitikus proteázok aktivitása következtében eltűnik a transzformált sejtek felszínéről. Kirajzolódott az a felismerés, hogy a metasztázis során (amikor a tumorsejtek szövethatárokon, sejten kívüli állományon hatolnak keresztül) fehérjebontó enzimek vágnak utat a tumorsejtek számára és ebben a folyamatban fontos szerepet játszik a plazmin, amely a tumorsejtek által termelt plazminogén aktivátor hatására keletkezik a plazminogénből. A fibrinolitikus rendszernek a malignus transzformációban, tumor metasztázisban játszott szerepe alapján ezért remélhető volt, hogy sikerül olyan terápiás eljárásokat kidolgozni, melyekkel gátolni lehet a metasztázist.

Ezeknek a felfedezéseknek a hatására döntöttem úgy 1977-ben, hogy kísérleti objektumként az akkor még ismeretlen elsődleges szerkezetű fibrinolitikus proteázok (plazminogén, urokináz- és szöveti típusú plazminogén aktivátor) és az időközben fibronectin-re átkeresztelt LETS fehérje szerkezet-funkció összefüggéseit tanulmányozom. Az új kutatási téma fontossága más okból is nyilvánvaló volt. A plazminogén aktivátorok és a plazmin felelős ugyanis a véralvadás során képződő fibrin-alvadék feloldásáért, a fibrinolízisért és működésük zavarai vezetnek vérrögzépződéshez, trombózis, infarktus kialakulásához. Plauzibilisnek tűnt, hogy a fibrinolitikus rendszer különböző komponensei felhasználhatóak a véralvadás bizonyos rendellenességeinek (trombózis, infarktus, stroke) kezelésére.

Kutatási terveim megvalósítását elősegítette, hogy az Enzimológiai Intézet szomszédságában lévő Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézettől nagy mennyiségben be lehetett szerezni a plazminogén, fibrinogén és fibronectin-

tin izolálásához szükséges emberi plazmát. Lényegesen könnyítette a munkánkat az is, hogy időközben egyre több információ látott napvilágot a vizsgált plazma fehérjék aminosavszekvenciájára vonatkozóan – elsősorban Staffan Magnusson (Aarhus University, Dánia) csoportjának köszönhetően. Ezekből a szekvenciákból világossá vált, hogy mind a plazminogén, mind a fibronectin ismétlődő egységeket tartalmaz: a plazminogén-ben található öt ismétlődő egységet – a dán perechez való hasonlósága alapján – kringle-nek, a fibronectin-ben található háromféle ismétlődő egységet I-es, II-es és III-as típusú fibronectin-doménnek nevezte el Magnusson. A plazminogén és fibronectin doménszerkezetének ismeretében lehetségessé vált kisebb (egy vagy több domént tartalmazó) fragmentek proteolízissel történő előállítására és azoknak a nagyméretű fehérje egészétől független vizsgálata.

Mindezeknek a kedvező körülményeknek köszönhetően viszonylag hamar jelentős, nemzetközi visszhangot kiváltó eredményeket értünk el a plazminogén szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálata területén: azonosítottuk az egyes kringle-doméneken található kötőhelyeket, melyek a plazminogén és fehérjepartnerei közötti specifikus kötést biztosítják és a plazminogén konformációváltozásait és aktiválását szabályozzák [4-9].

A plazminogéneken végzett munkánk során az is világossá vált, hogy a kringle domének nagyfokú szerkezeti és funkcionális autonómiával rendelkeznek: a molekula feldarabolása után az izolált kringle domének megőrzik a plazminogén egy-egy rész-funkcióját: mintegy önálló életre képesek [10, 11]. Felmerült a gyanú, hogy ezek a kis fehérje-részek valamikor önálló molekulák lehettek és a plazminogén valójában ilyen független elemek összekapcsolódásával keletkezett. Formálódni kezdett az a hipotézis, hogy a véralvadási és fibrinolitikus rendszer különböző enzimeinek eltérő doménszerkezete is azzal magyarázható, hogy az evolúció során más és más építőelemek, „modulok” más és más kombinációban kapcsolódtak össze.

1982-ben csoportunk szerkezet-funkció vizsgálati módszerei egy lényeges új megközelítéssel bővültek: RJP Williams professzor (Oxford University) keresett meg azzal, hogy szívesen együttműködne a plazminogén kringle-doménjeinek NMR spektroszkópiai szerkezetvizsgálatában [12]. A kringle-típusú domének NMR spektroszkópiai vizsgálatába 1984-től a Miguel Llinás által vezetett NMR spektroszkópiai csoport (Carnegie Mellon University) is bekapcsolódott [13, 14].

A kringle-domének első NMR szerkezetvizsgálatai egy lényeges összefüggés felismerésére vezettek: a kringle doménekre jellemző térszerkezet fenntartásában kulcsszerepet játszó aminosavak valamennyi kringle-ben konzerválódnak. Ebből levonhattuk azt a (későbbi bioinformatikai munkánk szempontjából fontos) következtetést, hogy egy-egy térszerkezet típusra vonal-kódként jellemző a konzervatív aminosav pozíciók mintázata, lehetővé téve távoli rokonok esetén is annak eldöntését, hogy egy adott aminosavszekvencia mutatja-e vagy sem az adott térszerkezetre jellemző mintázatot, vagyis az adott térszerkezet-családba tartozik-e vagy sem.

Mint említettem, a kringle-domének nagyfokú autonómiája alapján feltételeztem, hogy a véralvadási és fibrinolitikus rendszer különböző enzimeinek eltérő domén-szerkezete azzal magyarázható, hogy az evolúció során más és más domének kapcsolódtak össze. Ennek a – később moduláris fehérje evolúció néven összefoglalt – hipotézisnek a tesztelésére kitűnő alkalom nyílt 1983-ban, amikor egy, a San Francisco-i Genentech köré szerveződött kutatócsoport meghatározta a szöveti plazminogén aktivátor aminosavsorrendjét. Bár a szekvencia hasonlóság alapján a közlemény szerzői felismerték a szöveti aktivátor két kringle doménjét és tripszin-szerű proteáz doménjét, a szekvencia egy jelentős részének rokonsági viszonyai tisztázatlanok maradtak.

A moduláris fehérje evolúcióra vonatkozó (formálódó) hipotézis értelmében tehát a kérdést így lehetett feltenni: honnét származik, mivel mutat rokonságot a szöveti plazminogén aktivátor ismeretlen térszerkezetű része. A kérdés meg-

válaszolását ismét csak a kringle doméneken szerzett tapasztalatok segítették. Ennek alapján úgy lehetett a kérdést átfogalmazni: mutat-e az ismeretlen térszerkezetű rész olyan szekvencia mintázatot, mely jellemző valamely ismert domén típusra.

Ezzel a szemmel vizsgálva a szöveti aktivátor szekvenciáját arra az eredményre jutottam, hogy a szöveti plazminogén aktivátor aminosavsorrendjének ismeretlen eredetű részlete kielégíti a fibronektin I-es típusú doménjére jellemző konzervatív aminosav mintázatot. Nyilvánvaló, hogy a felismerésben nagy szerephez jutott a szerencse, hiszen ekkor még nem állt rendelkezésre a mintázat felismerésére alkalmas számítógépes keresési program vagy éppen a doméncsaládokra jellemző szekvencia mintázatok teljeskörű számítógépes gyűjteménye, mely lehetővé tette volna a homológiai viszonyok szisztematikus, számítógépes tisztázását. A szerencse az volt, hogy egyidejűleg folytattunk kutatásokat a fibrinolitikus proteázokon és a fibronektinen, így egyidejűleg rendelkezésünkre álltak a fibronektin különböző doméntípusaira jellemző szekvenciamintázatok is.

A szerencsének köszönhető felfedezés lényege tehát az volt, hogy egy fibrinolitikus proteáz, a szöveti plazminogén aktivátor egyik doménje rokon egy nem-enzimatisztruktúrális fehérje, a fibronektin egyik domén-típusával, vagyis a két multidomén (sok doménből álló) fehérje rokonsága egyetlen doménre korlátozódik [1].

A felfedezés a moduláris fehérjeevolúció hipotézis első, látványos bizonyítékát szolgáltatva, ugyanakkor azt is igazolta, hogy a konzervatív aminosavak mintázata alkalmas távoli rokonságok, homológiák kimutatására. A várakozásnak megfelelően: eredményünk nagy feltűnést keltett és jelentős visszhangot kapott. Némi tanulsággal szolgálhat azonban eredményünk publikálásának története is. Nem volt kétségem eredményünk érdekességét, jelentőségét, várható visszhangját illetően, ezért a cikket a Nature-be küldtük be. Máig őrzöm

a választ: „*it is our policy to send back, without review, those papers which, like yours, do not seem to us to be of sufficient interest to demand publication in Nature....*” Hogy időt ne veszítsünk, hogy felfedezésünk prioritását ne kockáztassuk, a cikket a FEBS Letters-be küldtük be, ahol – úgy látszik – jobban megértették a felfedezés jelentőségét. Hogy milyen tanulságokat vontam le ebből (és későbbi, hasonló tapasztalataimból)? Talán azt, hogy lényegesen fontosabb a közlés maga (akár egy kisebb presztízsű folyóiratban), mint a közlés helye.

Tisztában lévén a moduláris fehérjeevolúció felismerésének jelentőségével, igyekeztem megfelelő PR tevékenységgel is népszerűsíteni azt. Ennek a szándéknak kedvezett, hogy 1984-ben Straub F. Brunó segítségével lehetőséget kaptam arra, hogy egy UNESCO workshop-ot szervezzek Budapesten. A workshop témájaként a „Multidomain Proteins”-t adtam meg (tudomásom szerint ez volt az első tudományos értekezés ebben a témakörben) és meghívó leveleket küldtem a terület legnevesebb művelőinek. Úgy gondolom, hogy a téma időszerűségét és eredményeink elismerését jelezte az, hogy a neves meghívottak (pl. Walter Gilbert, Jürgen Engel, Staffan Magnusson, Rupert Timpl, Joel Janin) elfogadták a meghívást. A moduláris fehérje evolúció elméletnek jelentős publicitást adott az is, hogy annak részletesebb kifejtését tartalmazó cikkemet 1985-ben a nagy tekintélyű Cell közölte [15].

A szöveti plazminogén aktivátor doménszerkezetének tisztázása a szöveti plazminogén aktivátor trombolitikus gyógyszerre fejlesztését célzó kutatásokra is nagy hatással volt: a második generációs plazminogén aktivátorok tervezése az általunk meghatározott doménszerkezet alapján indulhatott meg. Munkánk visszhangját, elismerését jelzi az is, hogy a San Francisco-i Genentech a szöveti plazminogén aktivátor projekt tudományos tanácsadójának kért fel. A „Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator” című FEBS Letters cikket idéző közlemények listájának áttekintése azt jelzi, hogy az eredmény evolúcióbíológiai jelentőségén kívül az

is hozzájárult a magas idézettséghez, hogy a közlés időpontja egybe-esett azzal a periódussal, amikor a plazminogén aktivátor és a fibronektin egyaránt az érdeklődés középpontjában állt.

A szöveti plazminogén aktivátor gyógyszerként történő 1987-es bejegyzését követően érzékelhetővé vált, hogy a fibrinolízis területén végzett felfedező kutatás hőskora végéhez közeledik, a hangsúly az alkalmazott kutatás (pl. a második generációs plazminogén aktivátorok előállítására) felé tolódik el. Nyilvánvaló volt, hogy ezen a téren csoportunk (és a magyar gyógyszeripar) pénzügyi okokból versenyképtelen, ezért esedékessé vált annak eldöntése, hogy a jövőben milyen területeken folytathatunk nemzetközi érdeklődésre méltó kutatást. A kísérleti munkát azonban jelentősen hátráltatta az a körülmény, hogy 1986-ban elkezdődött az Enzimológiai Intézet többéves – kiköltözéssel járó – átépítése, felújítása.

Az elméleti jellegű kutatások kevésbé szenvedték meg az Intézet több évig tartó átépítése miatti nehézségeket (ezeket a kis költség- és helyigényű kutatásokat otthon is folytatni lehetett). A távoli homológiák detektálására a 80-as évek elején kidolgozott bioinformatikai módszer algoritmusát csak ekkor közöltem [16-18]. A módszer rendkívül hasznosnak bizonyult: alkalmazásával számos új doméntípust definiáltunk, számos multidomén fehérje doménszerkezetét, rokonsági viszonyait jellemeztük, ezzel elősegítve különböző multidomén fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek megismerését [21-26].

A távoli homológiák detektálására alkalmas módszer alkalmazásának egy további fontos hozadéka az volt, hogy segítségével feltárhatóvá vált a multidomén fehérjék evolúciós története, bizonyíthatóvá vált a moduláris fehérje evolúció elmélete. Mint említettem, ennek első meggyőző bizonyítékait a véralvadás és fibrinolízis proteázainak vizsgálata szolgáltatta, a szisztematikus számítógépes szekvencia elemzéseink azonban kimutatták, hogy a moduláris evolúció a fehérje evolúció általános elve. Ez az elképzelés már annyira elfogadottá vált,

hogy a fehérjetudománnyal most ismerkedők nem is értik, hogy miért számított ez új gondolatnak a nyolcvanas évek elején.

A multidomén fehérjék doménszerkezetének és génjeik szerkezetének összevetése egy további, lényeges megállapításra vezetett: a multidomén fehérjék (pl. a véralvadási és fibrinolitikus protázok, fibronectin) doménszerkezete visszatükröződik génjeik exon-intron szerkezetében [15], elsőként bizonyítva azt a (Walter Gilbert által 1978-ban megfogalmazott) hipotézist, hogy az exonok cseréje (exon-shuffling) szerepet játszhat új gének más gének darabjaiból történő összeszerelésében.

A bizonyíthatóan exon-shuffling útján keletkezett fehérjéket kódoló gének exon-intron szerkezetének részletesebb vizsgálata néhány alapvető törvényszerűség felismeréséhez vezetett: 1) csak a „szimmetrikus” (a két „végén” azonos fázisú intron által határolt) exon modulok alkalmasak arra, hogy más génekbe beékelődjenek anélkül, hogy a leolvasási keretet eltolnák, 2) csak a spliceoszomális intronok alkalmasak arra, hogy intronikus rekombináció révén elősegítsék az exonok beékelődését más génekbe és ezért 3) a spliceoszomális intronok kialakulásának, elterjedésének és evolúciós változásainak függvényében maga az exon-shuffling is evolált.

Első pillanattól meg voltam győződve e felismerések evolúcióbiológia jelentőségéről, ezért ismét kísérletet tettem, hogy egy nagyobb presztízsű (vizibilitású) folyóiratban jelentsem meg az eredményeket. Ezúttal a Science-re esett a választásom. Itt a (szabvány) válasz hasonló volt, mint korábban a Nature-nél: „...we receive many more papers than we can accept, and most of the work is publishable. We must make decisions based on... novelty and significance...”. Vagyis ennél a folyóiratnál is kiesett a kézirat az előszűrésnél, mert újdonságtartalmát és/vagy jelentőségét nem ítélték megfelelőnek. A cikket most is a FEBS Letters-be küldtem be, ahol – úgy látszik – most is jobban megértették az eredmények jelentőségét [2].

Az 1987-ben megjelent cikk – bár némi késéssel – jelentős visszhangot váltott ki. Hatására a kilencvenes évek során több felkérésre írt cikkben, könyvben fejthettem ki a moduláris fehérje evolúció és az exon-shuffling törvényszerűségeit, evolúciobiológiai jelentőségét [27-33]. A FEBS Letters cikkben leírt felfedezés visszhangját így valójában mindezen közlemények idézettsége együttesen tükrözi. Ez a tapasztalat is megerősít abban, hogy lényegesen fontosabb a közlés maga, mint a közlés helye.

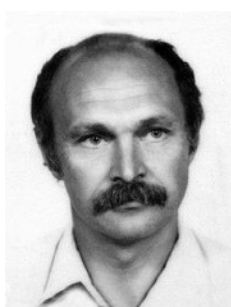
Természetesen megfogalmazódhat az a kérdés, hogy „mi lett volna, ha” az eredményeket nem a FEBS Letters, hanem a Science közli. Valószínűnek tartom, hogy ez csak a felfedezés visszhangjának időbeli eloszlását érintette volna: a moduláris evolúcióra és exon-shufflingra vonatkozó eredményeink hamarabb váltak volna általánosan ismertté és elfogadottá.

Irodalomjegyzék

- [1] Bányai, L., Váradi, A., Patthy, L. (1983) Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters*, **163**: 37-41.
- [2] Patthy, L. (1987) Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Letters*, **214**: 1-7.
- [3] Patthy, L. (2013) In: AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK. Kitüntetések, díjak, Patthy László a Magyar Érdemrend Középkeresztjét kapta. *Biokémia*, **XXXVII/4**: 4-20. <http://www.mbkegy.hu/docs/biokemf/pdf/b201312.pdf>
- [4] Váradi, A., Patthy, L. (1981) Kringle 5 of human plasminogen carries a benzamide-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **103**: 97-102.
- [5] Váli, Z., Patthy, L. (1982) Location of the intermediate and high affinity omega-aminocarboxylic acid-binding sites in human plasminogen. *J Biol Chem*, **257**: 2104-2110.
- [6]. Trexler, M., Váli, Z., Patthy, L. (1982) Structure of the omega-aminocarboxylic acid binding sites of human plasminogen. Arginine 70 and aspartic acid 56 are essential for binding of ligand by kringle 4. *J Biol Chem*, **257**: 7401-7406.
- [7] Bányai, L., Patthy, L. (1984) Importance of intramolecular interactions in the control of the fibrin affinity and activation of human plasminogen. *J Biol Chem*, **259**: 6466-6471.
- [8] Váli, Z., Patthy, L. (1984) The fibrin-binding site of human plasminogen. Arginines 32 and 34 are essential for fibrin affinity of the kringle 1 domain. *J Biol Chem*, **259**: 13690-13694.

- [9] Ramakrishnan, V., Patthy, L., Mangel, F. (1991) Conformation of Lys-plasminogen and the kringle 1-3 fragment of plasminogen analyzed by small-angle neutron scattering. *Biochemistry*, **30**: 3963-3969.
- [10] Trexler, M., Patthy, L. (1983) Folding autonomy of the kringle 4 fragment of human plasminogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**: 2457-2461.
- [11] Patthy, L., Trexler, M., Váli, Z., Bányai, L., Váradi, A. (1984) Kringles: Modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Letters*, **171**: 131-136.
- [12] Trexler, M., Bányai, L., Patthy, L., Pluck, N.D., Williams, R.J.P. (1983) The solution structure of kringle 4. NMR studies on native and several chemically modified kringle 4 species of human plasminogen. *FEBS Letters*, **154**: 311-318.
- [13] Ramesh, V., Gyenes, M., Patthy, L., Llinas, M. (1986) The aromatic ¹H-NMR spectrum of plasminogen kringle 4: a comparative study of human, porcine and bovine homologs. *Eur J Biochem*, **159**: 581-595.
- [14] Petros, A.M., Gyenes, M., Patthy, L., Llinas, M. (1988) Analysis of the aliphatic ¹H-NMR spectrum of plasminogen kringle 4: A comparative study of human, porcine, bovine and chicken homologs. *Eur J Biochem* **170**: 549-563.
- [15] Patthy, L. (1985) Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*, **41**: 657-663.
- [16] Patthy, L. (1987) Detecting homology of distantly related proteins with consensus sequences. *J Mol Biol*, **198**: 567-577.
- [17] Patthy, L. (1988) Detecting distant homologies of mosaic proteins. Analysis of the sequences of thrombomodulin, thrombospondin, complement components C9, C8a and C8b, vitronectin and plasma cell membrane glycoprotein PC-1. *J Mol Biol*, **202**: 689-696.
- [18] Patthy, L. (1996) Consensus Approaches in Detection of Distant Homologies. *Methods Enzymol*, **266**:184-198.
- [19] Patthy, L. (1990) Homology of a domain of the growth hormone/prolactin receptor family with type III modules of fibronectin. *Cell*, **61**: 13-14.
- [20] Behrendt, N., Ploug, M., Patthy, L., Houen, G., Blasi, F., Dano, K. (1991) The ligand-binding domain of the cell-surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, **266**: 7842-7847.
- [21] Patthy, L., Nikolics, K. (1993) Functions of agrin and agrin-related proteins. *Trends Neurosci*, **16**: 76-81.
- [22] Bork, P., Patthy, L. (1995) The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci*, **4**: 1421-1425.
- [23] Bányai, L., Patthy, L. (1999) The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Protein Sci*, **8**: 1636-1642.

- [24] Tordai, H., Bányai, L., Patthy, L. (1999) The PAN module. The N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Letters*, **461**: 63-67.
- [25] Patthy, L. (2000) The WIF module. *Trends Biochem Sci*, **25**: 13-14.
- [26] Trexler, M., Bányai, L., Patthy, L. (2000) The LCCL-module. *Eur J Biochem*, **267**: 1-8.
- [27] Patthy, L. (1991) Modular exchange principles in proteins. *Curr Opinion Structural Biol*, **1**: 351-361.
- [28] Patthy, L. (1994) Exons and introns. *Curr Opinion Structural Biol*, **4**: 383-392.
- [29] Patthy, L. (1995) Protein evolution by exon-shuffling. Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company, Springer-Verlag, New York
- [30] Patthy, L. (1996) Exon-shuffling and other ways of module-exchange. *Matrix Biol*, **15**: 301-310.
- [31] Patthy, L. (1999) Genome evolution and the evolution of exon-shuffling - a review. *Gene*, **238**: 103-114.
- [32] Patthy, L. (2003) Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica*, **118**: 217-231.
- [33] Patthy, L. (1999, 2007) Protein evolution. Blackwell Science, Ltd., Oxford.



Patthy László 1943-ban született Sopronban. 1962-től az ELTE biológia-kémia szakán végezte tanulmányait, ahol 1967-ben szerzett biológus-genetikus diplomát. 1967-72 között a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézetében, majd 1972-74 között az Egyesült Államokban, a University of California, Los Angeles, Biológiai Kémia Tanszékén dolgozott. 1974 óta az MTA Enzimológiai Intézet kutatója. 1975-ben védte meg a biológiai tudományok kandidátusi, 1989-ben akadémiai doktori értekezését. 1994-ben az EMBO tagjává, 1995-ben az MTA levelező tagjává, 2001-ben rendes tagjává választották. Akadémiai bizottsági tisztségei (Kutatási Infrastruktúra Elnöki Bizottság, Publikációs Elnöki Bizottság, Bioinformatikai Osztályközi Állandó Bizottság) mellett a *FEBS Journal* és a *Scientific Reports (Nature)* tudományos folyóiratok szerkesztőbizottságának is tagja. 2013-tól az MTA TTK Enzimológiai Intézetének Professor Emeritusa.

BESZÁMOLÓ AZ MBKE 2016. ÉVI VÁNDORGYŰLÉSÉRŐL

A vándorgyűlésnek idén Szeged adott otthont. Az angol nyelvű konferenciára 2016. augusztus 28-31. között került sor az Ifjúsági Ház Rendezvényközpontban mintegy 170 résztvevővel, akik között szép számmal akadtak külföldi előadók is. A konferencia magas színvonalát vetítette előre a Michael Lisanti (University of Manchester) által tartott, a FEBS National Lecture programja által támogatott nyitóelőadás. Lisanti professzor olyan újszerű rákterápiás megközelítésekről beszélt, amelyek – a mitokondriumok bakteriális eredetét kihasználva – a klinikai gyakorlatba már bevezetett antibiotikumok újrapozicionálásával veszik célba a rák-össejtek energiaforgalmát.

Tankó Béla életműdíjasunk, Wollemann Mária (MTA SZBK Biokémiai Intézet) kutatói pályájának az új generációk számára is tanulságos fordulatairól, míg a Tankó Béla díjat eddigi munkásságáért kapó Vértessy Beáta (MTA TTK és BME) a nem-kanonikus DNS-bázisok felderítés alatt álló új biológiai szerepeiről beszélt. A Bio-Science Kft. által adományozott, a 2015. évben, nemzetközi folyóiratban megjelent, legjobb molekuláris biológiai témájú közleményért járó díjat Gógl Gergő (MTA TTK és ELTE) nyerte el (lásd Biokémia XL(2), 2016. június), aki az RSK1 szignalizóma szerkezetének, illetve egyes melanómák patogenezisében betöltött szerepének felderítését ismertette.

A konferencia nyolc tematikus szekciójának előadói a hazai molekuláris biológia frontvonalát rajzolták fel az alábbi témacímek alatt: *Translational Medicine; Molecular Basis of Disease and Therapy, Stem Cells, Immunity and Inflammation; Regulation of Gene Expression, Regulatory RNA, Epigenetics; Lipids and Membranes in Action; Bioinformatics, Synthetic Biology, Genome Engineering, Biotechnology; Genome Organization, Maintenance, Functional Genomics; Protein Structure, Function and Modelling; Molecular Signalling, Cell-Cell Communication, Cell Death and Differentiation.*

A konferencia Bio-Science Kft. által támogatott fiatal előadói díját Kristóf Endre Károly (DE) kapta, aki az adipociták közötti kommunikáció új szereplőinek funkcióit derítette fel. A legjobb poszter díjat Koprivanacz Kitti nyerte (MTA TTK, Enzimológiai Intézet). Az Epigenetikai Konferencia szervezői által felajánlott különdíjat (ingyenes regisztráció a konferencián) Kovács Gergő (SZBK Genetika Intézet) kapta.

Ezúton is szeretnénk kifejezni hálás köszönetünket a konferencia házigazdájának, Boros Imrének (SZTE) és csapatának a zökkenőmentes szervezésért, a sikeres és kiemelkedően jó hangulatú konferenciáért és a társas programokért. Szintén nagyra értékeljük a Bio-Science Kft.-nek és Tátrai Ágnes ügyvezető igazgatónak a hangulatos Welcome Party-t, valamint a Bio-Science díjat és a fiatal előadó díjat megalapozó nagylelkű támogatását.

Nagy lelkesedéssel biztatjuk tagtársainkat a soron következő rendezvényünkön, a jelen lapszámunkban is hirdetett 2017. évi Molekuláris Élettudományi Konferencián (Hungarian Molecular Life Sciences) való részvételre.

*Kovács Mihály
főtitkár, MBKE*



Michael Lisanti FEBS National Lecturer



Kovács Gergő



Wollemann Mária



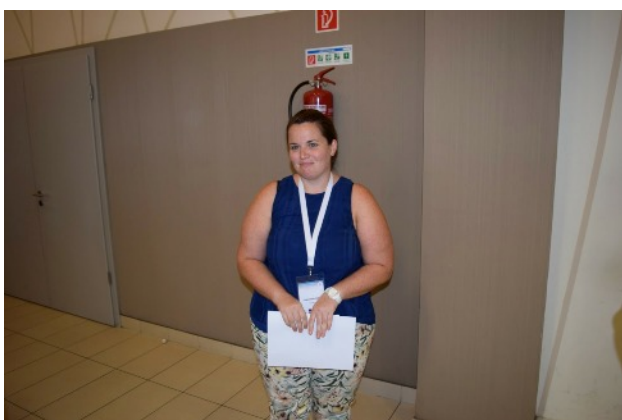
Vértessy G. Beáta



Gógl Gergő átveszi a Bioscience-díjat.



Kristóf Endre Károly



Koprivanacz Kitti



Az MBKE vezetősége. Balról jobbra: Buday László elnök, Kovács Mihály főtitkár, Boros Imre (a konferencia szervezője).

A fotókat Vedelek Balázs készítette. A konferencián készült további képek megtekinthetők:

<http://www.mbkegy.hu/index.php?startUrl=pages/gallery/gallery.php>

2ND DANUBE SCIENTIFIC CONFERENCE ON EPIGENETICS

2016. október 5. és 8. között - az MBKE égisze alatt, az MTA és az EMBO jelentős támogatásával, az MTA TTK és az MTA Biológiai Tudományok Osztálya által befogadott rendezvényeként - Budapesten került megrendezésre immár második alkalommal a Danube Scientific Conference on Epigenetics című tudományos konferencia.

A konferencia az MBKE Epigenetikai Szakosztályának rendezvényeként két évente kerül megrendezésre. A konferencia célja, hogy kis létszámú, nemzetközi reputációjú rendezvényként találkozási lehetőséget biztosítson a hazai, a közép-kelet európai kutatók és a nemzetközi epigenetikai és transzkripciós műhelyek számára. A konferencia angol nyelvű, az előadók kiválasztásánál a szervezők különös odafigyelést szenteltek annak, hogy az elmúlt 1-2 évben jelentős eredményeket publikáló fiatal, pályájuk felívelő szakaszában levő kutatókat hívjanak, akik tanácsaikkal, jelenlétükkel elő tudják segíteni a résztvevők elméleti és gyakorlati tudásának szélesítését. Az előadók kiválasztásánál szempont volt, hogy EMBO tagok, EMBO Young Investigator kutatók és ERC pályázat nyerteseket hívjunk meg, ezáltal is növelve a rendezvény presztízsét.

A rendezvény különlegességét adja az is, hogy a szekciók átfogják a transzkripció szabályozás és epigenetika teljes spektrumát, ezáltal hiánypótló rendezvény egy olyan korban, amikor a tudományos konferenciák nagymértékben specializálódtak és általában egy-egy részterületet kívánnak lefedni. Rendezvényünk témái izgalmas területekre adtak bepillantást, úgymint: *Single-cell epigenetics*, *Chromatin architecture*, *Transcriptional regulation and epigenetics*, *Epigenetics and metabolism*, *Developmental epigenetics*, *Transgenerational inheritance*. A konferencia részletes programja elérhető itt: <http://danubeepigenetics.org/>.

A nyitó előadások az MTA Székházában kerültek bemutatásra a Biológiai Tudományok Osztályának nyilvános tudományos rendezvényeként. A további szekciókat, beleértve a poszter szekciót is az MTA TTK épületében szerveztük. Az interakciót elősegítendő a Ph.D. hallgatók közös esti „Beer-session” keretében egyeztethettek az előadókkal.

A tudományos szervezőbizottság Petra Hajkova (MRC Clinical Sciences Centre and Imperial College London, UK), Ana Pombo (Max Delbrück Centre, Germany) Tora László (IGBMC, France), valamint a helyi szervezők Arányi Tamás (MTA TTK) és Bálint Bálint L. (Debreceni Egyetem) mindent elkövettek, hogy jelentős nemzetközi részvételt érjenek el a rendezvényen. Ez a cél maradéktalanul sikerült is: harminc országból érkeztek résztvevők, és 35%-a volt a résztvevőknek hazai. A legnagyobb külföldi kutatói bázis Franciaországból érkezett, de valamennyi jelentős európai és tengerentúli kutatói központból jöttek előadók vagy résztvevők. A régiókból kiemelt jelentőségű, hogy Csehország, Románia, Szlovákia, Lettország, Litvánia és Szerbia is képviselte magát, de távoli régiókból is érkeztek kutatók, pl. Szingapúrból, Ausztráliából, Brazíliából, Ecuadorból és Dél Koreából.

A rendezvény a jelentős szponzori támogatásnak köszönhetően minden várákozásnak megfelelt. Az elégedettségi kérdőív minden tekintetben a „kiváló” és a „nagyon jó” kategóriákat jelezte vissza. Nemzetközi összehasonlításban a kitöltők 75%-a úgy értékelte, hogy a konferencia minősége olyan mint a regionális nemzetközi vagy nagy formátumú nemzetközi konferenciáké. Külön köszönet a Diagenode és Thermofisher kiemelt támogatóknak, valamint a Budapesti Francia Intézetnek a támogatásért.

A sikeres rendezvényt folytatni kívánjuk, ezért 2018 őszén újra megrendezzük. Célunk tovább erősíteni ennek a tudományterületnek a hazai képviselőit, elősegíteni a nemzetközi hálózatosodást, és olyan időközi rendezvényeket is szervezni, melyek gyakorlati tudást biztosítanak a transzkripció szabályozás és

epigenetika területén elindulni szándékozóknak. Ezért 2017-től kezdődően gyakorlati képzések szervezését tűzzük ki célul, melyekre minél nagyobb számban várjuk az MBKE kutatócsoportjaiból a fiatal és kevésbé fiatal kutatókat. A képzések szervezése folyamatos, minden megkeresést szívesen veszünk.

2018 őszén ismét megrendezésre kerül a Danube Scientific Conferences on Epigenetics, melyre várjuk minél nagyobb számban a hazai transzkripció szabályozással foglalkozó kutatócsoportok képviselőit.

*Arányi Tamás és Bálint Bálint László
szervezők*

Tisztelt Kollégánk!

A Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE), a Magyar Genetikusok Egyesülete (MAGE) és annak Sejt- és Fejlődésbiológiai Tagozata 2017. március 31. - április 2. között megrendezi harmadik közös szervezésű konferenciáját „Molekuláris Élettudományi Konferencia 2017” („Hungarian Molecular Life Sciences 2017”) címmel.

A nagy múltú, rokon szakterületek kutatóit összefogó egyesületek 2013-ban hozták létre a legnagyobb hazai élettudományi konferenciát, melyet elhatározásunk szerint két évente, így 2017-ben is megszervezünk. Hazai és külföldi tudományos műhelyekből mintegy négyszáz kutató részvételére számítunk. Az egyesített konferencia mindhárom egyesület hagyományait folytatni kívánja. A 2013-as első és az ezt követő, 2015-ös Magyarországi Molekuláris Élettudományi Konferencia sikere bizonyította, hogy a közös szervezés a hazai élettudományi konferenciák történetében új minőséget hozhat létre. A 2017-es konferencia célja fórumot teremteni a biokémia, a szerkezetbiológia, a sejtbiológia, 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.

Alkotószellemű, 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.

Ezennel tisztelettel hívjuk Önöket, legyenek résztvevői ennek a molekuláris biológiai kutatásokat bemutató kiemelkedő jelentőségű tudományos rendezvénynek. Számítunk az Önök részvételére abban, hogy kiváló hangulatú, emelkedett és emlékezetes, mindnyájunk számára hasznos tudományos rendezvényt hozhassunk létre. Felhívjuk szíves figyelmüket arra, hogy az előadások nyelve angol, ennek megfelelően az előadás címetek és összefoglalókat is angol nyelven várjuk.

A konferenciáról további információkat találnak a <http://hunlifesci.hu/> honlapon. A konferenciát a Diamond Congress Kft-vel együttműködésben szervezzük (<http://www.diamond-congress.hu/>). A Diamond Congress munkatársai kérésre további részletes információval szolgálnak.

A konferencia szervezői nevében:

Virág László

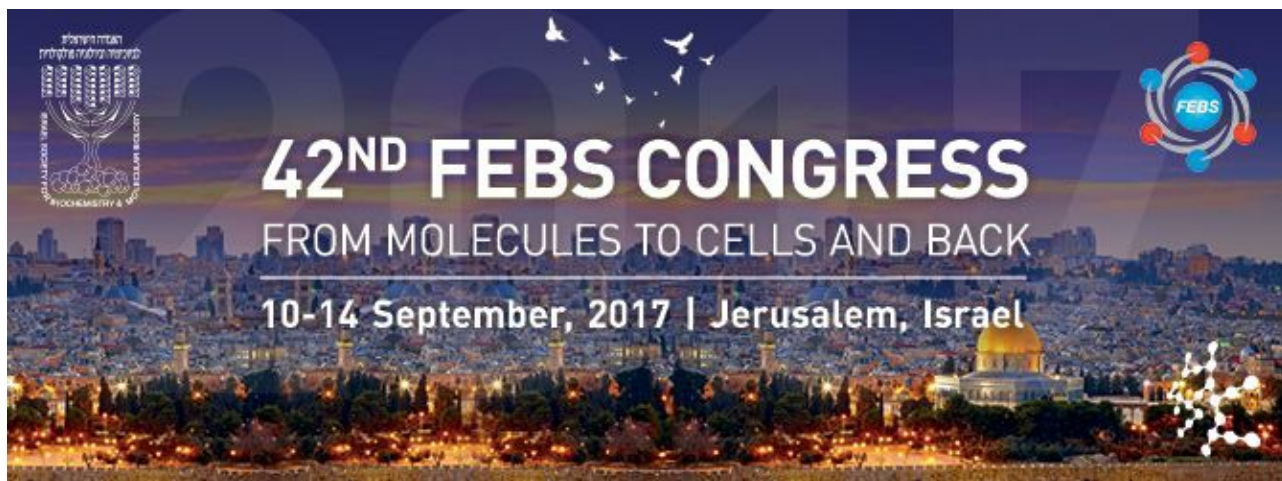
Erdélyi Miklós

Sass Miklós

Kovács Mihály

Mihály József

Szabó Gábor



Dear Friends and Colleagues,

The Israeli Society for Biochemistry and Molecular Biology is delighted to invite you to the 42nd Congress of The Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) on September 10–14th, 2017. This Congress will be held in the multi-cultural and historical city of Jerusalem at the well-known international convention center "Binyane Hauma". The center is located at the entrance to Jerusalem and is only an hour away from Tel Aviv, the city that never sleeps. Less than an hour in the other direction brings you to the famous Dead Sea.

The 2017 FEBS Congress, entitled "From molecules to cells and back", will cover the entire spectrum of molecular life sciences with symposia that include:

- Cancer biology
- Chromatin structure and epigenetic modifications
- Molecular neuroscience
- Mechanisms for protein homeostasis
- Medicinal chemistry
- Metabolomics and signaling
- Molecular machines in action
- Protein degradation
- Signaling across membranes: receptors, channels and transporters
- Systems biology
- Structural computational biology

Pioneers and leading researchers from all aspects of molecular life sciences have confirmed their participation. Among the plenary speakers are Nobel laureate Robert J. Lefkowitz (Duke University), Patrick Cramer (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen), Carol Robison (University of Oxford), Marcelo Rubinstein (University of Buenos Aires), Jonathan Weissman (University of California) and Feng Zhang (Massachusetts Institute of Technology).

In addition, there will be early-bird practical sessions, and discussion sessions on topics such as science and society, careers and education. Active participation of delegates is encouraged through short talks, speed talks, and poster sessions. Furthermore, the FEBS Young Scientists' Forum (YSF), intended to promote interactions between pre- and post-doctoral scientists, is scheduled just before the Congress, on September 7–10th, 2017.

We believe that the Congress will offer unique opportunities for scientific interactions, which will facilitate the initiation of friendships, collaborations, and joint projects.

We look forward to welcoming you in Jerusalem in 2017!

Abdussalam Azem, Chair

<https://2017.febscongress.org/in-english>

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 2016-ban a FEBS Letters, FEBS Journal, FEBS Open Bio, Molecular Oncology, TIBS, IUBMB Life, FASEB Journal újságokban megjelent, valamint

IF > 5 (a 2014/2015-es SCI szerinti) cikkek listáját.

A listát a Biokémia újság márciusi számában tesszük közzé.

Beküldési határidő:

2017. február 15.

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

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 2017-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 2017. 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*



IN SILICO



Az MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport fiatal kutatót keres

(végzős hallgatót, diplomával vagy PhD fokozattal rendelkezőt)

Membránfehérjék működésének kísérletes és elméleti tanulmányozása számtalan kihívást rejt magában. Kutatócsoportunkban elsősorban azt szeretnénk megérteni, hogy gyógyszerek felszívódását és metabolizmusát befolyásoló ABC membránfehérjék hogyan képesek kémiaiailag igen eltérő szerkezetű molekulák szállítására. Főbb célkitűzéseink közé tartozik továbbá, hogy betegséget (pl. cisztás fibrózist, kösvényt) okozó mutáns ABC fehérjék hibás összeszerelődését megértsük és kijavítsuk. Leendő csapatunknak lehetősége nyílik arra, hogy különféle elméleti módszerek (pl. molekuláris dinamika, *in silico* dokkolás) alkalmazásával egy rendkívül izgalmas területen kapcsolódjon be a tudományos munkába, s olyan kérdésekre tudjon válaszolni, ami világszerte foglalkoztatja a kutatókat.

Valós helyszín: Semmelweis Egyetem EOK, Budapest

Virtuális helyszín: <http://www.hegelab.org>

Feltételek: angol nyelvtudás; alapszintű programozási ismeretek; magas szintű problémamegoldó és kommunikációs képesség

Előnyt jelent: tapasztalat bioinformatikai és szimulációs módszerek területén; fehérje szerkezeti/biofizikai ismeretek; programozás területén szerzett tapasztalat; korábbi tudományos kutatómunkában való részvétel

A jelentkezésnek tartalmaznia kell:

- A jelentkező szakmai életútját részletesen bemutató önéletrajzát
- Motivációs levelet
- Legalább egy olyan referenciát (email cím és telefonszám), akitől a jelentkező képességeiről, kutatói alkalmasságáról további vélemény kérhető



A benyújtott dokumentumok alapján a jelentkezőket elektronikusan értesítjük a személyes beszélgetés időpontjáról. Munkakezdés megbeszélés szerint. PhD lehetőség!

A jelentkezést a hegedus.tamas@hegelab.org postafiókba kell küldeni egyetlen pdf-fájlba szerkesztve.

Dr. Hegedűs Tamás
tudományos főmunkatárs

Ez az álláshirdetés letölthető:
http://www.hegelab.org/hegelab_insilico_allashirdetes2016december.pdf

Előszó (Nyitray László)

Gráf László az MTA rendes tagja, az ELTE Biokémiai Tanszékének 1986 és 2007 közötti vezetője, ma emeritus professzora, az MBKE Tankó Béla életmű-díj kitüntetettje. Korábban több alkalommal beszámolt kutatómunkájáról a *Biokémia* folyóirat hasábjain is, amely kutatások az elmúlt három évtizedben elsősorban a szerin-proteázok és fehérje inhibitoraik szerkezet-funkció összefüggésének feltárására irányult (Gráf, 2008, *Biokémia*, XXXII(4): 87-89). Gráf professzor azt vallja, mintegy kutatói ars poeticájaként, hogy a kutatás nem áll távol a művészeti tevékenységtől. Ezt bizonyítja, a „Fehérjeművészet” címen megjelent írása (Gráf, 2009, *Biokémia*, XXXIII(4): 30-34), az MTA székházban 2009-ben általa szervezett „A fehérjék színes világa” című képzőművészeti kiállítás, vagy a saját fotóiból az ELTE TTK-n 2004-ben megrendezett „Hajnali részegség” című kiállítása. A *Biokémia* folyóirat 2012. évi 2. száma, az akkor 70 éves Gráf professzor köszöntése mellett a Tudomány és művészet rovatban közölt válogatást az említett fotókiállítás anyagából, valamint felvillantotta az egyetemi éve alatt született „irodalmi zsenyéinek”, humoros karcolatainak is egyikét. 2015 tavaszán Gráf László a diplomájuk megszerzésének 50. évfordulójára rendezett összejövetelen egy „notesz”-szel lepte meg volt évfolyamtársait. „A nagy évfolyam” című összeállításból a szerző bevezetőjét és a 1960-as évek első felében született rövid írásai közül egy csokorra valót közlünk a szerző hozzájárulásával. A rajzokat Antal József készítette.

GRÁF LÁSZLÓ

A NAGY ÉVFOLYAM

ELTE TTK, VEGYÉSZ SZAK

1960-65

Kedves évfolyamtársaim, kedves barátaim,

Ötven éve, mikor a pályánkat elkezdtük, lelkesek és optimisták voltunk. Hittünk az idő végtelenségében és a saját halhatatlanságunkban is. Ma már látjuk, tudjuk, hogy milyen rohamosan múlik az idő, fizikai jelenlétünkben és lélekben is fogyatkozunk. Alkalmas pillanat, s talán az igazi utolsó alkalom, hogy közösen felidézzük és megünnepeljük pályakezdésünk izgalmas éveit. Erre vállalkozom ezzel a kis könyvvel, nevezzük „aranyindexnek”. A notesz, így is hívhatjuk, nem törekszik teljességre, s arra sem, hogy kiszínezza hajdani közös élményeinket. Változatlan formában adom közre az 1960–65 között rólatok, rólunk szóló kis történeteimet, s néhány, kifejezetten vegyész-összejövetelekre (bulikra) készült, humorosnak szánt írásaimat. A mai humor már egészen más, mint az akkori, ezért meg sem kíséreltem megváltoztatni őket. Néhány kis írás azonban, bennünk legalább, meg fogja mozgatni a lelket. Fogadjátok ezért tőlem ezt a „jubiláris” ajándékot örök barátságunk jeléül, azzal a szeretettel, amivel mindig

gondolok rátok. Az „index”, míg élünk, őrzi számunkra azoknak a boldog egyetemi éveknél az emlékét. S talán, elmeséléseink nyomán a gyermekeink is kapnak tőlünk néhány mintát arról, hogy miképpen indult el pályáján, és miképpen alkotott a „nagy évfolyam”.

2015. május

Szeretettel,
Gráf László

BALLADA AZ ANALINTÉZETHEZ - 1962
(Krausz és Farsang professzorok emlékére)

Fohász 1962: Ó, Magasságos Farsang, ha van hang,
mely füledig eljut, most testületileg eléd állunk: Ó,
bocsásd meg nekünk a mi laborkárunk!

Fohász 2005: Nem gólya hozott, s nem a HÉV, de
eltelt 43 év. Mondd, hevít-e még a régi hév?
Félszázad görnyeszti válladat, vajh merre tart a
sorsvonal? De tudd, az idő csak rohan, mint egy
féktelen folyó: HALHATATLAN AZ ÉVFOLYAM!

SEJTÉS

Szerves kémiai rémtörténet, 1962

(Kucsman professzor emlékére)



Eleinte csak sejtés volt, bizonytalan és tétova sejtés, olyan, mint amikor átnézel a párás ablakon, és ködbe-süppedt tekintettel felismerni véled egy gyárkémény sziluettjét; eleinte csak sejtés volt, bizonytalan és tétova sejtés, olyan, mint amikor a felszálló füst körül meginog a levegő...

A meta-nitro-benzoésavnál még azt hittem, hogy kiépíthetem a magam zárt harmonikus világát, hogy csendes, szerény módon meghúzhatom magam egy sarokban, hogy elgondolkodhatok a kémia csodáin, hogy nem fog senki bolygatni, s én sem fogok zavarni senkit. Aztán a nitro-benzoésavat újra kellett kristályosítanom, kaptam egy könnyű cianozist, összetörtem egy főzőpoharat, s amint a szilánkok összesöprése után felnéztem, Hronszky állt velem szemben az asztal túlsó végén, készen arra, hogy hosszabb kényszerpszünet után elkezdje a szerves preparatív munkát. Szemeim beleakadtak a tekintetébe, mint pamut a horgolótűbe, és egy pillanat alatt megvilágosodott előttem vak sorsom...

Eleinte csak sejtés volt, bizonytalan és tétova sejtés...

A következő héten elvesztettem a spatulámat. Két főzőpohár is elveszett, eltűnt továbbá egy háromláb. Mondom, eltűnt, mert egy spatula elveszhet, a pohár eltörhet, de egy háromláb... az más. Az nem kallódhat el. Legfeljebb lába kelhet. A háromlábbról jut eszembe a három lábas. Különösen az egyik nőtt a szívemhez, egy barnaszínű, csorbaszélű, félfülű példány. Éppen a metil-acetátos lombikom alatt állt, amikor a lombik leesett és a fazék megmentette az anyagot. Ez a

kedvencem is eltűnt. Később láttam ugyan egy hasonlót a Porosnál, de arra vastag zsírkrétával ez volt írva: PP, ami annyit jelent, hogy Poros és Pécsi tulajdona...

Eleinte csak sejtés volt, de a labor fertőzött levegőjében kínzó rögeszmévé vált... Később a dugókra terelődött a figyelmem. Feltűnt, hogy annyi hatalmas és apró parafa dugó közt nem akad egyetlen közepes méretű sem. Rendszerint öles korongokból kinkeservvel kellett kireszelnem a megfelelő méretűt. Figyelni kezdtem a Baki nénit, amint behozza a dugós zsákot, és feltűnt, hogy némely kollegám tízesével hordja el az alkalmas méretűeket. Szememről lehullott a hályog, s társaim iránti jóindulatom megtorpant önzésük rideg falán...

Eleinte sejtés volt, bizonytalan és tétova sejtés, de azon a napon bizonyossággá vált...

Egyébként is rossz napom volt. A nitro-metánt cseppenként imádkoztam a szedőbe, egész testfelületemen viszkettem az omega-Nitro-sztiroltól és Kucsman adjunktus úr a nitrofenolomra csak ennyit mondott: „Nem elég!” Ilyen előzmények után kezdtem az anyag újratermelésébe. Pontosabban kezdtem volna, ha találok ötszázás főzőpoharat. Öt perccel ezelőtt még a csap mellett állt, volt benne valami sárga anyalúg. A Sóllyommal még vitatkoztunk, hogy kié. Megfoghatatlan. Valóban az-e? Megmondom őszintén, a Hronszkyra gyanakodtam leginkább. Éppen nitrobenzolt desztillált egy lyukas Erlenmayerbe. S közben, hogy jobban kihasználja az időt, a bicskájával fluoreszceint kapargatott egy főzőpohárból. A tekintete réveteg volt, mint egy szobrászé, aki isteni sugallatra a lélek rezdüléseit vési anyagba. Nem, ez az ember nem vihette el a főzőpoharamat. Az arckifejezés ilyen finomságával nem férhet össze tolvaj szándék. A szekrényében egyébként nem volt egyetlen főzőpohár sem. Aztán a Pécsi Györgyit kezdtem figyelni. Aznap csendes volt és elmélkedő. Egész délelőtt a meta-klórbenzollal vacakolt, apró szűrőkön szűrte, mosta, újra oldotta, hűtötte, újra szűrte, ujja begyével csippentette az asztallapról a szemeket és szemetet, mint télen a morzsát a cinkék. De az anyag egyre kevesebb lett,

akárcsak a homok, amit szórakozottan csurgatunk egyik kezünkéből a másikba. A többiek közben „hol az olló, komámasszonyt” játszottak. Ez abból áll, hogy valaki megkérdezi, „hol az olló”, és a többiek röhögnek. Végül a Treiber nagy kegyel, mintha a sajátja lenne, odadja, aki pedig kérte és kapja, az meg úgy tesz, mintha le lenne kötelezve neki. A Szalai, aki egyébként jobb tanuló, mint a Vargai, de a Vargainak több az esze és a preparátuma, szóval a Szalai jeget hoz. Többen kérnek, de nem ad. Aztán rájön, hogy neki sem kell, felajánlja, de így már a kutyának sem kell. Végül bevágja az egészet a lefolyóba. A labor végén Tóth Tibor hat prepin zongorázik, s instrukciói alapján, a széles néptömegek testvéri összefogása nyomán, társadalmi munkában készül a hetedik. Pécsi Györgyit azonban közben sem tévesztettem szem elől. Miután a meta-klórnitrobenzol többszöri átkristályosításába beleunt, Kucsman adjunktus úrhoz vitte az eredményt. Az adjunktus úr máshova nézett, és így szólt: „sárguci, kristályosítsa át”. Pécsi idegesen felnevetett. Ez az őszinte kacaj még a gyanú árnyéka alól is felmentette. De akkor ki, és hogy, és miért?

Különböző próbákat tettem. Egy ízben csalétekül az asztal sarkán felejtettem a legszebb és legfényesebb spatulámat, és mindig úgy helyezkedtem, hogy a szemem sarkából megfigyelés alatt tarthassam. A laborgyakorlat vége felé úgy adódott, hogy egy pillanatra le kellett vennem róla a tekintetem egy szűrőpapír kivágása miatt. Fél másodperc sem volt az egész, de amint visszanéztem, konstatáltam, hogy eltűnt a spatulám. Rögtön felmértem a szememmel a kérdéses sarok és a társaim távolságát. Bizonyosnak látszott, hogy senki sem juthatott a spatulától odáig, ahol éppen állt, az alatt az idő alatt, amíg félrenéztem. Senki a világon! Senki. Egyedül Kucsman adjunktus úr sétált el éppen az asztal mellett... Ejha!

Kórus (Seper, Vargai, Treiber, Szalai, Pécsi Györgyi és Pécsi Tibor): – Hol van a két bunzenünk, a háromlábunk, a gumikónuszunk, a két fazekunk és szívós palackunk? Elvesztettük a nuccsfejünk!

Poros Kati: – Hol van a szép spatulám, ki orozta el a gólyaorrom, s ki fújta meg a pipám?

Hronszky Imre: – Hol van az én jó kónuszos porcelánfejem, s hová lett a becsületem?

Eleinte csak sejtés volt, bizonytalan és tétova sejtés. Ma se sokkal több. Sejtés, tétova és rejtélyes, amin megtörik a gondolat, és misztikus ködök, egérszag és kongó üres kérdések, hogy hol az olló, s hol a lábas, s miért kell, és hogyan tovább?

TIXOTRÓPIA

(Kolloidkémiai ujjgyakorlat – 1963)

Wolfram és Rohrzetzer Professzorok emlékére



Péntek reggel arra ébredtem, hogy kivert a hideg. Álmos közönyöm szürke sűrűjén keresztül egy szó tört rám. Orvul, hasító fájdalommal robbant a tudatomba: tixotrópia! Először azt hittem, hogy játékos fantáziám tréfál meg, hiszen ez egy marhaság, erről én még sohasem hallottam. De éppen a tiltakozás volt gyanús, miért félek ettől az értelmetlenségtől: tixotrópia... Miért keseríti meg a reggeli kávé, miért néz rám úgy a kalauz, mintha nem lenne jegyem, tixotrópia, és miért nézek én úgy vissza rá, mintha lenne, tixotrópia. Ez a rondaság belefurakodott minden gondolatomba, ott zümmögött körülöttem, mint valami húsköpő légy, és időnként belecsípett az ülepembe, hogy felszisszentem: tixotrópia...

Máig nem tudtam, hogy honnan szedtem fel, van-e értelme, vagy csak a betűk förtelmes torzója? De azt tudom, hogy azon a szürke péntek reggelen egy

végzetes nap rossz előérzete hívta bennem életre intő, baljós előjelként... tixotrópia...

A labor aznap különösebbnek tűnt, mint máskor. Mintha a névsorolvasó tanársegéd megnyomta volna a nevemet, s mintha a levegőben lett volna valami, mintha az egyenáramba dugott transzformátor is büdösebb lett volna, mint máskor, mintha a Révai halkabb, a Hantos követelőzőbb, a Seper sárgább és kívánatosabb lett volna, mint máskor. A benyomások tompán koppantak az érzéseimen, de én nem reagáltam. Délig nem tudom, hogy mivel foglalkoztam. Ez az első két óra általában kiesik az emlékezetemből. De aznap már fél egy is lehetett, amikor egy jóindulatú évfolyamtársam megmutatta a Traube-féle sztalagmométert. Ezt annak az őszinte sajnálkozásának köszönhetem, hogy egy asztalon felejtett reosztáttal készültem meghatározni az „ismeretlenem” felületi feszültségét. Mentségemül szolgáljon a névjegyem, amit – nyilván tévedésből – a reosztát mellé helyeztek.

A sztalagmométer primitív dolognak tetszett, helyesebben nem tetszett, de primitív volt, pontosabban annak látszott, mert mégsem olyan primitív, mint pl. egy Geiger-Müller cső. A sztalagmométert kénsavval kell mosni, amitől egy számlálócső esetében el lehet tekinteni. A sztalagmométer nem akármilyen cső, ez egy kényes cső, tehát egy kényescső. A sztalagmométernek két vége és két nyílása van, de a két nyílás között, más közönséges csövekkel ellentétben, csak igen vitatható kapcsolat áll fenn. Ha van is összefüggés egy keskeny lyuk formájában, az semmi esetre sem számottevő. A cső egyik végén egy hüvelykujjnyi gumi van a folyadék felszívása és az idegesség levezetése, tehát szopogtatás, súlyosabb esetben érzéki harapdálások céljából kifolyólag.

Az emlékek ettől a ponttól kezdve kissé keveredtek bennem, a számlálócső eszelős ketyegésével, a Banaiék kacagásával, ami frenetikus harsogássá szélesült, a kénsav savanyú ízével a számban és azoknak a kifejezéstelen koppanásoknak az érzetével a kezem fején... 1-2-3-4...

A sztalagmométer csöpögött. Lassú, kimért, unalmas és gúnyos csepegéssel, olyan utánozhatatlanul gusztustalanul, ahogy csak egy sztalagmométer tud csöpögni... 5-6-7... Aztán a nyolcadik csak nem jött, aztán vártam, aztán megint nem jött, s már tudtam, hogy sohasem fog jönni. Ha csak... igen... Akkor fújtam először a csőbe. Nem szívesen fújtam a csőbe... S ha van is valami összefüggés a tízórait és a sztalagmométer gömbjében jelentkező szalonnadarabkák között, amit a szememre vetettek, arról nem tehetek...

A sztalagmométer akkor folyni kezdett, kontinuális, kínzóan sima folyással. Öt méteres körzetben nem volt egy csepp sem. Aztán minden átmenet nélkül elállt a folyása, és én megint bent voltam a Hofman-féle kutyaszorítóban. És fásultan fújtam a csövet, miközben a csapból fáradt hangok szakadtak ki, a levegő forró volt és fojtogató, és körülöttem sűrűsödtek az események: Pécsi egy parafa dugóval megverte Sepert, és én újra fújtam a csövet, fújtam alul, fújtam felül, szívtam alul, és szívtam felül, fújtam oldalt, és általában fújtam mindenütt, ahol nyílást sejtettem. S mind miért, ezért az átkozott néhány cseppért, ami tulajdonképpen az idegeimre ment... „Oh, adj oh, adj nekem hús cseppet, hú csehem!” Éreztem a feszültséget az agyamban, a testemben, ott feszült közötttem és a labor négy sarka között, az a megfoghatatlan, megmagyarázhatatlan... igen, ma már tudom, a felületi feszültség volt!

Aztán valaki félrehívott – a nevét tapintatból nem árulhatom el –, néhány tanácsot adott a méréssel kapcsolatban, szájbarágósan magyarázott, mint valami hülyének, de amit mondott, az mély benyomást tett rám, és végül megszívleltem. És a tanácsai szerint jártam el. Megszagoltam az „ismeretlenet”, nyilvánvalóan etilalkohol vizes elegye volt, megmértem a fajsúlyát, és a tanszéki könyvtárba siettem, hogy felüssem az „International Critical Tables” c. angol adatgyűjteményt a 156. oldalon, és kikerestem az etilalkohol-víz elegy megmért fajsúlyához tartozó felületi feszültség magyar nyelvű számadatát.

Valami felszabadult belőlem, szinte éreztem felbugyborékolni a torkomon a megkönnyebbülést. S azt is elárulhatom, hogy amikor visszaugrottam a laborba a táskámért, a kellemetlen zavaros emlékek rossz szájízével, a csalás boldog önkívületében, egy negyed percre visszatértem még a sztalagmométerhez, s jól beidegzett mozdulattal a cső fölé hajoltam, s valahonnan igen mélyről, talán a lelkem tájékáról szenvedélyesen beleköptem.

Amikor is kiléptem a kapun, a tavaszi friss szemerkélés illata csapta meg piridines bűzöktől csúfolt vegyész orrom, mélyet szívtam a tavasznak ebből az esszenciájából, s kémlelően előretartottam a kezemet... s a langyos cseppek egyenletesen hullottak és mállottak szét a kimarjult bőrön: 1-2-3-4-5...

SZILVESZTER - 1963

NOVEMBER 20.

Anniék szoltak, hogy ők tartják idén is a szilvesztert. Mindenki nagyon sajnálja őket. B. Ferit, azt a jópofa iparművészetist is meghívták, aki tavaly Évánaknál hecsedlilekvárral kikente a nappalijuk falát. Éva papája is – akit öt óra tájt hoztak haza rokonoktól – mondta, hogy nagyon ízléses, bár a baracklekvárt jobban kedveli.

DECEMBER 15.

Anni összeírta, hogy ki mit visz. Károly az új nőjét. Állítja, hogy igen édes. Anni mondta, hogy valami sósat is kéne, de azért ne csináljunk gondot a dologból. Pénzt is lehet. Utána úgyis sok kiadásuk lesz. Meg már régen szeretne egy mohairt. Klárit is kérdezi, hogy milyen süteményt tudna. Az azt mondja, hogy dióstortát vagy linzert. Anni felírta: dióstorta és linzer.

DECEMBER 26.

Anniékat valaki figyelmeztette, hogy Jutkát elfelejtették meghívni. Az Évának azt az unokatestvérét, aki tavaly ciklámen nagyestélyiben, mint valami elfestett őrangyal kérlelte a fiúkat, hogy ne igyanak olyan sokat, mert különben nem

fogja szeretni őket. Ettől idő előtt többen berúgtak. Nem lehattunk szeretetre méltóak. Szóval Anni a névtelen fenyegető levelek ellenére is felhívta Jutkát. Jutka bőgött a telefonba, úgy látszik, nem szívesen látják, mondta, és el se megy. Anni minket is beszervezett, hogy agitáljuk. Nehogy sértődés legyen. Egymásnak adtuk a kagylót. Jutka bőgött. Öt percnél tovább senki sem bírta. Éváéknál az egész család váltott műszakban dolgozott. Végül a süket bejárónő másfél órás türelme meghozta a gyümölcsét. Jutka megígérte, hogy jön, Gézának nincs igaza, a bejárónő nem tehet róla.

DECEMBER 31. 22 óra

Az a hülye Sanyi összecserélte a szalagokat. Az apja oratóriumait hozta. Hazaugrasztottuk. Anni mamája javasolta, hogy ne azt a hülye „zálogosdit” játsszuk, „egy kis dombra lecsücsültet”, viszont a Feri nem akart. Kérdezem tőle halkán, hogy hol a bólé. Azt mondja, nem tudja. Kérdezem a Jóskát, az sem tudja. Buta játék. Ottó fényképezett.

DECEMBER 31. 23 óra

Mondom a Sanyinak, hogy nézze meg a bólét a kredencben. Azt mondja, „hideg”. Ott a likőr van. Akkor csak a nachtkastliban lehet, válaszolom. Jön az Anni és kiabálja, hogy „tűz, tűz!” Már azt hittem, hogy megvan a bólé, pedig csak a függöny gyulladt ki. A Géza oltotta el haboltóval. Anna mamája mondta, hogy nem baj, egyébként is időszerű volt már egy haboltás. Ottó fényképezett.

DECEMBER 31. 24 óra

Pezsgő. Újból elmúlt egy év. Mind meghatódtunk. A Jóska hányt is. A Himnusz után a Géza el akarta szavalni a Talpra magyart. Figyelmeztettem, hogy ez most nem alkalmas.

JANUÁR 1. 02 óra

Táncolunk feszt. A Károly nője időnként meglehetősen és főleg hűséges. Mindenkire igen jó és igen hűséges. Ezekben a nőkben azt kedvelem, hogy igen

hűségesek. Nagy a gyanúm, hogy ő harapott az ülepembe. Persze nem biztos. A rúzs színe mindenesetre őrá vall, de fő az, hogy hűséges. Jön a mama, és kérdezi, hogy miért van ilyen sötét. Károly mondja, hogy Ottó filmet tölt a gépébe. Nehogy valaki felcsapja.

JANUÁR 1. 04 óra

Elpilledtünk. Feltettek egy oratóriumot. Feltettek egy asztalra. Valakit kifektettünk az ajtó elé. Lehet, hogy engem. Nem, én nem lehettem, mert határozottan emlékszem, hogy átléptem egyszer. Az volt a baj, hogy csak egyszer. Visszafelé is át kellett volna.

JANUÁR 1. 06 óra

Jó friss ez a reggeli levegő. És jók az emberek. A 49-es megállójánál valaki rálépett a kezemre. Mondom, hogy vegye le a lábát. Kérdezi, hogy mit keresek, mondom, az óesztendőt. Ő meg a papírtrombitáját, válaszolja, keressük együtt. Jó, mondom, de csak akkor, ha leszáll a kezemről. Jók az emberek...