

BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója Quarterly Review of the Hungarian Biochemical Society

Szerkesztőbizottság:

ALKONYI ISTVÁN, BAGDY DÁNIEL, BÁNFALVI GÁSPÁR, ELŐDI PÁL, FALUS ANDRÁS,
FÉSÜS LÁSZLÓ, GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC, KALAPOS MIKLÓS PÉTER, NYESTE LÁSZLÓ,
SARKADI BALÁZS, SZÉKÁCS ANDRÁS

Felelős szerkesztő: BAGDY DÁNIEL

Technikai szerkesztő: BAGDY ERZSÉBET

A szerkesztőség címe: 1027 Budapest, Fő u. 68. Telefon: 201-6252

- A tartalomból:*
- A hidrogén kötések szerepe az enzimmkatalízisben
 - Bemutatkoznak a frissen végzett molekuláris biológusok
 - A szöveti transzglutamináz és involukrin expresszió regulációjának tanulmányozása tímusz involúciója során
 - Protein foszfatázok tisztítása és azonosítása típus- és izoenzim-specifikus antipeptid antitestekkel
 - Csemobil 10 év után
 - Hírek és események

- Contents:*
- The Role of Hydrogen Bonds in Enzyme-Catalysis
 - Introduction of the fresh molecular biologist graduates
 - Investigation on the Regulation of Tissue Transglutaminase and Involucrine Expression in the Course of Thymus Involution
 - Purification and Identification by Type- and Isoenzyme-Specific Antipeptide Antibodies of Protein Phosphatases
 - Chernobyl: A Review of Consequences After 10 Years
 - News and Events



Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1518 Budapest, Pf. 7.

Felelős kiadó: Dr. FRIEDRICH PÉTER

Készült a **dART studio** gondozásában.

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 01338455

A hidrogén kötések szerepe az enzimek katalízisben

Kaslik Gyula

ELTE Biokémiai Tanszék, Budapest 1088 Puskin u. 3.

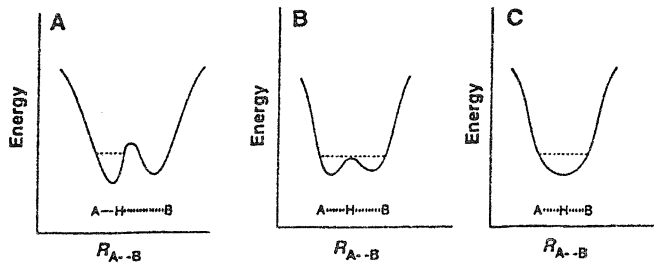
Az utóbbi 2-3 évtizedben, köszönhetően egyrészt a szerkezetkutató módszereknek (röntgen krisztallográfia, NMR), másrészt a molekuláris biológiának (klónozás, irányított mutagenézis), rendkívül sokat fejlődött az enzimekről alkotott képünk. Több ezer fehérje atomi szerkezete vált ismertté, közülük soknak szubsztrát- illetve valamilyen átmeneti állapot-analóggal vagy az enzim egy inhibitorával képzett komplexének is meghatározták a szerkezetét. A legtöbb enzimreakció típus kinetikailag is jól karakterizált, és sok esetben, irányított mutagenézis segítségével, az egyes aminosav oldalláncok a katalízisben, illetve a felismerésben betöltött szerepét is sikerült megállapítani. Ezen tények ismeretében ugyanakkor meglepő, hogy magát a katalízist, az aktiválási energia csökkentésének módját, és az ezzel szorosan összefüggő specifitást, szelektivitást még mindig nem értjük igazán. Jól példázza ezt a hidrogén kötések katalízisben betöltött szerepe körül kialakult vita (1-6). Az enzim által katalizált reakció átmeneti állapotának szoros kötése jelentős szerepet játszik az aktiválási energia csökkentésében. Cleland és Kreevoy (2,5) szerint azonban ez a szoros kötés sok esetben nem lehet önmagában felelős a sokszor tekintélyes aktiválási energia gát leküzdéséért, és úgy vélik, hogy az átmeneti állapot stabilitása részben a katalitikus reakció során kialakult erős, vagy más néven „alacsony gátú” hidrogén kötésnek (low-barrier hydrogen bond, a továbbiakban: LBHB) tulajdonítható. Tehát az enzim-szubsztrát komplexben eredetileg gyenge (2.5-12.5 kcal/mol) hidrogén kötések, vagy azok egy része, az enzimreakció átmeneti állapotában erős (12.5-24 kcal/mol) hidrogén kötéssé (LBHB) alakulnak, így stabilizálva az átmeneti állapot szerkezetét, s így módon csökkentve az aktiválási energiát.

Ezzel szemben Warshel és munkatársai (4) úgy vélekednek, hogy pusztán sztérikus (van der Waals) és elektrosztatikai megfontolások alapján is jól magyarázható az átmeneti állapot stabilizálása, értelmezhető az enzimek katalízis, és nincs szükség az LBHB kialakulásának feltételezésére, sőt, elvi megfontolások alapján, a reakció során képződő LBHB hatása, destabilizálva az ionos átmeneti állapotot, inkább „antikatalitikus” sem mint katalitikus.

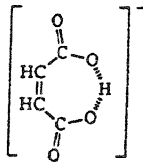
Ez a vita is mutatja, hogy az enzimek katalízis elméleti háttere továbbra is izgalmas területe a biokémiának, illetve jelzi azt is, hogy az új eredmények tükrében érdemes időről-időre visszatérni erre a fontos problémára. Ebben a dolgozatban a hidrogén kötések enzimek katalízisben betöltött szerepével foglalkozom, és a talán legalaposabban leírt és jellemzett enzimes család, a szerin-proteinázok aktív helyének a katalízisében szerepet játszó hidrogén kötéseit vizsgálom meg ebből a szempontból.

A hidrogén kötések típusai, avagy mi is az az LBHB?

A hidrogén kötések kötési energiájuk alapján három csoportba sorolhatjuk: (i) gyenge, vagy konvencionális (kötési energia: 2.4-12 kcal/mol) (1. ábra A); (ii) erős, vagy „alacsony gátú” (LBHB) (12-24 kcal/mol) (1. ábra B); nagyon erős, vagy „gát nélküli” (single-well) (> 24 kcal/mol) hidrogén kötés (1. ábra C) (2,3).



1. ábra A hidrogén kötés potenciális energia diagramja. A) gyenge hidrogén kötés; B) LBHB; C) nagyon erős hidrogén kötés



2. ábra A hidrogén maleát szerkezete.
A karboxil proton kémiai eltolódása 20.2 ppm

Példák: gyenge hidrogén kötés van a víz molekulák között (kb. 5 kcal/mol; O-O kötés távolság 2.8-3.0 Å); erős hidrogén kötés (LBHB) alakul ki a hidrogén maleát két karboxil-csoportja között DMSO-ban (29.8 kcal/mol)(2. ábra); míg nagyon erős hidrogén kötés található a hidrogén -difluorid (FHF⁻) molekula ionban (37 kcal/mol; F-F kötéstávolság 2.26 Å) (2,3)

Az LBHB kialakulásának feltételei a következők: (i) a hidrogén kötésben résztvevő heteroatomok távolsága kisebb, mint a van der Waals rádiuszuk összege. Az O-H-O rendszerek esetében <2.55 Å, míg a biológiai rendszerekben gyakoribb O-H-N hidrogén kötés esetében <2.65 Å; (ii) a hidrogén által összekötött két heteroatom proton affinitása (pK_a) közel azonos; (iii) poláros, protikus oldószer (pl. víz) nincs jelen (1,2,3). Az azonos heteroatomok között (oxigén, nitrogén) kialakuló LBHB általában erősebb, mint a különböző heteroatomok között létrejött hidrogén kötés.

A hidrogén kötés erősségének közvetlen mérése fehérjékben nem megoldott, így csak közvetetten, egyéb paraméterek ismeretében következtethetünk a kötés erősségére. A hidrogén kötés erőssége és a kötésben résztvevő heteroatomok távolsága, ahogy a fenti adatokból is kiolvasható, jól korrelál egymással. A fehérjék röntgen krisztallográfiával illetve NMR spektroszkópiával meghatározott szerkezetének felbontása azonban nem teszi lehetővé a megkívánt pontosságú heteroatom távolság meghatározását, ezért az LBHB azonosítására annak egyéb jellegzetes tulajdonságait használják:

(i) LBHB-ban a hidrogén különleges kémiai környezetben van, így a protonnak sajátos, ún. low-field kémiai eltolódása van az NMR spektrumban ($\delta \approx 16-20$ ppm) (3);

(ii) a deutérium a legtöbb esetben a gyenge hidrogén kötésétől jellegzetesen eltérő izotóp effektust produkál az IR nyújtási frekvenciára (ν_{AH}/ν_{AD}), illetve az NMR kémiai eltolódásra ($|\Delta|\delta_H - \delta_D| \approx 0.5-0.9$) (ami azt mutatja, hogy a hidrogén és a deutérium más-más kémiai környezetet „érez” ugyanabban a kötésben, és pl. a deutérium kisebb kémiai eltolódása jelzi, hogy az általa kialakított hidrogén kötés gyengébb, kevésbé LBHB jellegű, a két heteroatom közötti potenciális energiagát magasabb, mint a hidrogén esetében (lásd 1. ábra)) (3);

(iii) az $P-H + S-D \leftrightarrow P-D + S-H$ egyensúly (ahol S az oldószert, P a fehérjét, illetve H és D a hidrogént illetve a deutériumot reprezentálja), egyensúlyi állandója, az ún. megoszlási hányados, „D/H fractionation factor” (ϕ), mely kis molekulákban előforduló erős hidrogén kötés esetében 1-nél jelentősen kisebbnek adódott ($\phi \leq 0.6$) (3,7,8). Ha például 50-50% H_2O-D_2O oldószer elegyben vizsgálunk egy, az oldószerral

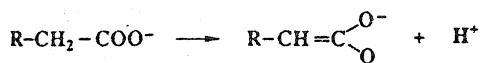
egyensúlyba került fehérjét, akkor több, mint 62.5%-ban kell hidrogént, és ennek megfelelően kevesebb, mint 37.5%-ban kell deutériumot tartalmaznia az adott kötésnek ahhoz, hogy azt LBHB-nak tekinthessük.

A D/H megoszlási hányados (φ), mint a hidrogén kötés erősségével jól korreláló paraméter, érdekes és fontos információval szolgálhat a fehérjék szerkezetéről, stabilitásáról is. A *Staphylococcus* nukleázban peptid gerinc amid protonokra mért D/H megoszlási hányados (φ) például 0.3 és 1.8 értékek közé esik, és míg az átlag φ a fehérje felületén kb. 1.0, addig az egész fehérjére mért átlag kb. 0.8, jelezve, hogy az *intramolekuláris* hidrogén kötések erősebbek a fehérjében, mint a fehérje és az oldószer között kialakult hidrogén kötések, és, hogy az intramolekuláris hidrogén kötés rendszer fontos stabilizáló tényező a natív fehérjében (9). A legkisebb φ értékek ($\varphi=0.3-0.6$) azokra az amidokra adódtak, amelyek hidrogén kötés donorok Asp vagy Glu aminosavak oldallánc karboxiljaival szemben. Az egyik ilyen hidrogén kötés a Thr120-Asp77 ($\varphi=0.3$) aminosavak között alakul ki. Ez a hidrogén kötés, mint azt irányított mutagenézissel igazolták, rendkívül fontos, mondhatni kritikus a fehérje stabilitásának szempontjából, és döntő szerepet játszhat abban is, hogy a fehérje alacsony pH-án ($\text{pH}<5$), ahol az Asp77 oldallánca protonált, nem stabil (10).

Az LBHB és az enzimkatalízis

Számos enzim által katalizált folyamatban az enzim valamely bázikus csoportja protont vesz át egy gyengébb, sok esetben több (akár 23!) nagyságrenddel kisebb savi disszociációs állandójú (pK_a) savtól. A biokémikusokat régóta foglalkoztatja ez a talány és a hozzákapcsolódó kérdés, hogy az enzim hogyan képes ezt a folyamatot elősegíteni, hogyan stabilizálja a nagy energiájú átmeneti állapotot, melyben a gyengébb sav protonál egy több nagyságrenddel erősebb savat.

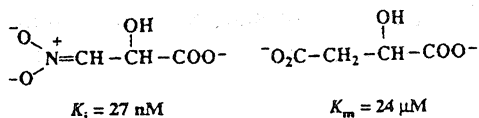
Vegyünk egy példát: a malát (almasav) 3R protonját (C-H, $\text{pK}_a>30$) a fumaráz enzim egyik oldallánc karboxil csoportja veszi át, melynek pK_a -ja a szubsztrát jelenlétében kb. 7 (3. ábra) (11).



3. ábra

A pK_a különbség az enzim-szubsztrát komplexben a donor és az akceptor csoport között láthatóan több, mint 23 egység. Ez pedig azt jelenti, hogy a C-H sav pK_a -ja legalább 23 egységet kell, hogy csökkenjen ahhoz, hogy protonálni tudja a karboxilátot. Ez hozzávetőleg 31 kcal/mol energia befektetése árán valósulhat meg. A kérdés tehát az, hogy az enzim miből képes fedezni ezt a kb. 31 kcal/mol energiát.

Első közelítésben az átmeneti állapot szoros kötését érdemes megvizsgálni. Kétségtelen, hogy az átmeneti állapot szoros kötése, stabilizálása nagyban hozzájárul az aktiválási energia csökkentéséhez. Az átmeneti állapot analógok ellen termeltetett, katalitikus aktivitással rendelkező antitestek meggyőzően igazolják ezt az elképzelést, hiszen az antitest átmeneti állapottal komplementer felszíne enzimmé viselkedik és az adott átmeneti állapot analógnak megfelelő reakciót katalizál úgy, hogy közben Michaelis-Menten kinetikát követ. Továbbra is kérdés azonban, hogy mekkora a szoros kötés hozzájárulása az aktiválási energia gát leküzdéséhez, mert igaz ugyan, hogy a katalitikus antitestek enzimmé viselkednek, és nagy affinitással kötik az átmeneti állapot analógokat, de tény, hogy messze nem érik el az enzimszerű aktivitást.



4. ábra

Visszatérve az előző példánkhoz, az átmeneti állapot analóg 3-nitro-laktát szoroson kötődik a fumarázhoz, kb. 900-szor jobban, mint a malát (4. ábra) (3,12)

A szubsztrát (K_m) és az átmeneti állapot analóg inhibitorok (K_i) kötési állandóinak arányát figyelembe véve (mint láttuk 900 a malát és analógja esetében, és pl. 72 000 az izocitrát ill. nitro analógja esetében) Cleland és Kreevoy úgy véli (2,5), hogy az átmeneti állapot a szubsztráténál jobb sztérikus kötésének csak részben (a fumaráz esetében legfeljebb 6 kcal/mol) hozzájárulása lehet az átmeneti állapot stabilizálásához, és a fennmaradó (esetünkben 25 kcal/mol) energia nem magyarázható másként, mint az eredetileg gyenge hidrogén kötések reakció közbeni erős hidrogén kötéssé, LBHB-vá alakulásával. Így tehát a stabilizációhoz még hiányzó (pl. a 25 kcal/mol) energiát, vagy legalábbis annak jelentős részét az LBHB-k és a gyenge hidrogén kötések energia különbsége fedezné. Ez a modell elszámol az aktiválási energia gát leküzdéséhez szükséges energia forrásaival, és az átmeneti állapot szoros kötése mellett az LBHB reakció közben történő kialakulását is feltételezi.

Cleland és Kreevoy és mások (1-3,5,6) véleménye szerint az LBHB reakció közben történő kialakulása további enzimek működésére is magyarázatul szolgál: keto-szteroid izomeráz, trióz-foszfát izomeráz, citrát szintáz, karboxipeptidáz, szerin-proteinázok, stb.

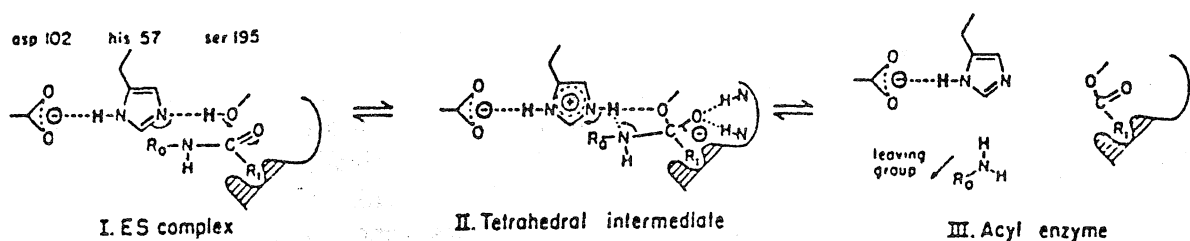
A dolgozat további részében a szerin-proteinázok katalízisével, és az abban szerepet játszó hidrogén kötésekkel, ezen belül az LBHB kialakulásának lehetőségével és szerepével foglalkozom.

A hidrogén kötések és az enzimkatalízis. A szerin-proteinázok.

Az élő szervezetekben a peptidkötés hidrolízisét proteinázok végzik. A peptidkötés spontán hidrolíziséhez tartozó moláris szabadenergia változás még neutrális pH-n is negatív (pl. egy Gly-Gly esetében $\Delta G^\circ = -2.3$ kcal/mol), ugyanakkor a reakció felezési ideje rendkívül nagy, kb. hét év (13). A reakciónak termodinamikai gátja tehát nincs, de a peptidkötés allil-anion típusú konjugációja (stabilizációs energia kb. 20 kcal/mol), mint az a felezési időből is látszik, tetemes kinetikai gátat emel a reakció elé. A proteinázok, mint a peptidkötés hidrolízisét katalizáló enzimek, feladata így nem más, mint csökkenteni a folyamat tetemes aktiválási energiáját, stabilizálni a nagy energiájú, konjugációt nem tartalmazó átmeneti állapotot, ily módon megnyitva az utat a szabadenergia csökkenése előtt. Mielőtt azonban rátérnénk a stabilizáció mikéntjének tárgyalására, tekintsük át röviden a szerin-proteinázok működését, katalízisük mechanizmusát.

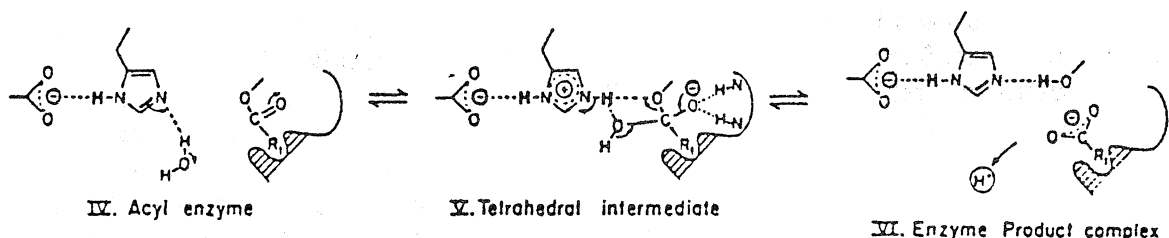
A szerin-proteinázok katalitikus egysége három, a peptidkötés hasításában szorosan együttműködő aminosavból, az ún. katalitikus triádból áll: Ser195-His57-Asp102 (számozás a kimotripszinben elfoglalt pozíció szerint). A katalitikus triád konformációja illetve konfigurációja minden ez idáig meghatározott térszerkezetű szerin-proteinázban nagyon hasonlóan mutatkozott. Ez a szerkezeti konzervatívizmus érvényes a szerin-proteinázok prokariótákban előforduló szubtilizin családjára is, amely primer és terciér struktúráját tekintve is önálló családot alkot, homológiát nem mutat az eukariótákra jellemző kimotripszin családdal. Tehát két különböző evolúciós út is ugyanahhoz a funkcionálisan aktív struktúrához vezetett (konvergens evolúció), ami arra enged következtetni, hogy csak korlátozott számú fehérje konformáció alkalmas a peptidkötés hidrolízisének összetett feladatát végrehajtani. Itt érdemes megemlíteni, hogy a humán citomegalovírus proteináz, amely egy szerin-proteináz, térszerkezete szintén hasonló katalitikus triád elrendezést mutat, de rendkívül érdekes módon a katalitikus aszparaginsav helyett egy hisztidint tartalmaz. A katalitikus triád tehát az ismert Ser-His-Asp helyett Ser-His-His szerkezetű (14-16).

A szerin-proteinázok katalitikus triádja egyidejűleg biztosítja az enzimatikus hidrolízishez szükséges nukleofil támadást (Ser195) és az elektrofil protonálást (His57), vagyis ún. általános sav-bázis katalízist valósít meg. További jellemzője a reakciónak, hogy két lépésben játszódik le: az első lépésben létrejön egy kovalens enzim-szubsztrát intermedier, az acil-enzim, ami a reakció második lépésében egy katalitikus víz molekula segítségével bomlik el:



5. ábra

Az acilálási reakció első lépésében a Ser195-O^γ nukleofil támadást intéz a szubsztrát peptidkötésének szén atomjára, aminek eredményeképpen kialakul a rendkívül rövid életű, negatív töltésű, tetraédes intermedier (vagy átmeneti állapot (?)), miközben a Ser195-O^γ-H protonálja a His57-N^ε-t. A tetraédes formát a Ser195 és Gly193 amid protonok alkotta ún. oxianion „üreg” (oxyanion-hole) stabilizálja, két hidrogén kötést kialakítva a szubsztrát negatív töltést hordozó oxigén atomjával. A reakció következő lépésében a pozitív töltésű imidazol oldallánc átadja protonját a szubsztrát hasítandó peptidkötésének N atomjának, ezzel elősegítve a tetraédes forma továbbalakulását, a peptidkötés bomlását. Kialakul a kovalens enzim-szubsztrát komplex, az acil-enzim. A távozó csoport (leaving group) eldiffundál az enzim felületéről, s a helyét egy víz molekula foglalja el.



6. ábra

A katalitikus víz molekula hidrogén kötést létesít a hisztidin imidazol oldalláncának N^ε atomjával, és nukleofil támadást intéz az acil-enzim karbonil szénatomjára. Kialakul a második tetraédes forma, ami, hasonlóan az acilálási lépéshez, a katalitikus hisztidintől kapott proton hatására alakul tovább, elhasad az enzim és a szubsztrát között kialakult kovalens kötés, majd a termék eltávozik az aktív, regenerálódott enzim felületéről (6. ábra).

Első közelítésben tehát a triád elemeinek szerepe a következő: a Ser195 β-OH csoportja maga a nukleofil reagens; a His57 imidazol gyűrűje egyrészt pozicionálja a vele hidrogén kötésben levő nukleofil β-OH csoportot, illetve készen áll arra, hogy átvegye tőle a protont, majd pedig átadja azt a szubsztrátnak; az Asp102 megfelelő konformációban stabilizálja az imidazol gyűrűt, hogy az el tudja látni a proton transzferben betöltött szerepét.

Mind az acilálási, mind a deacilálási lépés magában foglalja a tetraédes komplex képződését. A tetraédes formát, melyben megszűnik a peptidkötés konjugációja, ez idáig nem sikerült kimutatni („becsapdázni”), és közvetlen módon tanulmányozni. Ez a forma tehát mindenképpen egy rövid élettartamú, s így nagy energiájú intermedier, sőt, egyes vélemények szerint esetleg maga az átmeneti állapot. Akárhogyan is van, a tetraédes komplexnek szerkezetileg, kémiailag sokkal közelebb kell állnia a reakció átmeneti állapotához, mint a Michaelis komplexnek. Az átmeneti állapot stabilitásának

tanulmányozásakor, első közelítésben, tehát a tetraéderes komplexben fellelhető stabilizáló effektusokat érdemes szemügyre vennünk.

Az elektrosztatikus és a sztérikus effektus.

A tetraéderes komplex stabilizálásában fontos szerepet játszhat a $-+$ töltés eloszlás, azaz az elektrosztatikus effektus. Warshel és munkatársai szerint a negatív Asp102- pozitív His57- negatív oxianion elrendeződés elektrosztatikusan stabilizálja az utóbbin, azaz az átmeneti állapoton jelentkező negatív töltést (4,17). Számításaik szerint az elektrosztatikus stabilizáció elegendő magyarázattal szolgál az aktiválási energia leküzdésére. Ennek megfelelően az Asp102, túl a His57 aktív konformációjának rögzítésén, az átmeneti állapot elektrosztatikus stabilizálásában is fontos szerepet játszik. Nem meglepő tehát, hogy az Asp102-t irányított mutagenezissel Asn-re (tripszin) (18) vagy Ala-ra (szubtilizin) (19) cserélve a katalitikus aktivitás 4-5 nagyságrenddel csökken a natív proteinázéhoz képest. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ezeknek a mutációknak a hatása nem feltétlenül az Asp102 elektrosztatikus stabilizációban betöltött szerepét igazolja, hiszen hatással vannak a His57 konformációjára is, mint azt a tripszin Asp102Asn mutáns esetében a kristályszerkezet mutatja: az Asn102 hidrogén kötésben van ugyan a His57-tel, de azt a tautomer, inaktív formájában stabilizálja, melyben az imidazol gyűrű N^{ϵ} atomja protonált, míg az N^{δ} atom hidrogén kötés akceptor az Asn102 β -amidjával szemben. Ez a tautomer forma inaktív, hiszen a protonált His57 N^{ϵ} atomja nem tudja átvenni a protont a Ser195 hidroxil csoportjától, vagyis nem működhet a bázis katalízis, s így a sav katalízis sem.

Érdekes kérdés továbbá, hogy milyen elektrosztatikus stabilizációval kell számolnunk a humán citomegalovírus proteináz által katalizált reakció átmeneti állapotában, mely szerin-proteináz katalitikus triádjában az aszparaginsav helyett hisztidin található. Az átmeneti állapotban az Asp negatív töltésének megfelelő stabilizáció ugye nem jöhet számításba, de esetleg fontos tényező lehet az aktív hely környezetének elektrosztatikus hatása.

A sztérikus effektus vizsgálatához szükség van egy átmeneti állapot analóg inhibitor K_i -jének, és a megfelelő szubsztrát K_m -jének (K_s) összevetésére, hiszen minket az érdekel, hogy az átmeneti állapot mennyivel jobban kötődik az enzimhez, mint a szubsztrát. Az átmeneti állapot inhibitorok szerkezetileg a metastabil tetraéderes komplexre hasonlítanak, s közülük is a bórsav származékok és a peptid aldehid inhibitorok tekinthetők az átmeneti állapothoz szerkezetileg legközelebb álló modellnek. Van azonban egy lényeges különbség e két inhibitor típus között: az aldehidek egy hemiacetál adduktot képeznek a katalitikus szerinrel, mely töltést nem hordoz, míg a bórsav származékok az átmeneti állapothoz hasonlóan negatív töltést hordoznak a proteinázzal képzett komplexükben. Úgy tűnik tehát, hogy a bórsav származékok, különösen a peptid boronátok jobb átmeneti állapot analógok az aldehideknél illetve a hemiacetáloknál. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a komplexben a negatív töltés a bór atomon helyezkedik el, míg az átmeneti állapotban a karbonil oxigén hordozza azt. Egyes peptid boronátok annyira hatékony gátlószerek, hogy a K_i -jük a nM-os tartományba esik. Ilyen potens tripszin inhibitor például a Boc-Ala-Val-Lys-boronát, melynek K_i -je 7 nM (20). A kötési szabad energia $\Delta G_1^{\circ} = -11.4$ kcal/mol, s figyelembe véve, hogy az inhibitornak megfelelő szubsztrát (pl. Boc-Ala-Val-Lys-AMC) K_m -je a 10-100 μ M-os tartományba esik (tehát kb. 10^4 -szer szorosabb az inhibitor kötődése; $\Delta G_s^{\circ} \approx -5-6$ kcal/mol), a kötési szabad energiából jelentős mennyiség, kb. 5-6 kcal/mol fordítódik az átmeneti állapot stabilizálására ($\Delta G_1^{\circ} - \Delta G_s^{\circ}$). Ha azonban jobban belegondolunk, akkor nyilvánvalóvá válik, hogy a stabilizációs energiába, a sztérikus effektuson túl, beleszámoltuk az elektrosztatikus stabilizációt is, sőt az inhibitor és az enzim között kialakult kovalens kötés kötési energiájának hozzájárulását is. Hiszen a borát-enzim komplex nemcsak térbeli elrendeződését tekintve, hanem töltésviszonyait és kötésrendszerét illetően is hasonlít az átmeneti állapothoz (kovalensen kötődik az aktív szerinhez). Ez a példa is jól illusztrálja, hogy nehéz az egyes stabilizációs effektusokat szétválasztani, és külön-külön vizsgálni.

Hidrogén kötések 1. Az Asp102-His57 diád, az LBHB szerepe.

Az elektrosztatikus és szterikus effektusokon túl az erős (LBHB) hidrogén kötések kialakulásának is fontos szerepe lehet a szerin-proteinázok katalízisében (1-3,5,6). Frey és munkatársai úgy vélik, hogy az Asp102 és a His57 között, a reakció átmeneti állapotában kialakuló LBHB jelentős szerepet játszik az aktiválási energia csökkentésében, azaz a reakció sebességének növelésében, a katalízisben (3,6). Mint láttuk, a szerin-proteinázok katalizálta peptidkötés hidrolízis átmeneti állapotában a His57 protonált, pozitív töltésű, míg az Asp102 negatív töltést hordoz. Így, első közelítésben, az átmeneti állapot Asp102(-)His57(+) diádjának modellezésére egyszerűen az alacsony, a His57 pKa-ja (kb. 6-7) alatti pH-án, például 3.5-es pH-án oldott enzim szolgálhat.

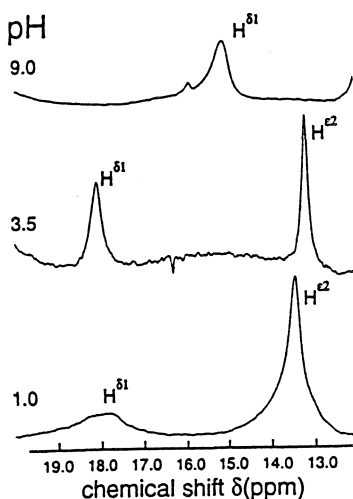
Először vizsgáljuk meg ezt a diádot, és vegyük sorra azokat az eredményeket, melyek alátámasztják az LBHB kialakulását. Ezt követően pedig az LBHB-vel szemben támasztott követelményeket tekintsük át, és azt, hogy mennyiben felel meg ezeknek a követelményeknek az Asp102 és a His57 között az átmeneti állapotban meglévő hidrogén kötés.

(i) *A kémiai eltolódás.* A szerin-proteinázok, sőt zimogénjeik NMR spektrumában is található egy, a többi protonétól jól elkülönült jel az ún. low-field régióban, mely proton kémiai eltolódása (δ_H)

pH 9-en (neutrális His57-negatív Asp102) kb. 15 ppm;

pH 3.5-en (pozitív His57-negatív Asp102) kb. 18 ppm;

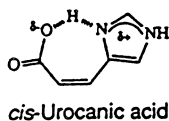
és pH 1-en (pozitív His57-neutrális Asp102) szintén kb. 18 ppm (8) (7. ábra).



7. ábra Kimotripszinogén NMR spektrumának low-field régiója pH 9-en, pH 3.5-en és pH 1-en. (2mM kimotripszinogén, $T = 1^\circ\text{C}$, H_2O -ban)

Azonosítva ezt a proton jelet kiderült, hogy az nem más, mint a His57N^δ atomhoz kötődő hidrogén, azaz az a hidrogén, ami a His57 és az Asp102 közötti hidrogén kötés alkotja. Ez a proton mindenképpen különleges környezetben kell, hogy legyen, hiszen az imidazol illetve az imidazólium ion kémiai eltolódása CDCl_3 -ban „mindössze” 11.4 illetve 12.2 ppm-nek adódik (3,21). Kis molekulákban előforduló LBHB-k NMR spektroszkópiai tanulmányozása azt mutatja, hogy az LBHB-ben levő hidrogén a spektrum low-field régiójában (16-20 ppm) ad jelet (2. és 8. ábra). Az alacsony pH-án (pH 3.5-en) mért kémiai eltolódás (18 ppm) tehát arra utal, hogy a protonált His57 és az Asp102 között erős hidrogén kötés, LBHB alakul ki. Ez a low-field proton jel az átmeneti állapot analóg peptid-boronát inhibitorokkal képzett komplexekben is megtalálható (22), jelezve egyrészt, hogy az alacsony pH-án tanulmányozott enzim ebből a szempontból jó modelljeként szolgált az átmeneti

állapotnak, másrészt pedig hogy az átmeneti állapotban is megtörténik a His57 protonálódása során az LBHB kialakulása.



8. ábra

proton jel, összhangban azzal, hogy a transz izomerben nem alakulhat ki hidrogén kötés a karboxil- és az imidazol-csoportok között (3).

Kis molekulák esetében korreláció figyelhető meg a hidrogén kötésben levő protonok kémiai eltolódása és a hidrogén kötés erőssége között (23). Figyelemre méltó, és óvatosságra int azonban, hogy kimotripszinogénben a hisztidin N-H^{δ1} protonja ugyanakkora kémiai eltolódást mutat pH 3.5-ön és pH 1-en (protonált, neutrális Asp102), annak ellenére, hogy mind a D/H megoszlási hányados (0.4 illetve 1.4), mind pedig az oldószerrel szembeni proton kicserélődés aktiválási entalpiája (11.9 illetve ~ 0 kcal/mol) arra utal, hogy a hidrogén kötés energiája csökkent, a kötés gyengült az alacsonyabb pH-n (8). Tehát komplex makromolekulák esetében valószínűleg nem várhatunk egyszerű összefüggést a kémiai eltolódás és a hidrogén kötés energiája között.

További meglepő tulajdonsága a His57 N-H^{δ1} protonnak, hogy rendkívül nagy az oldószerrel szembeni proton kicserélődés sebessége, vagyis alacsony a védettségi tényezője, az ún. „protection factor”-a. Ez több nagyságrenddel kisebb, mint a temetett, oldószer számára hozzá nem férhető váz amid protonoké, annak ellenére, hogy az Asp102-His57 diád nem a molekula felszínén található. A proton ezen tulajdonságának köszönhető, hogy NMR jele csak alacsony hőmérsékleten (pl. 4 °C) jelenik meg a spektrumban, ahol a kicserélődés sebessége már kisebb. Magasabb hőmérsékleteken (pl. szobahőn) a jel a kicserélődés nagy sebessége miatt kiszélesedik, s így eltűnik a spektrumból (8,24,25). A His57 N-H^{δ1} proton ezen tulajdonsága jellemző az egész vizsgált pH tartományban (pH 1-9).

Ez a karakterisztikus low-field proton jel jellemző az ép katalitikus diádra, s így az aktív enzim egyik indikátora lehet. Ezt a tulajdonságát kihasználhatjuk az enzim aktivitását, a triád integritását bizonyítani kívánó kísérleteinkben. A jel eltűnése ugyanis azt jelzi, hogy szerkezeti változás következett be az enzim aktív centrumában. Információval szolgálhat például folding-unfolding, autolízis vizsgálatokban az aktív forma kialakulásáról-eltűnéséről. Ezt a karakterisztikus low-field proton jelet használtuk mi is az α₁-proteináz inhibitor-patkány tripszin komplex szerkezetének, és közvetve az inhibitor működésének tanulmányozására. Az α₁-proteináz inhibitor a serpin (szerin-proteináz inhibitor) inhibitor család tagja. Mai tudásunk szerint a serpinek stabil acil-enzim, tehát kovalens, komplexet képez a proteinázzal (26-28). A munkánk egyrészt a stabilizáció mechanizmusának illetve a komplex szerkezetének felderítésére irányul. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy az ismert, inhibitorban bekövetkező átrendeződésen túl jelentős szerkezeti változás következik be a tripszinben is a komplexálás során (28). További kísérleteink megerősítették ezt a megállapításunkat (29). Felmerült a kérdés, hogy ez az enzimben bekövetkező átrendeződés mennyiben érinti az aktív helyet, a katalitikus triádot, és a konformáció változás mennyiben hozható összefüggésbe az inhibitor működésével, az acil-enzim stabilizálásával. Ennek a kérdésnek a megválaszolására használtuk a triád e karakterisztikus kémiai eltolódású proton jelét. Érdekes módon, az egyéb módszerekkel kimutatott szerkezeti változások ellenére, a low-field régióban megjelent a proton jel (29), jelezve, hogy az Asp102-His57 diádot nem érinti jelentősen az enzimben bekövetkező szerkezeti változásban. Az NMR jel azonban egyéb információkkal is szolgált: egyrészt alacsony hőmérsékleten is kiszélesedett, ami a nagyobb sebességű oldószerrel szembeni proton cserélődésnek a jele; másrészt a pH-függése megnövekedett protonaffinitású His57-t (pK_a kb. 8, szemben az aktív tripszinben mérhető 7 alatti értékkel) mutat (29). Mindkét eredmény a diád környezetének változására utal, aminek,

Hasonló N^{.....}H^{.....}O, imidazol-karboxil hidrogén kötés alakul ki a cisz urokánsavban is (8. ábra). E modell molekulában a kérdéses proton kémiai eltolódása szerves oldószerben 17.4 ppm, összhangban a hidrogén kötés LBHB jellegével. A molekula transz izomere NMR spektrumában azonban nem jelenik meg a low-field

úgy véljük, fontos szerepe lehet az acil-enzim stabilizálásában, a deacilálás enzimatis katalízisének gátlásában (29).

(ii) *Deutérium izotóp effektus a kémiai eltolódásra.* A kimotripszin His57 N-H^{δ1} protonjának pH 3.5-en mért kémiai eltolódása 18.3 ppm. Ezzel szemben, ha deutériumra cseréljük ezt a protont, akkor a deutérium kémiai eltolódása csak 17.3-nek adódik (3). Az izotóp effektus tehát: $|\delta_H - \delta_D| = +1.0 \pm 0.4$ ppm. Ez az érték abba a tartományba esik, amit a kis molekulákban előforduló LBHB-k esetében mértek: 0.5-0.9 ppm (7) Ezzel szemben mind a gyenge, mind a nagyon erős hidrogén kötésekre nulla ppm körüli izotóp effektus jellemző. Ez azért van, mert a gyenge hidrogén kötésben mind a hidrogén, mind a deutérium ugyanúgy csak az egyik atomhoz tartozik, míg a nagyon erős hidrogén kötés esetében akár hidrogén, akár deutérium van a kötésben, azok mindkét atomhoz egyformán kötődnek, vagyis egyik esetben sem kell számottevő izotóp effektussal számolnunk. Ezzel szemben az LBHB esetében a hidrogénnek számottevően kisebb gátat kell megmásznia a két heteroatom között, mint a deutériumnak, s így a hidrogéne könnyebben osztozik a két heteroatom, míg a deutérium inkább csak az egyikhez tartozik (1. ábra). Tehát itt egyszerűen a potenciális energiagát változásának differenciáló hatásáról van szó, ugyanis akkor maximális az effektus, ha a gát nagysága az izotóp effektus energiájával összemérhető.

(iii) *A D/H megoszlási hányados (ϕ).* Általában azt mondhatjuk, hogy az erős hidrogén kötések, azaz LBHB esetében a $\phi \leq 0.6$, míg ha $\phi \approx 1$, akkor gyenge hidrogén kötéssel állunk szemben (7). A katalitikus triád töltési viszonyaitól jelentős mértékben függ a D/H megoszlási hányados. A His57 N-H^{δ1} protonjának ϕ értéke kb. 2-ről 0.4-re csökken ahogy a pH 9-ről 3.5-re változik, és ismét 1.4-re nő, ahogy a pH 1-re csökken (8). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a His57 és az Asp102 közötti hidrogén kötés a triád egyszeresen protonált állapotában (protonált hisztidin; pH 3.5) a legerősebb, és a $\phi=0.4$ érték megfelel az LBHB-vel szemben támasztott követelményeknek. A nem protonált, aktív proteinázban (pH 9; $\phi=2.0$), és a kétszeresen protonált enzimben (mind a His57, mind az Asp102 protonált; pH 1; $\phi=1.4$), a hidrogén kötés jelentősen gyengébb (8).

Ezek után tekintsük át az LBHB kialakulásával szemben támasztott egyéb követelményeket. A modell vegyületekben LBHB csak abban az esetben volt kimutatható, amikor víz nem volt jelen az oldószerben. Warshel és munkatársai (4) úgy vélik, hogy általában poláros folyadékokban a hidrogén kötések polarizáltak. Így az inkább szimmetrikus LBHB kialakulása nem kedvezményezett folyamat, sőt, mivel az enzimek aktív helyei is általában az ionos átmeneti állapotokat stabilizálják (szolvatálják, inkább, mint deszolvatálják azokat), az enzimek aktív helye aszimmetrikus, polarizált hidrogén kötések tartalmaz, és nem a szimmetrikus LBHB-kat.

Fontos további követelmény az LBHB kialakulásával szemben az, hogy a hidrogén által összekötött heteroatomok pK_a-ja közel azonos legyen. Az Asp karboxil csoport pK_a-ja vízben kb. 4.5, míg a His imidazólium csoportjéé kb. 7. Nemvízes, apoláris mikro környezetben, mint amilyen az enzimek aktív helye, azonban a pK_a értékek jelentősen eltérhetnek a vízben mért értéktől. Így elvileg elképzelhető lenne, hogy a His57 és az Asp102 proton affinitása megközelítőleg egyenlő a szerin-proteinázok esetében (3). Az aktív hely azonban a negatív töltésű átmeneti állapot stabilitását szolgálja, s mint ilyen inkább polarizálja az Asp- His diádot, semmint apoláris körülményeket teremt. Így tehát a pK_a -k nivellálódása helyett, megfelelően az enzimben mért értékeknek, inkább azok differenciálódásával kell számolnunk (4). (Asp102 pK_a kb. 2.5; illetve His57 pK_a kb. 7).

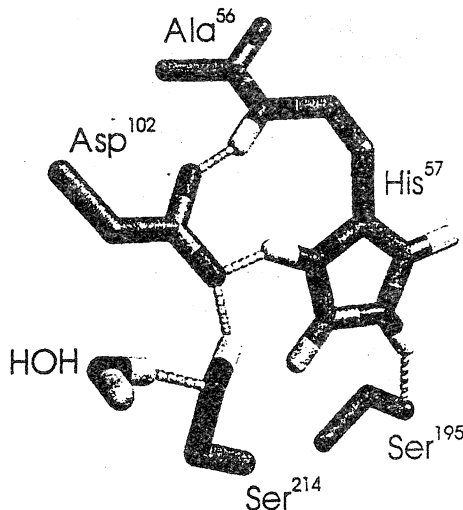
Mindezek ellenére a fenti eredmények ((i), (ii), (iii)) összhangban vannak azzal az elképzeléssel, hogy a reakció átmeneti állapotában az Asp102 és a His57 között kialakult hidrogén kötés, ha nem is elégíti ki az maradéktalanul az LBHB-vel szemben támasztott követelményeket, erős hidrogén kötésnek tekinthető. Az erős hidrogén kötés, vagy LBHB stabilizációs energiája, mely kb. 12-20 kcal/mol, hozzájárul a nagy energiájú átmeneti állapot stabilizációjához. Ez az aktiválási energia csökkentését jelenti, de csak az eredetileg gyenge hidrogén kötés és a belőle kialakuló LBHB energia különbségének megfelelő mértékben, ami

szerin-proteinázok esetében Frey és munkatársai (3) szerint csupán 5-7 kcal/mol. Itt emlékeztetnék a tripszin és az átmeneti állapot analóg Boc-Ala-Val-Lys-boronát inhibitor esetére, amikor is a stabilizációs energia 5-6 kcal/mol értéknek adódott. Észre kell vennünk, hogy ebben, túl a már említett szterikus, elektrosztatikus és kovalens stabilizáción, még az LBHB effektus is benne foglaltatik, hiszen az enzim-inhibitor komplexben protonált, pozitív töltésű a His57. Más tripszin-peptid boronát komplexben ki is mutatták a low-field proton jelet (22). Láthatóan tehát nincs könnyű dolgunk akkor, amikor akár a komplex, akár magának az átmeneti állapot stabilizációjának kérdésével foglalkozunk, és az egyes effektusok stabilizációs energiához való hozzájárulását kívánjuk megállapítani.

A továbbiakban tekintsük át az aktív hely egyéb hidrogén kötéseit, és vizsgáljuk meg szerepüket a katalízisben.

Hidrogén kötések 2. A Ser195-His57 diád

Arra vonatkozóan ugyan nincs adat, hogy kimotripszinogénben milyen a His57 N^ε Ser195 O^γ közötti hidrogén kötés pH 9-en (a Ser195 a donor), de az mindenesetre tény, hogy pH 3.5-en (His57 a donor) meglehetősen erős hidrogén kötés alakul ki ($\phi=0.7$), ami megmarad pH 1-en is ($\phi=0.5$; szintén a His57 a donor) (8). Tehát azon túlmenően, hogy az Asp102-His57 diád protonálása növeli a közöttük levő hidrogén kötés erősségét, a His57 protonált formájában a Ser195-His57 diád is erős hidrogén kötéssel kötődik egymáshoz. Ennek alapján felvethető, hogy a stabilizálás nemcsak az Asp-His diád hidrogén kötés energiájában bekövetkezett változásnak tudható be, hanem valószínűleg az aktív hely, (a triád és a környező csoportok (9. ábra)) hidrogén kötés „hálózatának” egészére kiterjed (8).



9. ábra A katalitikus triád hidrogén kötés rendszere

Ebben a hidrogén kötés hálózatban a Ser214 aminosav is benne foglaltatik. Ez az aminosav az Asp102 poláris, oldószertől elzárt üregének kialakításában vesz részt két temetett víz molekula valamint az Ala56 illetve His57 aminosavak gerinc amidjaival együtt. Maga a Ser214 oldallánc az oldószer számára nem hozzáférhető, és két hidrogén kötetést alakít ki az Asp102 karboxil csoportjával, valamint az egyik temetett víz molekulával.

Hidrogén kötések 3. Az oxianion „üreg”.

Az oxianion üreg, mint a reakció mechanizmusának tárgyalásánál láttuk, két hidrogén kötetést alakít ki a reakció átmeneti állapotával, s így feltehetően fontos szerepet játszik annak stabilizálásában. A kimotripszin családba tartozó szerin-proteinázokban a Ser195 és a Gly193 gerinc amid protonjai alkotják az oxianion üreget, míg a szubtilizin család proteinázai esetében ugyancsak a katalitikus szerin (Ser221) amid protonja, valamint az Asn155

oldalláncának amid protonja vesz részt az üreg kialakításában. Az, hogy a szubtilizin oxianion üregének az egyik hidrogén kötését egy oldallánc amid szolgáltatja, lehetőséget ad arra, hogy irányított mutagenezis segítségével vizsgáljuk ezen kötés szerepét a katalízisben. Számos Asn155 mutáns készült, többek között az aszparaginnal izosztérikus, de hidrogén kötés kialakítására nem képes leucint tartalmazó mutáns (Asn155Leu, továbbá Asn155Ala, Asn155Gly stb), melynek peptid szubsztráton mért K_m értéke gyakorlatilag megegyezik a natív enzimével, a katalitikus aktivitása (k_{cat}) azonban 200-300-szor kisebb a natív szubtilizinre jellemző k_{cat} értéknél (30). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az oxianion üreg esszenciális szerepet játszik a katalízisben, és az átmeneti állapot stabilizálásához kb. 3-5 kcal/mol energiával járul hozzá.

White és Wharton (31) acil-kimotripszin származékok FT-IR spektroszkópiái tanulmányozása során azonban azt találta, hogy az „alap állapotban” (ground-state) is megvannak az oxianion üreg-szubsztrát hidrogén kötések, és ezek mint elektronos aktivátorok játszhatnak szerepet a katalízisben. Úgy vélik továbbá, hogy ha az alap állapot kötési energiája a szubsztrát átmeneti állapot irányában történő aktiválására fordítódik, akkor a hatás mindig a k_{cat} -ban, és nem pedig a K_m -ben jelentkezik. Ezek szerint a szubtilizin Asn155Leu mutáns 200-300-szor kisebb k_{cat} értéke nem feltétlenül az oxianion üreg átmeneti állapot stabilizálásában betöltött szerepére szolgáltat bizonyítékot, hanem lehet, hogy éppen az alap állapot csökkent aktiválásáról árulkodik.

Konklúzió

Összegzésképpen megállapíthatjuk, hogy az enzim katalizált folyamat aktiválási energiájának csökkentésében részt vevő effektusok, az átmeneti állapot és az egyéb köztes, nagy energiájú formák stabilizálása és ezek kémiai szerkezete, egy szóval maga az enzim katalízis folyamata még nem teljesen tisztázott. Azt azonban az eredmények tükrében megállapíthatjuk, hogy a hidrogén kötéseknek nagy szerepe van az enzim katalízisben. Az erős (LBHB) hidrogén kötéseknek, mint például a szerin-proteinázokban az Asp102-His57 diád között a reakció átmeneti állapotában kialakuló erős hidrogén kötésnek, szerepe lehet több enzim reakció átmeneti állapotának stabilizálásában. Láttunk arra is példát, hogy az erős hidrogén kötés az enzim molekula stabilitásában, a szerkezet kialakításában és fenntartásában tölt be meghatározó szerepet (a Staphylococcus nukleázban a Thr120 gerinc amid protonja és az Asp77 oldallánca közötti kötés) (9). Míg a gyenge, vagy inkább gyengébb hidrogén kötések stabilizálhatnak nagy energiájú köztes állapotokat, intermediereket, sőt, mint láttuk az oxianion üreg hidrogén kötései esetében, nem szabad megfeledkeznünk az alap állapot aktiválásában betöltött szerepükről sem. Ez utóbbi pedig nagyon fontos effektus, White és Wharton szerint (31) a kimotripszin a peptid hidrolízis sebességét növelő hatásának akár a fele is az alap állapotban történő aktiválásnak köszönhető. Ebben az esetben a szubsztrát kötés energiája fordítódik arra, hogy pl. a hasítandó peptidkötést az oxianion hidrogén kötésein keresztül aktiválja. Továbbá arra, hogy előmozdítsa a peptidkötés és a katalitikus szerin kölcsönhatását, és így olyan állapotban stabilizálja az alap állapotot, ami egyébiránt a reakció koordinátán már egy magasabb energiájú állapotnak felel meg. Hát igen, ha jól bele gondolunk könnyebb is a Kékestetőt Mátraházáról megmászni, mint teszem azt Gyöngyösről.

Érdekes kérdés magának az átmeneti állapotnak a kémiai szerkezete. Érdekes, mert ha érteni akarjuk az aktiválási energia csökkentésének módját, tisztában kell lennünk a maximális energia tartamú állapot szerkezetével. A peptid kötés enzimátikus hidrolízise esetében a tetraéderes formát, vagy egy ahhoz közeli szerkezetet tekinthetünk átmeneti állapotnak, melyben a peptidkötés delokalizációja megszűnik. Többen felvetették már azonban, hogy elképzelhető egy olyan átmeneti állapot is, melyben nem szűnik meg teljesen a peptidkötés körül a delokalizáció, a peptidkötés planaritása is csak sérül, és nem tetraéderes a peptid síkból való kimozdulás sem (32,33). Ez az állapot ennek megfelelően kisebb energia tartamú volna, és így a reakció is egy eleve kisebb hegyet kényszerülne megmászni. Ezen a

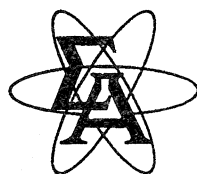
ponton érzékelhetjük, hogy már nem a biokémia hagyományos értelemben vett területén barangolunk, és látnunk kell, hogy ezeket a kérdéseket, melyek a reakció koordinátához tartozó kémiai szerkezeteket feszegetik nagyon nehéz, szinte lehetetlen kísérletesen vizsgálni. Az is valószínű, hogy a hagyományos egy vonal egy kötés szemlélettel ezek az állapotok nem írhatók le, nem értelmezhetők, és hogy a kémiai reakciók és az enzim katalizált folyamatok leírását az elméleti kémikusoktól várhatjuk.

Számomra még egy üzenete van az itt megemlített módszereknek, technikáknak és természetesen a segítségükkel meghatározható, általuk hozzáférhetővé tett információnak. Az szinte maga a csoda, hogy atomi felbontásban láthatjuk a fehérjéket, és engem még ma is lenyűgöz, hogy 3 dimenzióban, szinte személyesen találkozhatunk kutatásunk tárgyával. Tisztában kell azonban lennünk azzal, hogy ez a szerkezet még nem minden, amit tudunk kell az enzimekről ahhoz, hogy megértsük működésüket. Egyrészt a kristály szerkezet meghatározásakor a kiátlagolódások miatt sok olyan információ elvész, amelyeknek döntő szerepe lehet a funkcióban (34), hiszen azok az átlagtól eltérő szerkezetek is eltűnhetnek, amelyeknek szerep jut a működés során. (A Ferencváros focistáinak „átlagos” pozíciói a csapat játékaról szinte semmit nem mondanak, például Lisztes Krisztián kezdőkörbeli átlagos pozíciójából nehéz lenne levézetni a Newcastle-nak rúgott két gólját.) Másrészt láthattuk, hogy mennyi érdekes és fontos információt rejteget az „átlag” kristály szerkezet az enzim hidrogén kötéseiről, dinamikus viselkedéséről, termodinamikájáról, az enzim „életéről”, amelyek azonban más módszerek (NMR, FT-IR) alkalmazásával hozzáférhetővé válhatnak a számunkra. Ezek az információk pedig nélkülözhetetlenek az enzimek működésének, katalízisének megértéséhez.

Irodalomjegyzék

1. J.A. Gerlt and P.G. Gassman, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11552 (1993)
2. W.W. Cleland and M.M. Kreevoy, *Science* **264**, 1887 (1994)
3. P.A. Frey, S.A. Whitt, J.B. Tobin, *Science* **264**, 1927 (1994)
4. A. Warshel, A. Papazyán, P.A. Kollman, *Science* **269**, 102 (1995)
5. W.W. Cleland and M.M. Kreevoy, *Science* **269**, 104 (1995)
6. P.A. Frey, *Science* **269**, 104 (1994)
7. F. Hibbert and J. Emsley, *Adv. Phys. Org. Chem.* **26**, 255 (1990)
8. S.N. Loh and J. L. Markley, *Biochemistry* **33**, 1029 (1994)
9. J.L. Markley and W.M. Westler, *Biochemistry* **35**, 11092 (1996)
10. A.P. Hinck PhD Thesis, University of Wisconsin-Madison (1993)
11. J.S. Blanchard and W.W. Cleland, *Biochemistry* **19**, 4506 (1980)
12. D.J. Porter and H.J. Bright *J. Biol. Chem.* **255**, 4772 (1980)
13. D. Kahne and W.C. Still *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7529 (1988)
14. L. Tong, C. Qian, M.J. Massariol, P.R. Bonneau, M.G. Cordingley, L. Lagacé *Nature* **383**, 272 (1996)
15. X. Qiu, J.S. Culp, A.G. DiLella, B. Hellmig, S.S. Hoog, C.A. Janson, W.W. Smith, S.S. Abdel-Meguid *Nature* **383**, 275 (1996)
16. H.S. Shieh, R.G. Kurumbail, A.M. Stevens, R.A. Stegeman, E.J. Sturman, J.Y. Pak, A.J. Wittwer, M.O. Palmier, R.C. Wiegand, B.C. Holwerda, W.C. Stallings *Nature* **383**, 279 (1996)
17. A. Warshel, G. Náray-Szabó, F. Sussman J.K. Hwang, *Biochemistry* **28**, 3629 (1989)
18. C.S. Craik, S. Roczniaik, C. Largman, W.J. Rutter, *Science* **237**, 909 (1987)
19. P. Carter and J.A. Wells, *Nature* **332**, 564 (1988)

20. B.A. Katz, J. Finer-More, R. Mortezaei, D.H. Rich and R.M. Stroud, *Biochemistry* 34, 8264 (1995)
21. J.H. Clark, M. Green, R.G. Madden, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 136 (1983)
22. L.Hedstrom, S. Farr-Jones, C.A. Kettner and W.J. Rutter, *Biochemistry* 33, 8764 (1994)
23. J.B. Tobin, S.A. Whitt, C.S. Cassidy and P.A. Frey *Biochemistry* 34, 6919 (1995)
24. G. Robillard and R.G. Shulman, *J. Mol. Biol.* 86, 519 (1974)
25. J.L. Markley and I.B Ibañez, *Biochemistry* 17, 4627 (1978)
26. G. Kaslik, A. Patthy, M. Bálint, and L. Gráf, *FEBS Letters* 370, 179 (1995)
27. D.A. Lawrence, D. Ginsburg, D.E. Diaz, M.B. Berkenpas, I.M. Verhamme, J.O. Kvassman and J.D. Shore, *J. Biol. Chem.* 270, 25309 (1995)
28. M. Wilczynska, M. Fa, P.I. Ohlsson and T. Ny, *J. Biol Chem.* 270, 29652 (1995)
29. G. Kaslik, J. Kardos, W.M. Westler, E. Szabó, P. Závodszy, J.L. Markley and L. Gráf *Biochemistry*-nek elküldve
30. P. Bryan, M.W. Pantoliano, S.G. Quill, H.Y. Hsiao and T. Poulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3743 (1986)
31. A.J. White and W. Wharton, *Biochem J.* 270, 627 (1990)
32. M. Komiyama and M.L. Bender, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 557 (1979)
33. Kaslik Gyula *Szakkdolgozat* (1992)
34. G.A. Petsko *Nature Struct. Biol.* 3, 565 (1996)



ÁLLÁSHÍRDETÉS

A Sigma-Aldrich International Holding Company magyarországi leányvállalata 1997. január 1-től munkatársat keres az alábbi munkakör betöltésére:

Technikai szaktanácsadás, elsősorban az élettudományok kutatásában alkalmazott vegyszereket, eszközöket, metodikákat illetően.

Feltételek:

- szakirányú egyetemi végzettség (2-3 éves szövettenyésztő / immunológiai/molekuláris biológiai laborgyakorlat előny)
- angol nyelvtudás
- PC-ismeret
- vezetői jogosítvány

A jelentkezők szakmai önéletrajzát (magyar és angol nyelven) a következő címre várjuk:

Sigma-Aldrich Kft
1067 Budapest
Teréz krt. 39.

Bővebb felvilágosítás: Dr. Gráf Márta, marketing manager 269-1288



BEMUTATKOZNAK A FRISSEN VÉGZETT MOLEKULÁRIS BIOLÓGUSOK

A három debreceni egyetem (DATE, DOTE és KLTE) együttműködésével megvalósuló molekuláris biológia szakirányú biológus képzés beindításáról a BIOKÉMIA 1993. szeptemberi számában adott hírt Fésüs László professor. Arról, hogy az első évfolyam az 1995/96 tanévben végzett a BIOKÉMIA 1996. júniusi számában feladott álláskereső hirdetésből értesülhettek az olvasók. Ezúton szeretnénk megköszönni azok segítségét akik álláslehetőségeikről tájékoztatást küldtek. Örömmel tapasztaltuk, hogy a végzetek számát meghaladó álláshelyet kínáltak fel, ami a molekuláris biológusok iránti reális igényt igazolja.

Az első végzős évfolyam különösen fontos volt a képzés szempontjából. Ők voltak azok akik saját bőrükön tapasztalhatták az újszerű egyetemközi oktatás kezdeti problémáit, akik aktívan közreműködtek a program fejlesztésében és ők lesznek azok akik tudásukkal megalapozhatják az új diploma értékét. Az elmúlt három évre visszatekintve megállapíthatjuk, hogy egy jó évfolyammal dolgozhattunk együtt. 21 hallgatóból 7 nyújtott be tudományos diákköri (TDK) pályázatot, illetve tartott tudományos előadást; 17 hallgató szerzett diplomát jórészt jó, illetve jeles eredménnyel; és 9 fő folytathatja tanulmányait egyetemi doktori (Ph.D.) iskolák keretében. Azt, hogy ezek a számok mennyi munkát takarnak csak a bennfentesek tudhatják. A BIOKÉMIA szerkesztőjének megítéző felkérésére a következő oldalakon két frissen végzett hallgatónk számol be eredményeiről.

Szegezdi Éva 1990-ben kezdte tanulmányait a KLTE biológus szakán. Három éves biotechnológusi alapképzést követően jelentkezett a FEFA által támogatott molekuláris biológus programba. A biokémia szakág hallgatójaként a DOTE Biokémiai Intézetében készítette el pályamunkáját majd diplomamunkáját. 1995-től bekapcsolódott az orvostanhallgatók biokémia oktatásába, emellett szakfordítói angolt tanul a KLTE-n. Szakfordítói államvizsgáját (ami megfelel a felsőfokú nyelvvizsgának) ez év végén fogja letenni. Tudományos munkáját a DOTE Biokémiai Intézetének Ph.D. hallgatójaként folytathatja.

Tóth Attila 1991-ben kezdte az egyetemet a KLTE biológus szakán. 1993-ban jelentkezett a molekuláris biológus szakirányú képzésre, ahol a biokémiai szakágat választotta. Először a DOTE Élettani Intézetében, majd a DOTE Orvosi Vegytani Intézetében végzett TDK munkát. Három pályamunkát készített és munkájáról több előadást tartott. Legszebb sikerét 1995-ben érte el, amikor az OTDK Orvostudományi Szekciójában I. díjat nyert. Mint a hallgatóság képviselője részt vett a Tanulmányi Bizottság munkájában. Diplomamunkáját a Vegytani Intézetben készítette, és az oktatás különböző szintjein nyújtott értékes segítséget témavezetőjének. Jelenleg a DOTE Orvosi Vegytani Intézetének Ph.D. hallgatója.

Közleményükben mindketten diplomamunkájuk eredményeit foglalták össze. Kérem fogadják megértő szeretettel az új biokémikus nemzedék képviselőinek első szárnypróbálgatásait.

Dr. Dombrádi Viktor
a Debreceni Universitas Egyesülés
Molekuláris Biológia Szervezetének igazgatója

A SZÖVETI TRANZGLUTAMINÁZ ÉS INVOLUKRIN EXPRESSZIÓ REGULÁCIÓJÁNAK TANULMÁNYOZÁSA TÍMUSZ INVOLÚCIÓ SORÁN

Szegezdi Éva
 DOTE Biokémia Intézet
 Témavezető: Dr. Szondy Zsuzsa

Bevezetés

Az *apoptózis*, vagy programozott sejtelhalás egy fiziológias sejtelavoltási forma. Számos alapvető biológiai jelenség - mint a metamorfózis, az embrionális morfogenezis, vagy a hormon indukált szövet-átrendeződés - meghatározó eleme (1). Az apoptózis során a sejt genetikailag meghatározott program szerint hal el. A folyamat a sejten belül játszódik le úgy, hogy a környező sejtek nem károsodnak, gyulladásos folyamat nem indukálódik (2).

Sok más folyamat mellett az apoptózis lényeges szerepet tölt be az immunrendszerben résztvevő sejtek minőségének, összetételének alakításában is. A limfoid rendszer feladata a káros antigének specifikus felismerése és eliminálása. A T-sejtek prekursorai a csontvelőben képződnek, innen vándorolnak a tímuszba, ahol osztódnak és differenciálódnak. Érésük során random géntrendeződéssel alakul ki és expresszálódik a specifikusért felelős T-sejt receptor/CD3 komplex. A megfelelő T-sejt receptort expresszáló timociták az antigént prezentáló sejtekkel való kölcsönhatás után pozitív szelekción esnek át és tovább fejlődnek. Bennük megjelenik a bcl-2 fehérje, mely véd az apoptotikus hatásokkal szemben. A tímuszsejtek 95 %-a viszont apoptózissal elhal (8), mivel vagy nem kötődik megfelelően az MHC komplexhez, vagy a saját antigént is felismeri. A pozitívan nem szelektált timociták érzékenyek a lokálisan érvényesülő apoptotikus hatásokra, mivel bennük nem termelődik bcl-2. Ilyen apoptotikus szignál többek között a glükokortikoid hormon (3), a T-sejt receptor aktiváció (9) és az ionizáló sugárzás (4). Bár e szignálok morfológiailag azonos apoptotikus folyamatokat indítanak el, bizonyított, hogy különböző transzkripciós faktorokon keresztül fejtik ki hatásukat: a glükokortikoidok a *glükokortikoid receptoron* keresztül hatnak, a T-sejt receptor aktiváció a *nur77* transzkripciós faktort szabályozza (10), míg ionizáló sugárzás hatására a *p53* faktor aktiválódik (11). A glükokortikoid receptor hiányában csak a szteroid elhalási útvonal, *nur77* hiányában csak a T-sejt receptor mediált, míg a *p53* hiányában csak a DNS károsodás okozta sejtelhalási út károsodik, a többi forma zavartalanul kiváltható.

A DOTE Biokémia Intézetben végzett kísérletek mutatták ki először, hogy az apoptózis során egy Ca^{2+} dependens enzim, a szöveti tranzglutamináz expressziója fokozódik, aktivitása növekszik (5). Az enzim a sejtfehérjék glutamil és lizil oldalláncai között izopeptid keresztkötéseket hoz létre, rezisztens fehérjehálózatot képezve ezzel az

apoptotikus testekben. Bár az enzim tényleges szerepe nem bizonyított, a rendelkezésünkre álló kísérletes adatok arra utalnak, hogy a folyamat során kialakuló apoptotikus testekben a sejtmembrán alatt létrejövő keresztkötött fehérjehálózat megakadályozza a sejttartalom kijutását, s ezzel az immunreakció kialakulását a környezetben (6). A keratinocita transzglutamináz egyik szubsztrátja az involukrin fehérje, melynek megjelenését a többrétegű laphámsejtek terminális differenciációja során mutatták ki. Úgy tűnik, involukrin szerű fehérje szolgál szubsztrátként a szöveti transzglutamináznak a májsejtek apoptózisa során is (7), így feltételezhetően más sejtek apoptózisa során is szerepet játszhatnak a fehérjeháló kialakításában involukrin vagy involukrin szerű fehérjék.

A szöveti transzglutamináz expressziójának fokozódását megtaláltuk tímusz involúció során is az apoptotikus sejtekben. A szérum Glu-Lys dipeptid tartalmának emelkedésével bizonyítottuk, hogy az enzim aktivitása is megnő. Bár eddigi eredményeink alapján tudjuk, hogy a szöveti transzglutamináz expressziója fokozódik a programozott sejtelhalás során, arról, hogy ennek szabályozása hogyan történik, még nincsenek adatok. Nem ismert, hogy a különböző apoptotikus szignálok a transzglutamináz gén promóterének azonos válaszoló elemét szabályozzák-e vagy mindegyikük más-más elemhez kapcsolódik. Nem ismert az sem, hogy az involukrin, amely szubsztrátja a keratinocita transzglutamináznak, expresszálódik-e a tímuszban, lehet-e szubsztrátja ott a transzglutamináznak, s ha ott megtalálható expressziója regulálódik-e apoptózis során.

E kérdések megválaszolásához olyan két transzgén egértörzset használtunk, melybe a transzglutamináz gén promóterének proximális, 4.2 kilobázisnyi szakasza, illetve az involukrin promóter van transzfektálva β -galaktozidáz riporter génnel. E két promóter működését vizsgáltuk különféle szignálokkal kiváltott apoptózis során. Kísérleteinkben beállítottunk egy β -galaktozidáz aktivitás-mérési módszert, mely segítségével különféle promóterekhez kapcsolt β -galaktozidáz enzimet hordozó egereken nem csak embrionális, hanem születés utáni és adult génexpresszió is egyszerűen tanulmányozható. E módszer segítségével bebizonyítottuk, hogy az involukrin fehérje nem expresszálódik tímuszsejtekben, míg a szöveti transzglutamináz igen, és a 4.2 kilobázisnyi szakasz hordozza mindazt az információt, amely szükséges ahhoz, hogy a transzglutamináz expressziója fokozódjon három különféle szignállal kiváltott apoptózis során.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok. A kísérletekhez két transzgén egértörzset használtunk. A TG 27 black 6 egerek Dr. Nagy Lászlótól származnak, a szöveti transzglutamináz promóterének proximális, 4.2 kilobázisnyi szakaszát hordozzák, β -galaktozidáz riporter génnel. Az involukrin gén teljes promóter régiója és β -galaktozidáz riporter gén van transzfektálva a másik, C2319 egértörzsbe, melyet Dr. Joseph M. Carrolltól kaptunk. A két egértörzset

a DOTE Kóréletani Intézetének állatházában tenyésztették. A transzgént hordozó egerek azonosítása háromhetes korban, a tímusz apoptózis indukció négyhetes korban történt. A timociták apoptózisának indukálására az egerek intraperitoneálisan 0.2 ml fiziológiás sóoldatban oldott 0.2 mg dexametazon-acetátot, 20 μg anti-CD3 antitestet, vagy 5 Gy besugárzást kaptak.

Szöveti transzglutamináz aktivitás-mérés. A kontroll és a kezelt állatokat a kezelés után 24 órával éterrel túlaltattuk, tímuszukat kivettük, homogenizáltuk. A transzglutamináz aktivitást [^3H] putreszin N,N'-dimetil-kazeinbe való beépülésével határoztuk meg.

DNS izolálása egérfarkakból. A vizsgálandó egereket a szülőktől háromhetes korukban választottuk el. Levágott farokvégeiket proteináz K-val emésztettük, majd három extrahálási lépésben (fenol; fenol:kloroform:izoamilalkohol (24:24:1); kloroform:izoamilalkohol (24:1)) a DNS-t a megmaradt fehérjétől megtisztítottuk. Az utolsó extrahálás után a DNS-t etanollal kicsaptuk, mostuk, majd steril desztillált vízbe 60 $^{\circ}\text{C}$ -on visszaoldottuk.

Polimeráz láncreakció (PCR). A két egértörzsbe transzfektált különböző DNS szakaszok felsokszorozása azonos módon történt. A PCR során a kétféle transzfektált génszakasznak egy 400 illetve 600 bázispárnyi részét sokszoroztuk fel Taq DNS polimerázzal. Ezen génszakaszok detektálása agaróz gélelektroforézissel és etidium-bromidos festéssel történt.

β -galaktozidáz aktivitásmérés. A transzgén egerekben lévő β -galaktozidáz riporter enzim aktivitását lumineszcenciás módszerrel mértük, a Galacto-light kemilumineszcens riporter esszé kitérő leírása alapján. A mérés alapja, hogy a kitérő tartozó szubsztrát enzim általi elhasításakor egy fényt emittáló vegyület szabadul fel. A mérés során kapott, az enzimaktivitást jellemző relatív emittált fényintenzitást (relative light unit) 1 mg fehérjére és 1 percre vonatkoztattuk.

Eredmények

Transzgént hordozó, pozitív, és nem hordozó, negatív egerek szöveteinek β -galaktozidáz aktivitása. A két egértörzsbe transzfektált különböző génszakaszok szervspecifikus expressziójának jellemzésére szerveket vettünk ki mindkét törzs negatív és transzgént hordozó egyedeiből és homogenizátumaikban meghatároztuk a β -galaktozidáz aktivitást. A pozitív egerek szövetei mindig magasabb aktivitást mutattak, mint a nem transzgén egerek szövetei. Azonban a negatív egyedek szöveteiben is nagyon magas β -galaktozidáz aktivitásokat mértünk. A törzstől függetlenül különösen magas aktivitást találtunk tímuszban, vesében, tüdőben és a lépben. Ezek a magas, transzfektációtól független β -galaktozidáz aktivitások csak endogén β -galaktozidáz aktivitású enzimeknek tulajdoníthatók.

Az irodalom, és a kitérő leírása az endogén β -galaktozidáz aktivitású enzimek inaktiválására 60 perces 48 $^{\circ}\text{C}$ -on történő hőkezelést javasol. A hőkezelés során az endogén enzimek inaktiválódnak, míg a bakteriális enzim nem sérül. Mérés előtt mintáinkkal elvégezve a 60 perces 48 $^{\circ}\text{C}$ -os inkubálást, az aktivitás szinte a vakkal

egyenértékűre csökkent. Nem láttunk különbséget a negatív és pozitív egerek szöveteinek β -galaktozidáz aktivitása között, és az irodalmi adatok alapján a C2319 törzsből erős β -galaktozidáz aktivitást mutató hámszövetben sem tudtunk aktivitást kimutatni.

Hogy kiderítsük, mi történik az enzimmel az inkubálás során, a következő kísérletsort állítottuk össze: Kiválasztottuk a C2319 törzset az irodalom és a saját eddigi adataink alapján magas β -galaktozidáz aktivitást mutató hámszövetét, valamint aktivitásértékével összevethető hígítású gyári E. coli β -galaktozidázt. Mértük az aktivitást külön-külön, és úgy, hogy az enzimet a szövethomogenizátumba tettük, hőkezelés nélkül és hőkezelve. A bakteriális enzim önmagában a hőkezelés során valóban alig vesz aktivitásából, de a szövethomogenizátumba oldott β -galaktozidáz enzim a 60 perces hőkezelés során szinte teljesen inaktiválódott. Feltételezhetjük, hogy az inaktivációért a homogenizátumban lévő proteázok voltak felelősek, ezért a méréseket megismételtük proteázgátlók jelenlétében is. Ekkor a mért aktivitások lényegesen nem csökkentek. Ezen adatok alapján a továbbiakban az aktivitások meghatározása előtt minden mintát proteázgátlók jelenlétében hőkezeltünk 60 percig 48 °C-on. Az így kapott aktivitásokat az I. táblázat mutatja.

I. TÁBLÁZAT
KÜLÖNFÉLE SZÖVETEK BEN HŐKEZELÉS UTÁN, PROTEÁZGÁTLÓK
JELLENLÉTÉBEN MÉRT β -GALAKTOZIDÁZ AKTIVITÁSOK
(RLU/perc/mg fehérje)

szövetek	C2319 törzs			TG 27 törzs		
	negatív	pozitív	különbség	negatív	pozitív	különbség
tímusz	1 146	1 200	ns*	1 830	3 500	<u>1 667</u>
tüdő	1 233	1 208	ns	1 760	1 550	ns
máj	1 025	1 010	ns	1 143	1 336	194
vese	823	710	ns	1 395	2 000	605
lég	663	685	ns	1 106	1 367	260
agy	-	-	-	1 266	1 200	ns
fül	1 591	153 300	<u>151 709</u>	2 000	1 834	ns

ns*: nem szignifikáns különbség

A C2319 törzsből az involukrin promóter expresszáldását csak a fülben figyeltük meg. A fül tartalmaz többretegű elszarusodó laphámot, így az itt mért aktivitás megegyezik a publikált adatokkal.

A TG 27 törzsből ugyanezen szövetek homogenizátumaiban mértük a transzglutamináz aktivitást is. A II. táblázatban a transzglutamináz aktivitások a pozitív és negatív egyedek szöveteinek β -galaktozidáz aktivitásának különbségeivel, a β -galaktozidáz alapaktivitásokkal van összevetve.

II. TÁBLÁZAT
TG 27 EGEREK SZÖVETEINEK TRANZGLUTAMINÁZ ÉS β -GALAKTOZIDÁZ
ALAPAKTIVITÁSA

szövetek	transzglutamináz aktivitás nmol putrescin/h/mg	β -galaktozidáz aktivitás RLU/perc/mg
tímusz	3.71	<u>1 667</u>
tüdő	13.3	0
máj	28.7	194
vese	35.67	605
lép	11.72	260
agy	0.9	0

A legmagasabb transzglutamináz aktivitást a vesében láttuk, de magas az aktivitás a májban és a tüdőben is. Ennél alacsonyabb a lép és a tímusz aktivitása. A legalacsonyabb aktivitás az agyban volt mérhető. A legerősebb β -galaktozidáz alapaktivitást a tímuszban láttuk, kismértékű alapexpresszió volt kimutatható a májban, a vesében és a lépben, de nem láttunk különbséget a negatív és pozitív egerek agy- és tüdőszövetének β -galaktozidáz aktivitásában.

A tímusz indukálható β -galaktozidáz aktivitása. A két egértörzsbe transzfektált promóterek regulációját a tímuszban a következő apoptotikus szignálokra vizsgáltuk: glükokortikoid, melynek hatását kísérletesen dexametazon intraperitoneális oltásával váltottuk ki, T-sejt receptor aktiváció, amit a TCR komplex elleni anti-CD3 antitest oltásával idéztünk elő és ionizáló sugárzás, melynek hatását irradiáció után néztük. Mindhárom indukció után mértük a tímusz tömegét az apoptózis mértékének megítélésére, a β -galaktozidáz és a TG 27 törzsben a transzglutamináz aktivitás változását is.

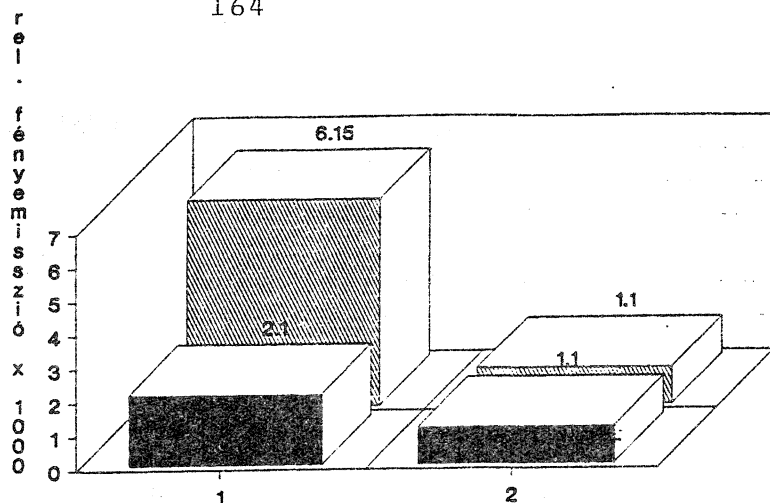
A C2319 törzsben mindhárom apoptotikus szignál hatására megfigyelhető volt a timocita apoptózist követő tímusz involúció, Ezzel egyidőben a pozitív egyedekben szignifikáns β -galaktozidáz aktivitás-növekedést nem tudtunk kimutatni. A tímusz tömegcsökkenése dexametazon, anti CD3 és irradiáció hatására 67 %, 69% és 74% volt a kezelést követő 24. órában.

Ugyanezen kísérletsort a transzglutamináz promótert hordozó egereken elvégezve a programozott sejtelhalást igazoló tímusz involúció és transzglutamináz aktivitás-növekedés mellett a pozitív egerekben a szignálok hatására a β -galaktozidáz aktivitás többszörösére növekedett (1. ábra).

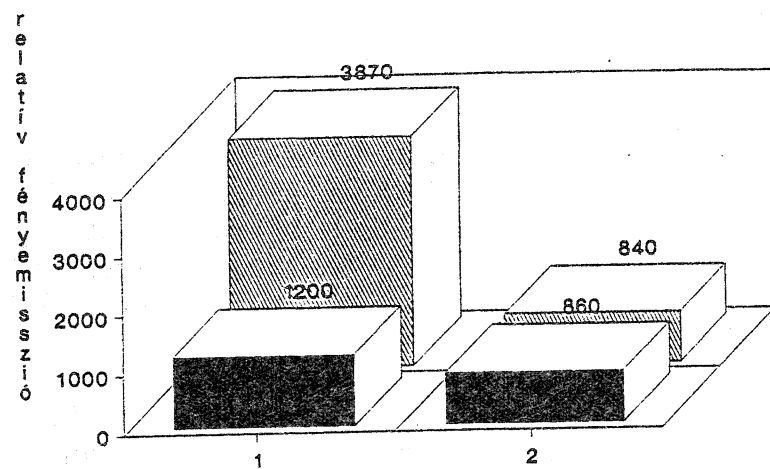
Diszkusszió

Mai ismereteink alapján az apoptózis molekuláris mechanizmusa során a jelátviteli folyamatok - melyek indukálódhatnak apoptotikus faktorok megjelenésével vagy túlélési faktorok eltűnésével - számos apoptotikus effektor elemet aktiválnak. Az effektor elemek általában irreverzibilis biokémiai reakciókat (DNS degradáció, proteolízis, keresztkötött

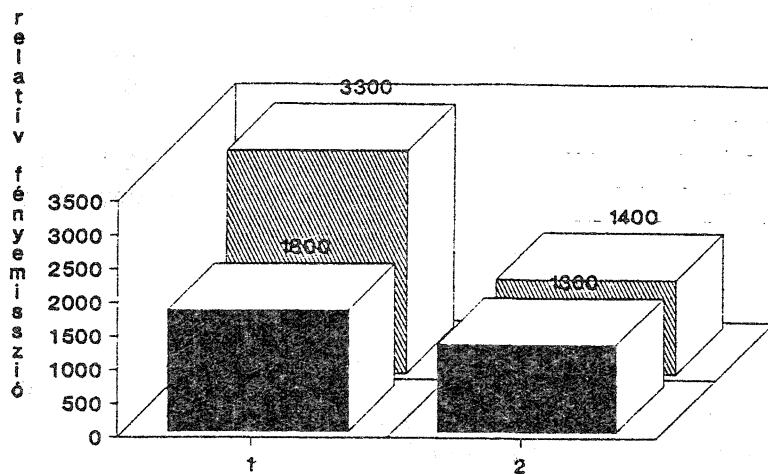
A



B



C



■ kezeletlenek ▨ anti CD3 kezelték

1: pozitív egerek 2: negatív egerek

1. ábra

Timocita apoptózis TG 27 egereken – β -galaktozidáz aktivitás
A: dezametazon kezelés, B: anti CD3, C: irradiáció

fehérje-hálózat kialakulása) katalizálnak. Nagyon keveset tudunk azonban arról, hogyan szabályozzák a különféle jelátviteli pályák az apoptózis ezen effektor elemeit.

A szöveti transzglutamináz tanulmányozása sokban segíthet az apoptózis induktor és effektor elemei közötti kapcsolat megértésében. Ennek oka az, hogy a szöveti transzglutamináz a transzglutamináz enzimes család egyedüli tagja, ami részt vesz az apoptotikus programban, szemben például az endonukleázokkal, és a proteázokkal, mely családoknak 2-3, vagy még több tagja is kapcsolódik az apoptotikus programhoz. Emellett azon kevés gén közé tartozik, melyek az apoptózis során mind a preapoptotikus mind az apoptotikus sejtekben kimutathatóan expresszálódnak. A transzglutamináz termelésének szabályozásáról jelenlegi ismereteink azonban hiányosak: nincsenek adatok sem a cisz sem a transz reguláló szekvenciák topográfiájáról a promotéren.

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a különböző apoptotikus szignálok egyetlen közös fehérje szabályozásával, vagy esetleg különböző válaszoló elemeket regulálva szabályozzák-e a transzglutamináz expressziót. Kísérleteinkhez a transzglutamináz promotérének proximális 4.2 kilobázisnyi szakaszát és β -galaktozidáz riporter gént hordozó transzgen egértörzset használtuk. A törzsön végzett korábbi embrionális expressziós

vizsgálatok hisztokémiai festéssel megállapították, hogy a szöveti transzglutamináz a fejlődő porcban, az interdigitális mesenchymában, az apikális ektodermális régiókban, valamint

vörösvérsejtekben, endothelben és az agy choroid plexusában expresszálódnak.

Emellett arra is választ kerestünk, hogy a transzglutamináz potenciális szubsztrátja, az involukrin expresszálódnak-e a tímuszban, illetve egyéb szövetekben, és apoptotikus szignálok hatására változik-e expressziója. A C2319 törzset létrehozó Joseph M. Carroll és munkatársai a transzfektált promotér szövetspecifikus expresszióját mRNS RT-PCR technikával vizsgálva β -galaktozidáz expressziót csak a többrétegű laphámban illetve a többrétegű laphámot tartalmazó szövetekben tudtak kimutatni.

A lacZ riporter konstrukciókat elsősorban hisztokémiai festésekkel detektálják az embrionális fejlődés során, de mi a szöveti transzglutamináz promotér működését adult egyedeken kívántuk vizsgálni, ezért első lépésként ki kellett dolgoznunk egy olyan módszert, amely alkalmas fenotípusos promotér aktivitás vizsgálatra felnőtt állatokon. Elsőként a β -galaktozidáz aktivitás-mérést állítottuk be.

Az egérszövetek β -galaktozidáz aktivitásának vizsgálatakor kimutattuk, hogy a szövetek magas endogén β -galaktozidáz aktivitással rendelkeznek, amelyek zavarják a mérést. Mindkét törzs összes szövetében a pozitív egerekben mért endogén β -galaktozidáz aktivitások magasabbak, mint a transzgent nem hordozó állatokban. A legmagasabb endogén aktivitást a C2319 törzs pozitív egyedeinek hámszövetében találtuk. Ezért nem tartjuk lehetetlennek, hogy az inzertálódott génszakasz valahogyan befolyásolja az endogén β -galaktozidáz expressziót. A számunkra zavaró endogén β -galaktozidázokat 60 perces 48 °C-os hőkezeléssel inaktiválni lehet, de az eljárás során a homogenizátumokba kevert bakteriális β -galaktozidáz aktivitás is eltűnt. Mivel logikus magyarázatként felvetődött, hogy a homogenizátumokban jelenlévő proteázok az inkubálás során elbontják a bakteriális enzimet, az egy órás 48 °C-os hőkezelést proteázgátlók jelenlétében is elvégeztük, és bizonyítottuk, hogy a riporter enzim aktivitása így megmarad, míg a negatív, transzgent nem hordozó egerek összes szövetében a β -galaktozidáz aktivitás minimálisra csökkent. Az involukrin promotért

hordozó egerekben β -galaktozidáz alapaktivitás csak a sok hámszövetet tartalmazó fülhomogenizátumban volt kimutatható (I. táblázat).

A TG 27 törzsben több szövetben is találtunk β -galaktozidáz expressziót, ezen expressziós mintázatot a mérhető transzglutamináz aktivitással hasonlítottuk össze. A legmagasabb β -galaktozidáz alapaktivitást a tímuszban láttuk, de a máj, a vese és a lép is mutatott kismértékű expressziót. Nem volt detektálható β -galaktozidáz expresszió a tüdőben és az agyban. A transzglutamináz aktivitás a vesében volt a legnagyobb, ezen kívül a tüdőben és a májban mértünk magas aktivitást. Ennél alacsonyabb expresszióval jellemezhető szövet a lép és a tímusz. Az agyban pedig minimális transzglutamináz aktivitást láttunk. Összehasonlítva a mért adatokat elmondható, hogy a tímusz, a máj, a vese és a lép esetében mind a β -galaktozidáz expresszió, mind a transzglutamináz aktivitás kimutatható, de ezek mértéke a szövetekben eltérő. (A legmagasabb β -galaktozidáz alapaktivitást a tímuszban láttuk, de ugyanitt a transzglutamináz aktivitás nem volt ilyen nagymértékű. A máj, a lép és a vese esetében a helyzet fordított volt, a magas transzglutamináz aktivitásokhoz kismértékű β -galaktozidáz alapaktivitás társult.) Az agyban mért adatok jól korrelálnak, β -galaktozidáz, és szignifikáns transzglutamináz aktivitás nem volt látható, viszont ellentétes eredményt kaptunk a tüdőhomogenizátumokban, itt a magas transzglutamináz aktivitás ellenére sem tudtunk β -galaktozidáz alapaktivitást kimutatni. Az eltérések oka valószínűleg az, hogy a transzfektált promóter régió nem minden szövetben hordozza az endogén expresszió tökéletes irányításához szükséges információkat. Ugyanakkor a számunkra érdekes tímuszban az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a promóter képes az endogén expresszió szabályozására.

A két transzfektált promóter aktivitásának változását dexametazon, anti-CD3 antitest és irradiáció hatására vizsgáltuk a timocitákban. Mindegyik szignál alkalmazásakor mindkét törzs egyedeiben a tímusz involúció jelezte, hogy apoptózis történt.

A C2319 egyedeken végzett indukciók során egyik esetben sem tapasztaltunk a pozitív kezelt egerek tímuszhomogenizátumaiban β -galaktozidáz aktivitás-növekedést, a mért értékek a negatív állatok adataival összevetve szignifikáns különbséget nem mutattak. Megállapítottuk, hogy az involukrin promóter egyik szignál adása után sem aktiválódott, timocita apoptózis során expressziója nem változik.

A TG 27 törzs esetében mindhárom tímusz involúciót előidéző kezelés hatására a kezelt állatokban a transzglutamináz aktivitás megemelkedett. A legmagasabb emelkedést az anti-CD3 antitest oltásakor tapasztaltuk. A pozitív egyedekben a β -galaktozidáz aktivitás a pozitív kezeletlen egerek β -galaktozidáz alapaktivitásához viszonyítva mindig megemelkedett, a legmagasabb emelkedést ionizáló sugárzás hatására mértük. Eredményeink alapján elmondható, hogy a transzglutamináz promóter proximális 4.2 kilobázisnyi szakasza hordozza azokat a válaszadó elemet (vagy elemeket), amelyeket a tímuszban a fenti szignálok szabályoznak. Eredményeink alapján nem dönthető el, hogy egyetlen közös fehérje, vagy különböző szignálokra aktiválódó különböző fehérjék

regulálják-e a transzglutamináz expressziót. Adataink viszont alátámasztják, hogy ezek a szignálok mind génszinten regulálják a transzglutamináz fehérje expresszióját.

Irodalomjegyzék

1. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R. (1980) Cell death: Significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68:251
2. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239
3. Bansal, N., Houle, A. and Melnykovich, G. (1991) Apoptosis: mode of cell death induced by dexamethasone and other agents. *J. FASEB*, 5:211
4. Faernhead, H.O., Rivett, A.J., Dinsdale, D. and Cohen G.M. (1995) A preexisting protease is a common effector of thymocyte apoptosis mediated by diverse stimuli. *FEBS Lett*, 357:272
5. Fésüs, L., Thomázy, V., Autuori, F., Ceru, M.P., Tarcsa, E. and Piacentini, M. (1989) Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett*, 225:150
6. Tarcsa, E., Kedei, N., Thomázy, V. and Fésüs, L. (1992) An involucrin like protein in hepatocytes serves as a substrate for tissue transglutaminase during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 267:25648
7. Strasser, A. (1995) Death of a T-cell. *Nature*, 373:385
8. McConkey, D.J., Hartzell, P., Amador-Perez, J.F., Orrenius, S. and Jondal, M. (1989) Calcium dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, 144:1614
9. Cui, C., Wani, M.A., Wight, D., Kopchick, J. and Stambrook, P.J. (1994) Reporter genes in transgenic mice. *Transgenic. Res.* 3:182
10. Hansbrough, J.R., Fine, S.M. and Gordon, J.I. (1993) A transgenic mouse model for the lineage relationship and differentiation program of type II pneumocytes at different stages of lung development. *J. Biol. Chem.* 268:9762
11. Jones, D.E. Jr., Cui, D.M. and Miller (1995) Expression of beta-galaktosidase under the control of the human c-myc promoter in transgenic mice is inhibited by mithramycin. *Oncogene*, 10:2323

2nd International Symposium on Polymer Therapeutics

From Laboratory to Clinic

April 18-20, 1997

Kumamoto City International Center, Kumamoto, Japan



A Scientific Advisory Committee
magyar tagja Hudecz Ferenc ELTE
1117 Bp. Pázmány Péter sétány 2.

PROTEIN FOSZFATÁZOK TISZTÍTÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA TÍPUS ÉS IZOENZIM SPECIFIKUS ANTIPEPTID ANTITESTEKKEL

Tóth Attila

DOTE Orvosi Vegytani Intézet

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc egyetemi docens

Bevezetés

A fehérje foszforiláció jelentősége a biológiai szabályozásban

A sejtek jelátviteli mechanizmusai közül az egyik legjelentősebb a fehérjék reverzibilis foszforilációja. A fehérjék foszforilációját protein kinázok katalizálják, amelyek nukleozid-trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfátcsoportját építik be a fehérjék szeril (Ser), treonil (Thr) vagy tirozil (Tyr) oldalláncába. A protein foszfatázok a fehérjék oldalláncához észterkötéssel kapcsolódó foszfát csoportok hidrolízisét katalizálják. A foszforilációs mechanizmus csaknem minden sejt folyamat szabályozásában alapvető szerepet játszik (pl. fehérjeszintézis, sejtosztódás, izomkontrakció, anyagcserefolyamatok), ami sokféle protein kináz és foszfatáz működésén keresztül valósul meg (Cohen, 1989, Bollen és Stalmans, 1992, Mumby és Walter, 1993, Wera és Hemmings, 1995). A fehérjék pillanatnyi foszforilációs állapotát a kinázok és foszfatázok aktivitásának aránya szabja meg, ezért mindkét enzimtípus szabályozása szükséges a megfelelő foszforilációs szint kialakulásához. Becslések szerint a humán genom mintegy 1%-a kódol protein kinázokat és foszfatázokat (Hunter, 1995).

Ser/Thr specifikus foszfatázok osztályozása

A Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportosítása biokémiai tulajdonságaik (szubsztrát specificitás, hőstabil inhibitor fehérjékkel való gátolhatóság, fémionok hatása) alapján történt (Ingebritsen és Cohen, 1983). Eukarióta sejtekből négy különböző típusú foszfatáz katalitikus alegységet különíthetünk el. Az első típusba sorolt protein foszfatáz enzimek (a továbbiakban PP1) a foszforiláz kináz β alegységét nagyobb sebességgel defoszforilálják mint az α alegységét. Hőstabil inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjék gátolják a PP1 aktivitását. A második típusba sorolt protein foszfatáz enzimek (a továbbiakban PP2) elsősorban a foszforiláz kináz α alegységét defoszforilálják és nem gátolhatók I1 és I2 fehérjékkel. A PP2 enzimek aktivitásuk fémionoktól való függése szerint további három csoportra oszthatók. A PP2A fémionok nélkül is aktív. Ezzel szemben a PP2B aktivitásához Ca^{2+} -kalmodulin komplex, a PP2C aktivitásához pedig Mg^{2+} ionok jelenléte szükséges. Több citotoxinról (pl. okadainsav, mikrocisztin, kalikulin A) bebizonyosodott, hogy a foszfatáz

enzimek hatásos gátlószerei (Holmes és Boland, 1993; MacKintosh és MacKintosh, 1994). Ezek közül az okadainsav eltérő koncentrációban gátolja a PP2A ($K_i=0,2$ nM) és a PP1 ($K_i=20$ nM) aktivitását, ezért alkalmas a két foszfatáz típus megkülönböztetésére.

A PP1 és PP2A katalitikus alegységeinek (PP1_c és PP2A_c) tulajdonságai

A PP1_c és PP2A_c aminosavsorrendje mintegy 45%-os azonosságot mutat. Ezen fehérjék szekvenciája rendkívüli mértékben őrzött a különböző élőlényekben.

A foszfatáz klónozásának és szekvenálásának fontos eredménye a foszfatáz izoenzimek felfedezése. PP1_c esetében négy izoenzimet találtak: PP1_{cα}, PP1_{cβ} vagy PP1_{cδ} és PP1_{cγ}, amelyek közül a PP1_{cγ} alternatív mRNS hasítás révén két formában (PP1_{cγ1} és PP1_{cγ2}) expresszálódhat. Az izoenzimek 28-298 aminosav maradékai között (a nyúl PP1_{cα}-t alapul véve) 95% azonosság figyelhető meg (Cohen és mtsi., 1990). A különbségek elsősorban az N- és C-terminális régiókban találhatóak (a 299. aminosavtól kezdődően). PP2A_c esetében két izoenzimet találtak (PP2A_{cα} és PP2A_{cβ}), melyek szekvenciája emlősök esetében 97-98%-ban azonos.

Az eddig homogénnek tekintett katalitikus alegység preparátumok számos izoenzim keverékét tartalmazzák. Bár ezen enzimek katalitikus aktivitásuk alapján gyakorlatilag elkülöníthetetlenek, mégis feltételezhető, hogy lokalizációjuk és/vagy regulációjuk különböző, azaz bizonyos funkciók ellátásában "munkamegosztás" alakult ki az izoenzimek között (Shima és mtsi., 1993, da Cruz e Silva és mtsi., 1995). Ezt látszik igazolni, hogy találtak olyan *Drosophila* mutánsokat, amelyekben a mutáció csak az egyik PP1_c gént érinti a 4 közül, s ennek eredményeképpen késett a mitózis kifejlődése, hiányos osztódási orsó szerkezet, abnormális leány-kromoszóma elválás, hyperploiditás és túlzott kromoszóma kondenzáció volt megfigyelhető (Axton és mtsi., 1990).

Célkitűzés

Az irodalmi bevezetésben ismertetett foszfatáz katalitikus alegységek sokfélesége és feltehetőleg eltérő fiziológiai funkciója felveti a protein foszfatázok izoenzim és típus szerinti azonosításának fontosságát. A foszfatáz katalitikus alegységek konzervált jellege miatt a fehérje elleni antitest termelés nehéz. Alternatív megoldást ígér azonban a foszfatáz katalitikus alegységekre specifikus poliklonális antipeptid antitestek előállítását, az enzimek aminosavszekvenciája alapján kiválasztott, az egyes típusokra jellemző peptidszakaszok ellen. Specifikus antipeptid antitestek termelése érdekében tyúkokat immunizáltunk. Ennek előnye, hogy a szérum mellett az antitestek a tojássárgában is felhalmozódnak. Hátránya viszont, hogy a tojássárgában a lipidek nagy mennyisége (~37 %) az immunglobulinok tisztítását megnehezíti. Ezért célul tűztük ki PP1_c és 2A_c szekvenciája alapján típus és izoenzim specifikus antipeptid antitestek előállítását, valamint alkalmas módszer kidolgozását a

tojásokból izolálható antitestek tisztítására. A típuspecifikus antitestekkel kísérleteket terveztünk különböző szövetekben illetve sejtekben előforduló PP1_c és PP2A_c kimutatására.

A PP1_c izoenzimek létezésének felismerése felveti szöveti és szubcelluláris azonosításuk kérdését. A különböző szövetekből izolált katalitikus alegységek feltehetően izoenzimek keverékének felelnek meg, amelyek azonosítását az izoenzimekre specifikus antitestekkel terveztük.

A protein foszfatázok tisztítása számos kromatográfiás lépés összekapcsolását követeli meg és a ma ismert eljárások többsége rendkívül időigényes, valamint viszonylag alacsony hozamú. A foszfatázt gátló toxinok, az enzim iránti nagy affinitásuk miatt, alkalmasnak tűnnek affinitás kromatográfia kidolgozására. Moorhead és mtsi. (1994) írták le először a mikrocisztin átalakítását, szilárd hordozóhoz történő kapcsolását és felhasználását a PP1 tisztítására. Kísérleteink arra irányultak, hogy az irodalomban leírt módszer módosításával mikrocisztin affinitás oszlopot készítsünk és azt felhasználjuk a vázizom PP1_c tisztítására.

Eredmények

Az antigén peptid kiválasztása és a termelődő antitestek ellenőrzése

PP1_c és PP2A_c specifikus peptid szekvenciák

<i>N-terminális szekvenciák</i>	<i>belső szekvenciák</i>	<i>C-terminális szekvenciák</i>
PP1 _c : ¹ MADIDKLNIDSIIQRLLE ¹⁸⁻¹⁶⁰	<u>DLQSMEQIRRMPTD</u> ¹⁷⁵⁻³¹⁰	<u>SGRPVTPPRTANPPK</u> ³²⁵
PP2A _c : ¹ MDEKAFTKELDOWIEOLN ¹⁸⁻¹⁷²	<u>SIDTLDHIRALDRLQE</u> ¹⁸⁷⁻²⁹⁵	<u>RGEPHVTRRTPDYFL</u> ³⁰⁹

PP1_c izoenzimspecifikus peptid szekvenciák

PP1 _{cδ}	²⁹⁶ <u>KPSEK-KAKY-OYGGLNSG-RPVTPPRT-ANPPKKR</u> ³²⁷
PP1 _{cα}	²⁹⁷ <u>KPADKNKGKYGQFSGLNPGGRPITPPRNSAKA-KK</u> ³³⁰

1. ábra. Specifikus aminosav szekvenciák kiválasztása anti-peptid antitest előállítására.

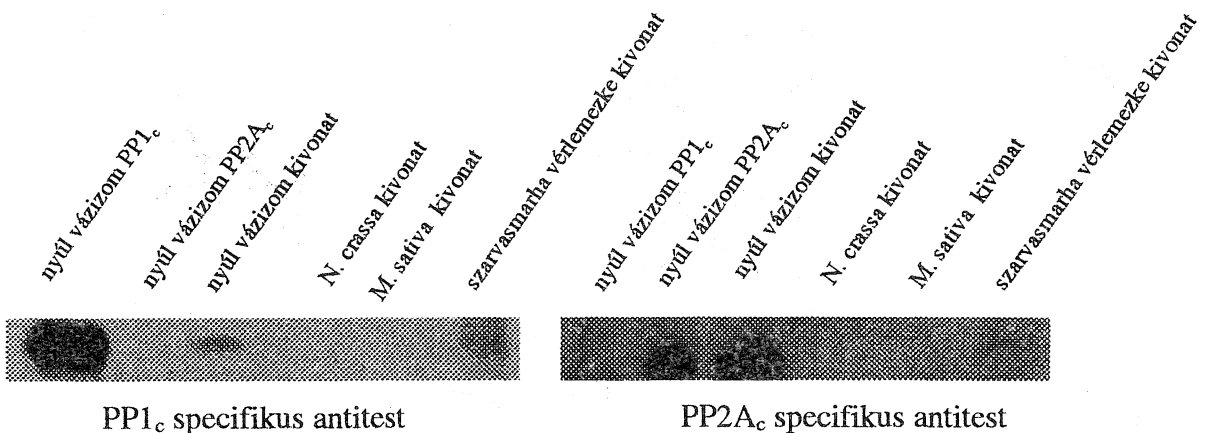
Az antitestek előállításához az enzimek szekvenciájából olyan peptid szakaszokat választottunk ki, amelyek a különböző enzimekben, illetve izoenzimekben eltérőek. Ilyen peptid szekvenciákat a terminális szakaszokon, illetve a fehérjék bizonyos belső régióiban találtunk (1. ábra). Az ábrán aláhúzással jelölt peptid szakaszokat használtuk antigénként. A peptideket szintézisük során polilizin vázhoz kapcsolták, így a preparátum közvetlenül felhasználható volt immunizálásra.

Foszfátáz specifikus antitestek tisztítása tyúk tojásból

Az antitestek tisztítása során először a szikolyót (tojás sárga) azonos térfogatú pufferrel hígítottuk, majd az így kapott oldathoz két térfogat kloroformot adtunk. Összerázás és a különböző fázisok szétválása után az immunglobulinokat a vizes fázisból izoláltuk. A részlegesen tisztított antitesteket fenil-Sepharose oszlopra vittük (fiziológiás foszfát pufferben), melyről az immunglobulinok desztillált vízzel eluálhatók. A tisztítás utolsó lépéseként affinitás kromatográfiát alkalmaztunk. Az antigénként használt peptidekkel kapcsolt Sepharose matrixon megkötődött specifikus antitesteket a pH 2,5-re való csökkentésével eluáltuk (Hassl és Aspöck, 1988, Gassman és mtsi, 1990).

Az antitestek specificitása és felhasználása a foszfátázok kimutatására

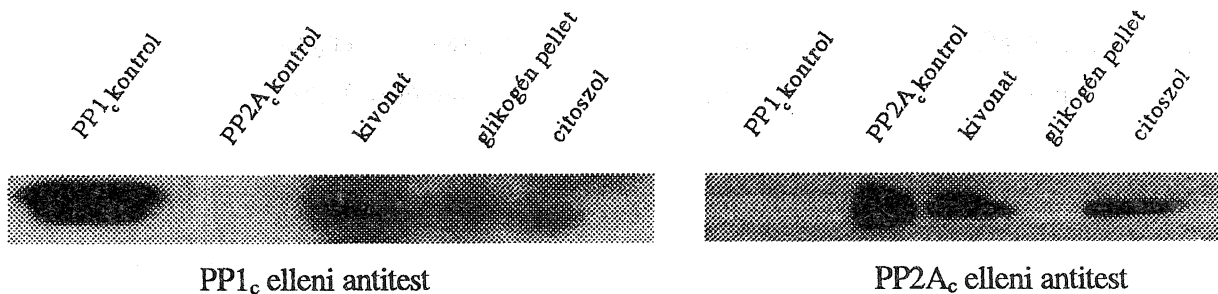
Különböző mintákban megvizsgáltuk a PP1_c és PP2A_c enzimek jelenlétét. Erre a PP1_c C-terminális és PP2A_c N-terminális peptidszakasza ellen termeltetett antitesteket használtuk fel. Először különböző fajok foszfátázait hasonlítottuk össze, emlősből származó szövetek (nyúl vázizom, borjú trombocita), valamint *Neurospora crassa* és *Medicago sativa* kivonatok felhasználásával. A 2. ábrán látható, hogy az emlős foszfátázok szekvenciája alapján tervezett antipeptid antitestek specifikus keresztreakciót adnak az emlős szövetekből származó kivonatokban lévő foszfátázokkal, de nem adnak jelet a *N. crassa* és a növényi kivonat foszfátázaival. Ismert azonban, hogy aktivitásmérések alapján a növényi és *N. crassa* kivonatok tartalmazznak PP1 és PP2A enzimeket. Eredményeink arra utalnak, hogy a növényi és a *N. crassa* PP1 és PP2A katalitikus alegységek szekvenciája részben eltér az emlős szövetekben található enzimektől, amit kezdeti klónozási adatok is alátámasztanak (Dombrádi és mtsi., nem közölt eredmények, Yatzkan és Yarden, 1995).



2. ábra. Különböző fajok foszfátázainak vizsgálata immunoblotton.

Az antitesteket felhasználtuk a különböző szubcelluláris frakciókhoz kötődő foszfátázok típusainak az azonosítására is. A glikogén anyagcsere szabályozásában elsősorban a PP1_c vesz részt,

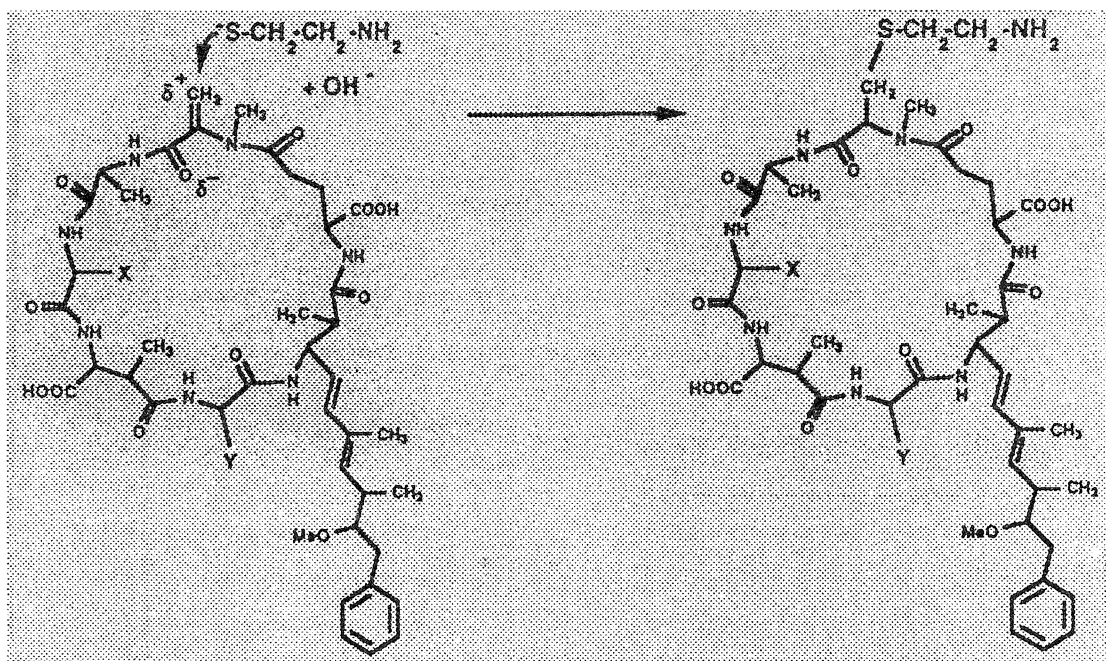
ugyanis a glikogén partikulákhoz kötődő foszfatáz aktivitásmérés és specifikus inhibitorokkal történő gátlás alapján PP1-nek bizonyult. Előfordulhat azonban, hogy a PP2A inaktív formában jelen van a glikogén pelletben. Ezért immunológiai módszereket alkalmaztunk a PP1_c és PP2A_c megoszlásának vizsgálatára (3. ábra). Máj kivonatban és a citoszolban egyaránt jelen volt a PP1_c és a PP2A_c, azonban a glikogén pellet frakcióban csak PP1_c-t tudtunk kimutatni Western blot technikával, ami megerősíti az aktivitásmérés alapján levont következtetéseket.



3. ábra. PP1 és PP2A lokalizációja patkány máj szubcelluláris frakcióiban.

PP1_c tisztítása mikrocisztin affinitás kromatográfiával

A mikrocisztin közvetlenül nem kapcsolható CNBr-aktivált Sepharose mátrixhoz, azonban ha a mikrocisztin dehidroalanin komponensén található kettős kötésre aminoetántiolt addíciónaltatunk a kapcsolás lehetővé válik az újonnan beépített szerkezeti rész aminocsoportján keresztül (4. ábra).

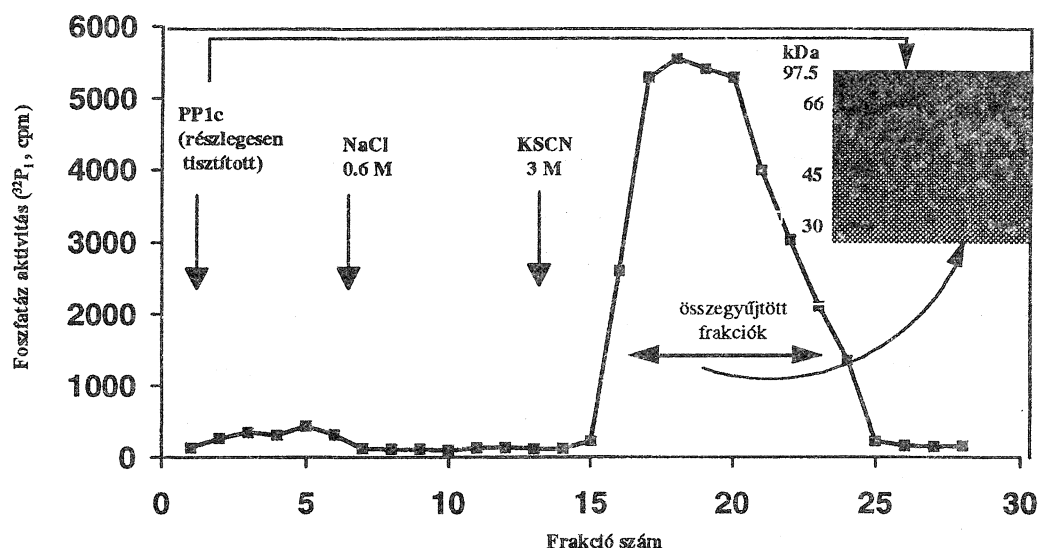


4. ábra. Mikrocisztin és aminoetántiolt addíciója (Moorhead és mtsi., 1994).

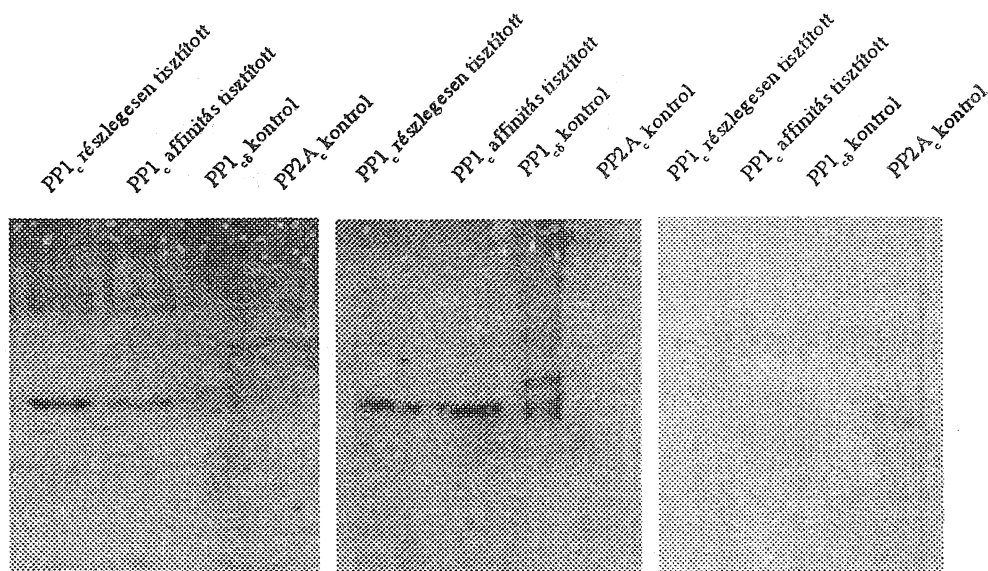
Az irodalmi leírás szerint végzett átalakítási kísérleteink nem jártak sikerrel, így a reakcióelegyet és a reakció körülményeit módosítottuk. Az eredeti leírásban szereplő DMSO a reakció körülményei között oxidálhatja az aminoetántiolt, mintegy "kivonva" a

reakciópartnert a közegből, ezért ezt a komponenst kihagytuk. A túl alacsony pH az addíciónálódott termékek lehasadását okozhatja, így az eredetileg javasolt pH 1,5 helyett a reakció végén a pH-t 2-3 értékre csökkentettük. A módosított eljárás alapján sikerült a mikrocisztinre aminoetántiolt addíciónáltni, majd a képződött terméket CNBr aktivált Sepharose matrixhoz kapcsolni.

A mikrocisztin affinitás oszlopot $PP1_c$ tisztítására használtuk (5. ábra). Az oszlopra részlegesen tisztított nyúl vázizom $PP1_c$ preparátumot vittünk fel. A $PP1_c$ csaknem teljes egészében megkötődött az oszlopon. A kötődés erősségét jellemzi, hogy a foszfatáz az oszlopról 0,6 M NaCl oldattal nem, csak 3 M KSCN oldattal eluálható. Az összegyűjtött affinitás tisztított $PP1_c$ frakciók tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.



5. ábra. $PP1_c$ tisztítása mikrocisztin affinitás kromatográfiával.



$PP1_{c\alpha}$ elleni antitest $PP1_{c\delta}$ elleni antitest $PP2A_c$ elleni antitest

6. ábra. Nyúl vázizomból tisztított $PP1_c$ vizsgálata Western blottal.

Western blot analízissel azonosítottuk a mikrocisztin affinitás kromatográfiával nyúl vázizomból tisztított fehérjét. A 6. ábrán látható, hogy a nyúl vázizomból tisztított fehérje keresztreakciót adott a PP1_c-re specifikus antitestekkel, de nem mutatott keresztreakciót a PP2A_c-ra specifikus antitesttel. Az izoenzimspecifikus antipeptid antitestek felhasználása esetén pedig mind a PP1_α, mind a PP1_β specifikus antitesttel keresztreakciót kaptunk, ami arra utal, hogy a vázizom katalitikus alegység preparátum legalább kétféle izoenzim keveréke. A mikrocisztin affinitás kromatográfia tehát alkalmas a PP1_c homogén formában történő elválasztására. A módszer ígéretes lehet a katalitikus alegységek olyan sejtekből vagy sejtkompartimentekből való elválasztására, ahol viszonylag alacsony koncentrációban fordulnak elő. A mikrocisztin kromatográfia módosításával a foszfatáz alegységek, ill. más, erősen kötődő szabályozó fehérjék (inhibitorok, aktivátorok) is izolálhatók lehetnek.

Összefoglalás

A fehérjék foszforilációja a sejt folyamatok fontos szabályozási mechanizmusa, ezért a foszforilációt katalizáló protein kinázok és a defoszforilációt katalizáló protein foszfatázok jellemzése a biokémiai kutatások időszerű problémája.

Kísérleteink célja a protein foszfatáz-1 (PP1) és 2A (PP2A) enzimek katalitikus alegységeinek kimutatására és megkülönböztetésére alkalmas antitestek előállítása volt. A PP1_c és a PP2A_c aminosav szekvenciája hasonló, ezért az egyes enzimekre jellemző peptidszakaszokat használtuk antigénként. A polilizin hordozóhoz kapcsolt peptidekkel tyúkokat immunizáltunk és az ellenanyagokat tojássárgájából izoláltuk.

Kidolgoztunk egy olyan tisztítási eljárást, amely alkalmas az immunglobulinoknak az asszociálódó lipidektől történő elválasztására (ugyanis a lipidek jelenléte az ellenanyagok nem-specifikus kötődését eredményezi). A különböző tisztítási eljárások közül legeredményesebbnek a tojássárga kloroformmal történő lipidextrakciója után a vizes fázisban maradó immunglobulin-lipid komplex fenil-Sepharose oszlopon történő elválasztása bizonyult. Az antitest tisztítás utolsó lépése a CNBr-aktivált Sepharose-hoz kötött antigén peptiddel történő affinitás kromatográfia volt.

Előállítottunk a PP1 és a PP2A katalitikus alegységeire specifikus, az enzimek C-terminális, N-terminális, valamint belső peptidszakaszát felismerő antitesteket. Az antitesteket sikeresen alkalmaztuk a különböző szövettípusokból származó PP1 és PP2A enzimek azonosítására, valamint az enzimek szubcelluláris megoszlásának vizsgálatára immunoblottal.

Az irodalomban leírt módszer módosításával sikerült a foszfatázt gátló mikrocisztint átalakítani és a módosított mikrocisztint CNBr aktivált Sepharose matrixhoz kapcsolni. A mikrocisztin-Sepharose affinitás kromatográfiával homogén PP1_c enzimet állítottunk elő nyúl

vázizomból. Előállítottunk a PP1 α és a PP1 δ izoenzimekre specifikus anti-peptid antitesteket, amelyekkel kimutattuk, hogy a nyúl vázizomból izolált katalitikus alegység mindkét izoenzimet tartalmazza.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Gergely Pál intézeti igazgatónak, hogy lehetővé tette számomra a diplomamunkám elkészítését a DOTE Orvosi Vegytani Intézetében, valamint hogy támogatott a kísérleti munka és a diplomamunka megírása során.

Köszönöm Dr. Erdődi Ferenc témavezetőm hozzáértő szakmai irányítását, emberi hozzáállását, biztató szavait, valamint Dr. Csontos Csilla, Dr. Német Árpádné, Rónai Tamásné gyakorlati tanácsait, segítségét.

Irodalomjegyzék

- Axton, J.M., Dombrádi, V., Cohen, P.T.W., and Glover, D.M. (1990): One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* **63**, 33-46.
- Bollen, M. and Stalmans, W. (1992): The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27(3):2**, 227-281.
- Cohen, P. (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.
- Cohen, P.T.W., Brewis, N.D., Hughes, V. and Mann, D.J. (1990): Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett.* **268**, 355-359.
- da Cruz e Silva, E.F., Fox, C.A., Ouimet, C.C., Gustafson, E., Watson, S.J., Grungard, P. (1995): Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J. Neurosci.* **15(5)**, 3375-3389.
- Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T., Hüschler, U. (1990): Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528-2532.
- Hassl, A., Aspöck H., (1988): Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol Methods.* **110**, 225-228.
- Holmes, C.F.B. and Boland, M.P. (1993): Inhibitors of protein phosphatase-1 and -2A; two of the major serine/threonine protein phosphatases involved in cellular regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 934-943.
- Hunter, T. (1995): Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Ingebritsen, T.S. and Cohen, P. (1983): Protein Phosphatases: Properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-338.
- MacKintosh, C. and MacKintosh, R.W. (1994): Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *TIBS* **19**, 444-448.
- Moorhead, G., MacKintosh, R.W., Morrice, N., Gallagher, T., MacKintosh, C. (1994): Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett.* **356**, 46-50.
- Mumby, M.C. and Walter, G. (1993): Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological Reviews* **73**, 673-699.
- Shima, H., Hatano, Y., Chun, Y.S., Sugimura, T., Zhang, Z., Lee, E.Y., Nagao, M. (1993): Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 γ ; PP1 δ and PP1 α in various rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1289-1296.
- Wera, S. and Hemmings, B.A. (1995): Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J.* **311**, 17-29.
- Yatzkan, E. and Yarden, O. (1995): Inactivation of a single type-2A phosphoprotein phosphatase is lethal in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **28**, 458-466.

CSERNOBIL: 10 ÉV UTÁN*

Köteles György

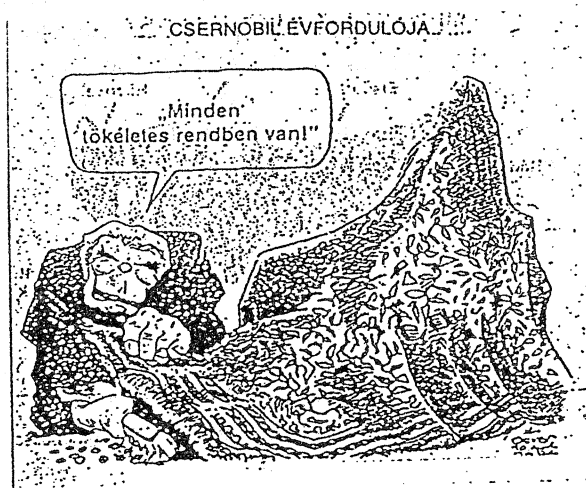
Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet és a "Haynal Imre" Egészségtudományi Egyetem Sugáregészségügyi Tanszék, Budapest

Az 1986. április 26-án bekövetkezett csernobili atomerőművi baleset tízéves évfordulója kapcsán számos nemzetközi és hazai szervezet járult hozzá a reális kép kialakításához. Ezt illusztrálja az 1. táblázat a tízéves évforduló kapcsán megrendezett főbb szakmai konferenciák felsorolásával. Látható, hogy a különböző szintű és csoportosulású nemzetközi szakértők mennyire igyekeztek a rendelkezésre álló adatok, mérések, modellek révén objektív értékelésre jutni. Ennek ellenére a szenzációhajhászra, pánikkeltésre, vagy az atomerőműellenes érdekcsoportok igyekezetének támogatására hangolt írott és elektronikus sajtó továbbra is a magukat szakértőnek kikiáltott személyek véleményét, álláspontját visszhangozzák, közvetítik. A Nemzetközi Atomenergia Ügynökség nagy konferenciája a bécsi Der Standard karikatúrája szerint /1. ábra/ a szőnyeg alá söpörte a felvetett kérdéseket. A jelen közlemény a szakértői konferenciák alapján kíván a főbb tanulságokról tömör összefoglalást adni, hogy ezek a magyar értelmiség minél több rétegéhez eljussanak.

Az esemény

A csernobili atomerőmű 4. számú reaktorát 1986. április 25-én az előírt karbantartási munkálatok miatt le akarták állítani. Ennek kapcsán elhatározták, hogy megvizsgálják: a leállítás során a turbinák termelnek-e még elegendő áramot egy esetleges balesetnél a reaktor hűtőrendszerének és a vészhelyzeti berendezéseknek a működtetéséhez, amíg a vészhelyzeti energiaszolgáltatást biztosító dieselmotorok beindulnak. Sajnos ezt a kísérletet nem készítették elő kellően, s nem volt információcsere és koordináció a kísérletet végzők és a reaktor biztonságos működtetéséért felelős személyzet között.

Így a kísérletezők számos olyan műveletet iktattak be, amelyek a veszélyes helyzet kialakulásához vezettek. Ezen emberi tényezőkn kívül, amit a "biztonsági kultúra hiánya"-nak is neveznek, a reaktor tervezésében is voltak olyan elégtelenségek, amelyek lehetővé tették az erőmű instabillá válását és fogékonyságát a kontrollálhatatlanságra működtetési hibákat követően. Az emberi és műszaki tényezők kombinációja egy hirtelen és szabályozhatatlan energia "megugrás"-t eredményezett 1986. április 26-án 1 óra 24 perckor, kémiai robbanás következett be és a reaktor súlyosan megsérült. A következményeket súlyosította az ebben a reaktortípusban alkalmazott grafit moderátor, amely más anyagokkal együtt lánggra lobbant és a hőtermelés révén hozzájárult a radioaktív anyagok területileg széleskörű és időben elhúzódó kiszabadulásához, szétterjedéséhez a légkörben.



1. ábra. Az osztrák Der Standard karikatúrája a Nemzetközi Atomenergia Ügynökség bécsi konferenciájáról

*A szerkesztőség felkérésére írt áttekintő közlemény

1. Táblázat

A csernobili atomerőművi baleset 10. évfordulója alkalmából rendezett főbb szakmai konferenciák

Egészségügyi Világszervezet /WHO/	1995. november 2-23. Genf	Health Consequences of the Chernobyl and other Radiological Accident
OECD Nukleáris Energia Ügynökség /OECD/NEA/	1995. november, Párizs	Chernobyl: Ten Years on Radiological and Health Impact
Európai Közösség /EU/	1996. március 18-23. Minszk	1 st International Conference of the European Union, Belarus, Russian Federation and Ukraine on the Consequences of the Chernobyl Accident
Magyar Tudományos Akadémia, Országos Atomenergia Bizottság, Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem Sugáregészségügyi Tanszék, Eötvös Lóránd Fizikai Társulat Sugárvédelmi Szakcsoport, Magyar Biofizikai Társaság Sugárbiológiai Szakcsoport, Magyar Nukleáris Társaság	1996. március 25-28. Budapest	A csernobili atomerőművi baleset tanulságai 10 év távlatából OKI háziyomda kiadványa 1996.
Nemzetközi Atomenergia Ügynökség és az ENSZ Humanitárius Ügyek Főosztálya	1996. április 1-3. Bécs	International Forum on Nuclear Safety Aspects of RBMK Reactors
Nemzetközi Atomenergia Ügynökség /IAEA/ és EC, UNDHA, UNESCO, UNDP, WHO	1996. április 8-12. Bécs	One Decade After Chernobyl: Summing up the Consequences

A csernobili atomerőmű reaktorai ún. RBMK - típusnak, ez a nagyteljesítményű, csatorna-típusú reaktor orosznyelvű elnevezésének rövidítése. Számos műszaki és gazdasági előnyük van, de nukleáris biztonságuk kisebb, mint más reaktortípusoké. Jelenleg is 15 RBMK működik a Szovjetunió utódállamaiban, Oroszországban 11, Ukrajnában 2 és Litvániában 2. Ezek biztonságát azóta igyekeztek jelentősen javítani /lásd az 1. táblázatban felsorolt egyik nemzetközi konferencia témáját/. A csernobili atomerőmű 1. és 2. számú reaktorát 1970 és 1977 között építették, a 3. és 4. számúak 1983-ban lettek készen. Két további ugyanilyen reaktor volt építés alatt a robbanás idején a helyszínen.

Radionuklidok kiszabadulása, eloszlása és lerakódása a környezetben

A légkörbe kiszabaduló radioaktív anyagok, a reaktor radioaktív anyag-leltárának mintegy 4%-a gázok, aeroszólók és fűtőelem részecskék formájában kerültek ki a reaktorból 10 napon át. Ezt az elhúzó időtartamot, valamint a radioaktív anyagok mintegy 1 km-es magasságba jutását főleg a grafit-tűz okozta, amelyet nehéz volt oltani. Így a radioaktív felhő és az abból származó radioaktív anyag kihullása jóformán az egész északi féltekét érintette, bár jelentős szennyeződés a korábbi

Szovjetuniót kivéve csak Európa egyes részein volt mérhető. A szennyeződés mind a talajon, mind a tápláléklánc elemeiben mennyiségileg igen változó, eloszlása heterogén volt, amit a radioaktív felhő vonulása mentén előfordult esők is befolyásoltak. A baleset során a légkörbe került legnagyobb mennyiségű radioaktivitás a cézium-137-től (85 Pbq), jód-131-től (1760 Pbq) és xenon-133-tól (6500 Pbq) származott. A talajszennyeződés mértékét és arányait szemlélteti néhány számadat a Csernobil környéki és a hazai viszonyok között /2. táblázat/. A helyszínen a táblázat adatait meghaladóan 3100 km² szennyezettsége nagyobb volt, mint 1500 kBq/m² és 103 000 km²-en volt a ¹³⁷Cs szennyezettség 40-200 kBq/m² között. A nagyfokú heterogenitás miatt az első 2 évben a hatóságok a talaj radioaktív szennyeződésének osztályozását vezették be, nevezetesen:

- alkalmi ellenőrzés zónája 40 és 550 kBq/m² (1-15 Ci/km²)
- állandó ellenőrzés zónája 550 kBq/m² és 1.5 MBq/m² (15-40 Ci/km²)
- szigorú ellenőrzés zónája 1.5 Mbq/m² felett (több mint 40 Ci/km²).

Hazánkat a szennyeződés két hullámban érte el. Az első kibocsátás, amely Csernobiltól É-ÉNy-i irányba indult el, Skandinávián, Lengyelországon és Csehszlovákián át érkezett hazánkba április 29-én, és főleg az ország északi, északnyugati részén mosódott ki 29-én, 30-án és május elsején. A második nagyobb felhő, amely D-i irányba indult, május 7-én érkezett hozzánk Románián és Jugoszlávián át, és a május 8-i kiadós esők mosták ki a légkörből a talajra, beleértve a legelőket is, amely a tej tápláléklánc miatt fontos sugárterhelési tényező.

A balesetet követő korai időszakban a 8 napos felezési idejű ¹³¹I lebomlása után a ¹⁰³Ru és ^{129m}Te izotópok koncentrációja volt a legnagyobb. Néhány hét múlva a cézium radioizotópok váltak dominánssá. A felületi koncentráció tekintetében a legnagyobb értéket a ¹³²Te érte el (60 kBq/m²) a baleset korai fázisában, a ¹³¹I maximális értéke 20-30 kBq/m² között változott május első hetében. A hosszú távon meghatározó ¹³⁷Cs felületi aktivitáskoncentrációja 1-10 kBq/m² értékek között volt.

Összehasonlításként: ez az érték az Alpokban és Dél-Németországban 40-60 kBq/m² volt, Skandinávia egyes területein pedig 100 kBq/m²-t is elért. A korábbi szovjet köztársaságok egyes, folyamatosan lakott területein a felületi szennyeződés értéke elérte, helyenként meghaladta az 1 MBq/m² értéket.

2. Táblázat

A talaj cézium-137 szennyezettségének kiterjedése

Ország	Szennyezés kBq/m ²	Kiterjedés km ²	Érintett lakosság millió
Fehéroroszországban	>37	38 400	2.2
Ukrajnában	>1.85	2100	0.235
Oroszországban	>37	56 800	2.2
Magyarországon az értékek 1-100 kBq/m ² között voltak igen heterogén eloszlásban			

Egészségi ártalmak a helyszínen

A robbanás és az első radioaktív kibocsátás 31 ember halálát okozta, ebből 28-at okozott sugárbetegség, egyet égés és egyet a romok temettek maguk alá, egy pedig kórházban kezelés közben szívinfarktust kapott. A jelenlévők - tűzoltók, balesetelhárítók - közül 499 személyt szállítottak kórházba, körülük 134 személynél diagnosztizáltak heveny sugárbetegséget. Ebből a csoportból az elmúlt 10 évben további 14 személy halt meg, de csak néhány eset tulajdonítható sugárártalomnak. A többenél egyéb halálok - szívinfarktus, baleset, stb. - szerepeltek.

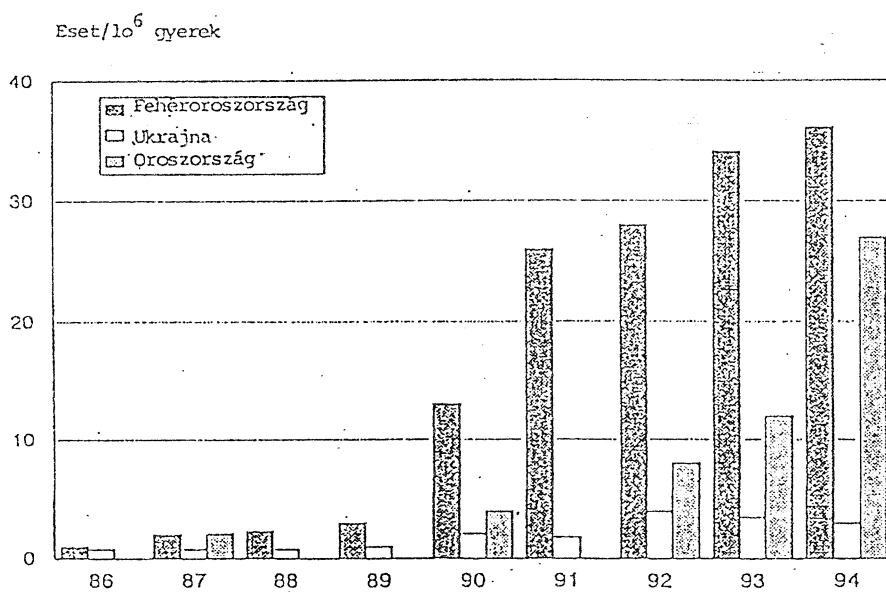
A sugárbetegség mint ún. determinisztikus biológiai hatás dóziszfüggését a sugárbetegség csoportosításában a 3. táblázat mutatja be azaz, hogy hányan kaptak különböző sugárdózist és ezek közül hányan haltak meg, ill. hányan éltek túl a sugárbetegséget.

3. Táblázat

Akut sugárbetegség miatt a helyszínről kórházba szállítottak száma

Becsült sugárdózis Gy	Betegek száma	Halálesetek száma
6-16	21	20
4-6	21	7
2-4	55	1
<2	140 ^x	0
összesen	237	28

x A pontosabb klinikai vizsgálatok ebből a csoportból csak 37 személynél igazoltak enyhe sugárbetegséget



2. ábra. A gyermekkori pajzsmirigyrák gyakoriságának növekedése a legszennyezettebb területeken

Késői egészségkárosítási következmények a Szovjetunió érintett utódállamaiban

A tíz év során - illetve az utóbbi 5 évben - az egyetlen "kiugró" jelenség a Fehéroroszországban, Ukrajnában és Oroszország egyes részein a pajzsmirigyrák előfordulási gyakoriságának növekedése különösen a gyermeknépességben. 1995 végéig mintegy 800 esetet regisztráltak /ezen belül 400-at Fehéroroszországban/ 15 éves kor alatti gyerekeknél. Fehéroroszország Gomel regiojában a jelenlegi gyakoriság 100 eset/10⁶ gyerek/év, ez az érték magában Fehéroroszországban a nem szennyezett részeken 14,6. A következő évtizedekben még további esetszám gyarapodás várható azok között, akik 1986-ban - a baleset idején - gyerekek voltak. A becsült várható érték néhány ezer eset, de természetesen ebben a becslésben nagy bizonytalanság van. Meg kell azt is említeni, hogy megfelelő kezelés esetén ennek a betegségnek a halálozási aránya kicsi. Mindaddig 3 gyerek halt meg pajzsmirigyrák következtében. A gyermekkori pajzsmirigyrákos esetek számának növekedését és tendenciáját a 2. ábra szemlélteti.

Fehéroroszország Gomel térségében a több mint 32 000, a baleset idején 0-7 éves korú gyerek pajzsmirigy dózisának becslésénél ilyen nagy értékeket is találtak: 300 gyereknél 10-40 Sv-t, 3100-nál 2-10-ig Sv-t, 13 900-nál 0.3-2 Sv közötti értékeket.

A pajzsmirigyrák gyakoriságának növekedésén kívül más rosszindulatú daganatok esetében nem észleltek a sugárhatásnak tulajdonítható, statisztikailag szignifikáns eltérést. A sztochasztikus hatásokra vonatkozó valószínűségi tényezők alapján azonban becsülhető az esetleg bekövetkező leukémiás esetek száma, ami mintegy 200 a 3,7 milliós szennyezett területeken lakó érintett lakosságban, és 200 a mintegy 200 000-es "likvidátor" népességből, akik a baleseti helyzet, a romok felszámolását végezték 1986-1987-ben. A "likvidátorok" száma 10 év alatt 800 000-re nőtt. Mind ennek a csoportnak, mind a kitelepített lakossági csoportoknak a megbetegedési statisztikája a jövőben változhat. A különböző csoportok egyedei által elszenvedett átlagos sugárdózis értékre a 4. táblázat nyújt tájékoztatást.

Hangsúlyozni kell, hogy sokféle egészségi ártalmat, betegséget észleltek az érintett lakosságban, amelyek nem a sugárzás következményei, de összefügghetnek a balesettel. Így pl. a szorongás, depresszió, különböző pszicho-szomatikus tünetek. Kiváltó okaik között a baleseten kívül nyilvánvalóan szerepet játszottak és játszanak a társadalmi változások - pl. a Szovjetunió, mint szövetségi állami szerkezet felbomlása, az ezzel járó gazdasági, társadalmi és politikai következmények, körülmények.

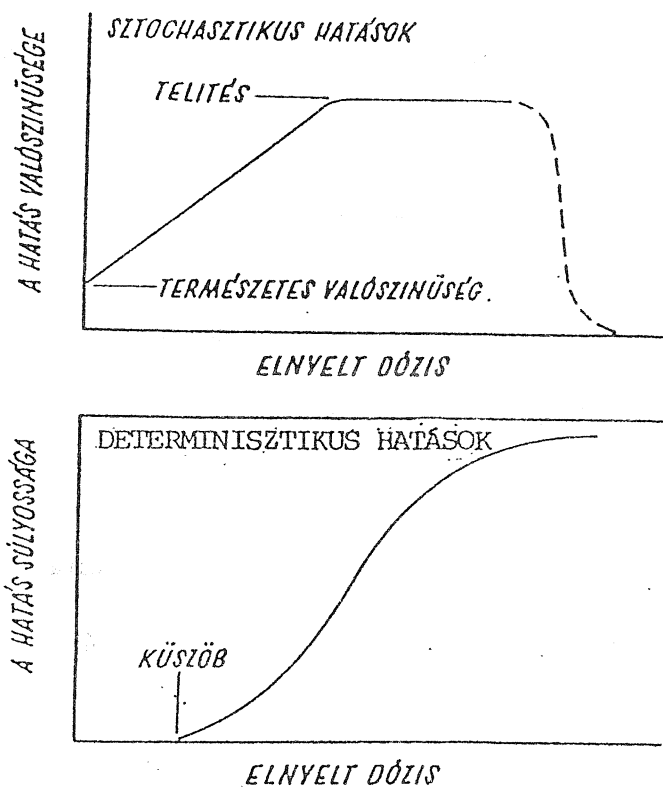
4. Táblázat

A csernobili atomerőművi baleset következtében kitelepített lakossági csoportok, illetve az elhárítási és eltakarítási munkákban résztvevő ún. "likvidátor" csoportok egyedeinek átlagos sugárdózis értékei

Kitelepítettek		
1985. augusztus	116 000 fő	> 50 mSv
	6 800 fő	> 100 mSv
1995. augusztusig	210 000 fő	> 50 mSv
"Likvidátorok"		
1986-87-ben	200 000 fő	
10 év alatt	800 000 fő	
	átlagdózisok	100 mSv
	20 000 főnél	250 mSv
	4000 főnél	500 mSv

Dózis-hatás összefüggések, az egészségkárosítás kockázatának becslése

Az ionizáló sugárzások biológiai hatásainak mértéke és jellege elsősorban a sugárzás dózisától, fajtájától, a besugárzott szerv, vagy szövet sugárérzékenységétől, valamint a biológiai válaszreakciók nagy változatosságától függ. Az a dózistartomány, amelynek hatását ismernünk kell a biztonságos sugárzás alkalmazás érdekében, 10^{-7} és 10^2 Sv között van, tehát 9 nagyságrendet fog át. Nyilvánvaló, hogy a biológiai válaszok jellegét, kockázatát, súlyosságát már csak ez az egy mennyiségi tényező is megszabja, s ennek megfelelően a szinte jelentéktelen kockázattól a súlyos sérülésekig kell áttekintést nyernünk. Az orvosi, ipari, mezőgazdasági, kutatási sugárzásalkalmazás kockázatának becsléséhez, más kockázatokkal való összehasonlításához, a valós kockázatok tudatosításához ezuton lehet közelíteni.



3. ábra. Az ionizáló sugárzás sztochasztikus és determinisztikus biológiai hatásainak dózis-hatás összefüggései

Sugárvédelmi szempontból az ionizáló sugárzás biológiai hatásait két csoportba soroljuk, nevezetesen a sztochasztikus és a determinisztikus jellegűekre. A sztochasztikus - statisztikai valószínűség szerint megjelenő - hatások jellemzői: az elnyelt dózis növekedésével egyenes arányban nő a hatás valószínűsége, nincs "küszöbdózisa", azaz minden dózis mellé rendelhető egy bizonyos - bármilyen kicsi is - valószínűség (3. ábra). Ilyen hatások a rosszindulatú daganatképződés és az örökletes (genetikai) károsodások megjelenése. A hatás kifejlődésének folyamata mindkét esetben egyetlen sejtől indul ki, azaz rosszindulatú átalakulásból (malignus transzformáció), illetve az ivarsejt biológiai kódrendszerében bekövetkezett változásból (mutáció). A folyamat a rosszindulatú daganatképződés esetében néhány évet - évtizedet vehet igénybe. A genetikai hatások az utódokban jelenhetnek meg, de emberi népességben sugárexpozíciónak tulajdonítható genetikai hatást még nem mutattak ki.

A rosszindulatú daganatképződés a sejt átalakulásától a daganat klinikai megjelenéséig igen hosszadalmas, összetett, soklépcsős folyamat. Ezt sejtbiológiai, szöveti, szervezeti tényezők befolyásolják akár a daganat megvalósulása, akár eltüntetése irányában.

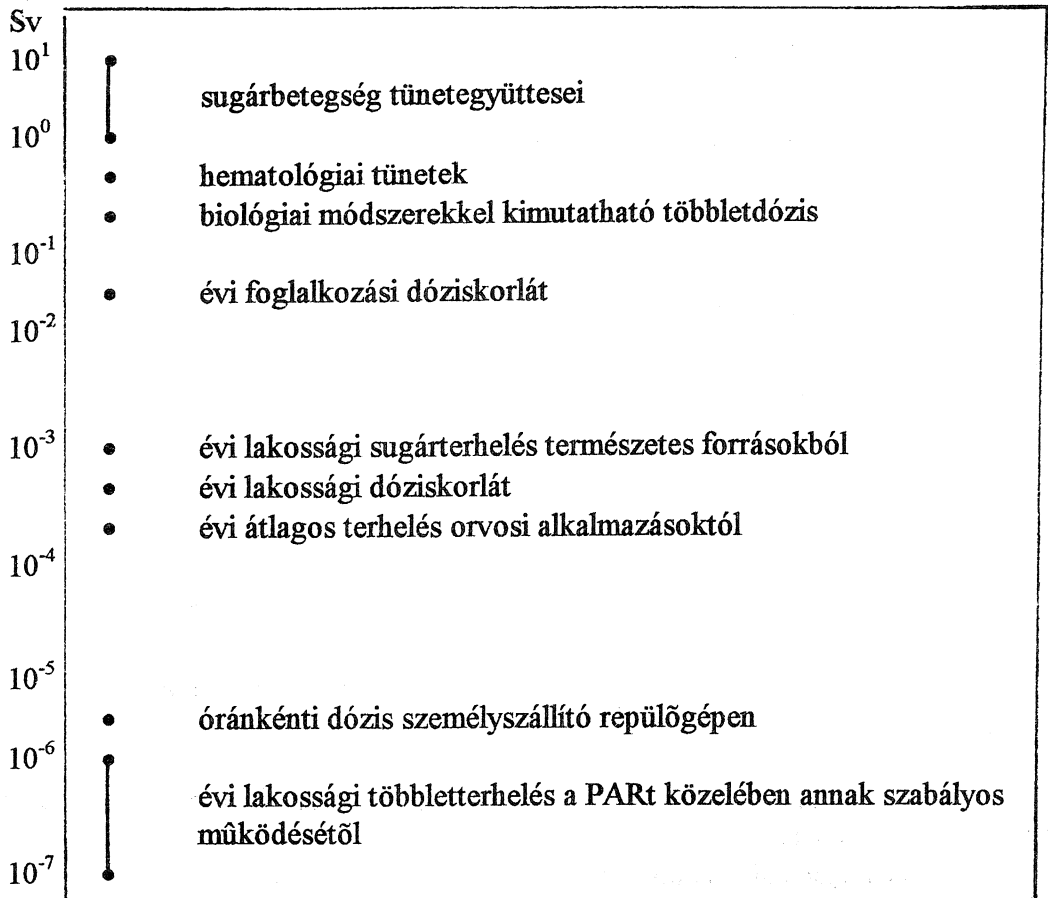
A sztochasztikus hatások előfordulásának valószínűségi tényezőit a Nemzetközi Sugárvédelmi Bizottság 1990-ben elfogadott és 1991-ben közzétett közleményében a 5. táblázaton feltüntetett értékekben határozta meg. Mindezek figyelembe vételével lehet becsülni a várható késői sztochasztikus hatások kockázatát, egyes népességcsoportokban, ha ismerjük az átlagos egyéni sugárdózisok mértékét.

A valószínűségi tényezőkkel egy lakossági csoport adott dózisu sugárterhelése kockázatának becslésénél lehet számolni, élni, de nem visszaélni, azaz az eredő értékeket legfeljebb valószínűségnek és nem bizonyosságnak kell tekinteni.

A determinisztikus sugárhatások általános jellemzői: egy bizonyos dózis, a "küszöbdózis" felett jelennek meg, súlyosságuk függ az elnyelt dózis mértékétől, a dózis-hatás összefüggést egy "S" alakú görbe fejezi ki (3. ábra).

Determinisztikus sugárhatás körébe tartoznak az akut, nagy dózis okozta sérülések és az akut sugárbetegség különböző tünetegyüttesei, azaz a csontvelő, a gyomor-bélrendszer és a központi

idegrendszer ill. a véretek károsodásából származó kórfarmák. Az előidézõ sugárdózisok 1 Sv felettiek (4. ábra).



4. ábra. Az ionizáló sugárzás kiváltotta biológiai hatások dózistartományának összehasonlítása

5. Táblázat

Sztochasztikus hatások előfordulásának valószínűségi tényezői az ICRP Publ. 60. (1990) alapján

	Károsodás ($10^{-2} \times \text{Sv}^{-1}$)			összesen
	végzetes rosszindulatú daganat	nem végzetes rosszindulatú daganat	súlyos örökletes hatások	
felölt munkavállalók	4.0	0.8	0.8	5.6
egész lakosság	5.0	1.0	1.3	7.3

A hazai lakossági sugárterhelés mértéke és az egészségkárosítás kockázatának becslése

A hazai szennyezettségi viszonyok szintén igen eltérők voltak területről-területre. Ennek megfelelően a lakosság nem egyenlőképpen exponálódott. A balesetet követő korai időszakra vonatkozó sugárzási viszonyokat mutatja az ország térképére vetítve az 5. ábra. A 123 szabad helyszín dózisteljesítményének számtani középértéke 1986. május - június között 26%-kal volt magasabb, mint a megelőző év azonos időszakában.

Megállapítható, hogy a balesetet követő első évben szabad helyszíneken a dózisteljesítmény középértéke a megelőző három évhez viszonyítva Észak-Dunántúlon 40%-kal, Dél-Dunántúlon és Észak-Magyarországon 26%-kal, a Duna-Tisza közén és Tiszántúlon 12%-kal volt nagyobb. 1988-

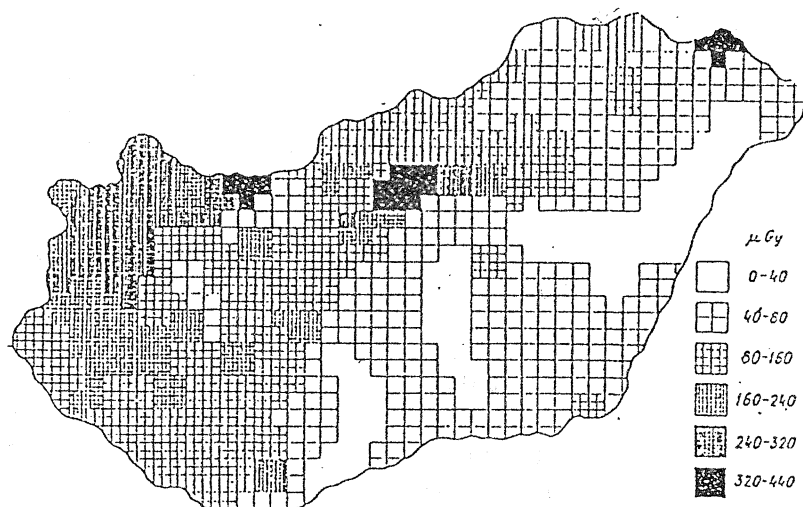
ban a növekmény durván a felére csökkent. 1992-t követően már csak egyes, szennyezettebb helyszíneken nagyobb, mint a természetes háttér ingadozása.

A hazai lakosság sugárterhelését is főleg a ^{137}Cs , a ^{134}Cs és a ^{131}I izotópok hozták létre. A külső sugárterhelést a ^{137}Cs és a ^{134}Cs okozták, míg a belső terhelést a két cézium izotóp és ^{131}I . A külső sugárzásból a városi környezetben élők átlagosan $150\mu\text{Sv}$ többletterhelés, belső sugárzásból átlagosan $90\mu\text{Sv}$ érte. A falun élők belső terhelése kb. ugyanilyen érték, míg a külső terhelés a városinak mintegy kétszerese, azaz átlagosan $300\mu\text{Sv}$. Az ország egész lakosságára a súlyozott átlagérték ezek alapján külső sugárzásra: $225\mu\text{Sv}$, belső sugárzásra: $90\mu\text{Sv}$, azaz kerekén $300\mu\text{Sv}$.

Ha tehát a fentiekben említett kockázati értékeket vesszük alapul, és a baleset következtében a hazai lakosság átlagos sugárterhelését $0,3\text{ mSv}$ -nek vesszük, az egész lakosság (10^7 személy) végzetes kimenetelű rosszindulatú daganatképzésnek valószínűsége:

$$3 \times 10^{-4} \text{ Sv} \times 10^7 \text{ személy} \times 5 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1} \text{ valószínűség} = 150 \text{ daganatos megbetegedés}$$

a daganat kifejlődésének mintegy 10-30 éves lappangási időtartama alatt, tehát évente mintegy 5-15 eset. Ezen kockázat mértékének megítéléséhez azonban azt is tudni kell, hogy évente a hazai 10 milliós lakosságból átlagosan 30.000 ember hal meg a különböző eredetű rosszindulatú betegségek miatt. A 6. táblázatban látható a sajnálatosan emelkedő tendencia, ami már a csernobili baleset előtt kezdődött! A hazai lakosságban sem a gyermekkori rosszindulatú folyamatok, pl. leukémiák, sem a pajzsmirigy megbetegedések statisztikájában nem volt a baleset következményeként értékelhető változás.



5. ábra. A természetes környezeti háttérsugárzás levegőben mért dózisaik növekedése 1986. július végéig az ország különböző területein

6. Táblázat

Rosszindulatú daganatos halálozások száma Magyarországon:

Év	Férfi	Nő	Összesen
1970	12.010	10.629	22.639
1980	15.359	12.578	27.937
1990	17.644	13.577	31.212
1992	18.465	14.211	32.676
1993	18.218	14.323	32.541
1994	18.602	14.391	32.993

Kockázat becslés vs. kockázat észlelés

Az ionizáló sugárzások biztonságos alkalmazásainak nagy tapasztalaton alapuló kockázat-becslésén túlmenően van egy sajátos társadalmi vonatkozása, nevezetesen a kockázat valós és vélt értékei eltérnek egymástól. Erre utal néhány adat a 7. táblázatban, ahol egyesült államokbeli és magyarországi diákok kockázatfelfogása szerepel. Nyilvánvaló, hogy a kockázatfelfogás függ a képzettségtől, műveltségtől, egy adott kultúrától, propagandától, stb. Mindenesetre ezek a felmérések egyértelműen azt mutatják, hogy az atomerőművekkel kapcsolatos kockázatfelfogás túlzó, különösen a röntgensugárzás orvosi alkalmazásához képest, ami különben mindkét esetben inkább alulbecsült, holott az utóbbtól eredő lakossági sugárterhelés mintegy három nagyságrenddel nagyobb.

A megfelelő szakembereknek tehát arra kell törekednie, hogy a valós kockázat tudatosodjék a lakosságban, a tömegtájékoztatási körökben, hogy más kockázatokkal összehasonlítva érzékeljék, s ha adott esetekben szükséges, döntsenek egy-egy technológia, nukleáris, sugaras technológia alkalmazásáról. Az indokolatlan aggodalmakat igyekezni kell eloszlatni.

Még megválaszolatlan kérdések, további feladatok

Műszaki szempontból említésre a legérdekesebb a sérült reaktort a környezettől elkülönítő beton építmény, a "szarkofág" állapota, ennek változása. Szükségesnek látszanak további lépések ennek stabilizálására, amely nem állandó vagy végleges megoldásnak épült. Továbbépítésénél megvan az összeroppanás kockázata, ezzel együtt radioaktív anyag kibocsátás, esetleg a környezeti talajvíz szennyeződésének a veszélye. Ezek a kibocsátások csak a közvetlen környezetet szennyeznék. Az idő folyamán a sérült reaktorban lévő hasadóanyag átrendeződése miatt akár kritikus tömeg is összeállhat.

Biológiai hatások szempontjából részletesebb és mélyebb vizsgálatok csak a legutóbbi években kezdődtek. Így a környező állat- és növényvilágban. Vadonélő mezei egerekben a szennyezett területeken magasabb mitokondriális citokróm b gén mutáció gyakoriságot mutattak ki, mint a nem szennyezett területeken. Ez feltehetően a radiojód és radiocézium szennyezettségnek tulajdonítható, de számos bizonytalanság van a kérdés "epidemiológiája" vonatkozásában, pl. a baleset előtti gyakoriság, a populáció dinamika ismerete, kémiai mutagének jelenléte. Növényeknél is nagymérvű pusztulást észleltek nagyon szennyezett területeken, a növekedési zónák inaktiválódását, anyagcsere zavarokat, citogenetikai és különböző morfológiai elváltozásokat.

Az emberi egészségkárosítás vonatkozásában az említett sztochasztikus, determinisztikus, valamint pszichoszomatikus hatásokon kívül újabb kutatási-felmérési eredmények is kezdenek napvilágot látni.

Úgy tűnik, hogy a szennyezett területen élő gyerekek között kissé emelkedett egy látászavarokat nem okozó, hátsótok alatti szemlencse elváltozás is, amely emlékeztet a sugárzás okozta hályog megjelenésének korai szakaszára.

Az immunkompetens sejtek mennyiségét, arányait, funkcióit megváltozottak találták nagyszámú népességnél, így a $CD4^+$ és a $CD5^+$ aktiválást, a $CD4^+/CD8^+$ arányát, megemelkedett T szupresszor/killer arányt. Ugyiszintén emelkedett autoimmun pajzsmirigy gyulladás gyakoriságot észleltek a radioaktív jóddal erősen szennyezett területek gyereklakosságában. A p53 tumor szuppresszor gén mutáció gyakoriság növekedést mérték a pajzsmirigyrákos gyerekekben. Fehéroroszországi gyerekek ivarsejtjeiben mini satelita mutációkat észleltek, bár ennek nincsenek ismert egészségi hatásai és nagy a háttérérték is, de mindenesetre a megfigyelés érdekes lehet a kis dózisok okozta mutagenézis mechanizmusának megismerésében.

7. Táblázat

Különböző egészségkárosító kockázatok valós és vélt besorolásának összehasonlítása

Tevékenység	Valós Vélt		Valós Vélt	
	/USA diák*/		/Magyar diák**/	
Dohányzás	1	3	1	1
Alkoholfogyasztás	2	7	2	2
Gépjárművek	3	5	3	3
Kézi fegyverek	4	2	7	4
Elektromos áram	5	19	21	5
Motorkerékpár	6	6	6	7
Úszás	7	30	9	19
Sebészet	8	11	10	6
Röntgen alkalmazás	9	17	25	27
Vasút	10	23		
Repülés	11	15	26	13
Nagy építmények	12	14	22	18
Kerékpár	13	24	5	15
Vadászat	14	18	16	22
Háztartási gépek	15	27	28	10
Tűzoltás	16	10	9	12
Rendőri akció	17	8	14	12
Fogamzásgátlás	18	9	13	16
Kereskedelmi repülés	19	16		
Atomenergia	20	1	11	8
Hegymászás	21	22	29	20
Erőgépek	22	28		
Iskolai labdarúgás	23	26	27	28
Sízés	24	25	15	21
Védőoltás	25	29	23	24
Élelmiszer színezés	26	20	29	19
Élelmiszer tartósítás	27	12	25	17
Rovarirtók	28	4		
Antibiotikumok	29	21	8	17
Aeroszólók	30	13	20	30

* United Nations Environment Programme (1985) alapján

** Faragó K. és Engländer T. (1987) alapján

A likvidátorok szérumában egy mindeddig azonosítatlan "klasztogén faktor"-t mutattak ki, amely emelkedett kromoszóma aberrációs értéket tud kiváltani és fenntartani.

A felsorolt néhány példa azt mutatja, hogy további kutatások és elemzések szükségesek a sugárzás kis dózisai biológiai hatásának vizsgálatában. Úgyszintén további orvosi-biológiai kutatás szükséges nagy dózisok okozta sugársérülések, sugárbetegségek súlyosságának pontosabb diagnózisa, hatékonyabb terápiája érdekében.

További feladatok között említik a nemzetközi fórumok a következőket is:

- Szakszerű egészségügyi-orvosi ellátásban kell részesíteni a túlélő sérülteket éveken át és tudományos kutatás tárgyává kell tenni a minél hatékonyabb vészhelyzeti ellátás módszereit.
- Nyilvánvalóvá vált, hogy minden országban növelni kell a műszaki és szervezeti felkészültséget egy nagyméretű baleset következményeinek minél hatékonyabb ellátására, elhárítására.
- A baleset felhívta a figyelmet számos szakterület fejlesztésének szükségességére, mint a reaktorbiztonság, súlyos baleset ellátás, beavatkozási - intézkedési kritériumok kialakítása, vészhelyzeti eljárások kidolgozása, információközlés fejlesztése, besugárzott személyek orvosi ellátása, ellenőrzési módszerek /monitoring/, radioökológiai folyamatok megismerése, mezőgazdasági intézkedések és irányítás, a nyilvánosság tájékoztatása.
- Nyilvánvalóvá vált, hogy a baleset következményei határokon túl is terjednek. Ezért azóta is számos nemzetközi program elindítását ösztönözte, amit folytatni kell.

Végső következtetésként az mondható, hogy a modern ipari világ történetében már számos katasztrófális esemény fordult elő a csernobili balesethez hasonló méretű következményekkel. Azonban ez a baleset nemcsak súlyossága miatt, hanem ionizáló sugárzás jelenléte miatt jelentősebb hatással volt a társadalomra. Nemcsak egészségügyi következményekkel járt, valamint fizikai, ipari és gazdasági károsodásokkal, hanem hosszú távú következményekkel is a társadalmi, gazdasági viszonyokban, lélektani stressz hatásokban és a nukleáris energia alkalmazhatóságával kapcsolatos szélsőséges képzetek kialakításában, ami sokáig fennmaradhat. Mindazonáltal a nemzetközi közösség képes volt gyorsan reagálni és levonta a tanulságot, hogy a jövőben eredményesebben szembesüljön hasonló kihívásokkal, ha egyáltalán egy súlyos nukleáris baleset ismét előfordulhat.

Felhasznált és további tájékozódásra ajánlott irodalom[†]

Becker, K. Tíz év múltán - A csernobili baleset radiobiológiai következményei, Fizikai Szemle, 46, 129-132, 1996.

Chernobyl. Ten Years On Radiological and Health Impact. OECD/&NEA, Paris, 1995

Csernobil - 10 év távlatából. A Brit Nukleáris Ipar Forum összeállításának fordítása. Fizikai Szemle, 46, 133-137, 1996

Die Folgen von Tschernobyl: Was wissen wir 10 Jahre danach;

Bauchinger, M., Bayer, A., Biko, J., Grosche, B., Heinemann, G., Hill, P., Hille, R., Hillebrandt, S., Kartheim, R., Kaul, A., Müller, W.-U., Narrog, J., Paretzke, H. G., Peters, H. P., Pfob, H., Reiners, Ch., Sauermann, P. F., Schnadt, H., Streffer, Ch., Voigt, G., Zitelsberger, H.
Strahlenschutz Praxis, 1, 3-38, 1996

Faragó Klára, Engländer T. (1987):

A kockázat észlelése - összehasonlító vizsgálat amerikai és magyar csoportoknál. in "Kockázat és Társadalom", (Szerk. Vári A.)

Akadémiai Kiadó, Budapest, 34-56. old.

[†]A felsorolt forrásokon kívül a szerző készsággel bocsát további irodalmat az érdeklődő kutatók rendelkezésére.

IBSS (1994)

International Basic Safety Standards for Protection against Ionizing Radiation and for the Safety of Radiation Sources. International Atomic Energy Agency, Vienna, Safety Series No. 115-I.

ICRP 1990: Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP, 21/1-3. 1991. Pergamon Press.

Köteles Gy. (1994):

Ionizáló sugárzás kiváltotta biológiai válaszok és közegészségügyi jelentőségük
Egészségtudomány, 38, 195-206.

Sztanyik B. L. (1983):

Ionizáló sugárzás okozta ártalmak in "Munkaegészségtan, üzemegészségtan", (Szerk. Tímár M.)
Medicina, 579-597. old.

Sztanyik B. L. (1983):

A sugárbiológia negyedszázada
Orvosi Hetilap, 124, 2223-2232.

Sztanyik B. L. (1992):

Sugárzás és egészség
Fizikai Szemle, 42, 427-432.

UNEP (1995):

Radiation, Doses, Effects, Risks,
United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya



GERENDÁS MIHÁLY Kossuth-díjas biokémikusra halálának huszadik évfordulóján mint a Semmelweis OTE Aesculap fotóklubja alapító elnökére és fotóművészre emlékeztünk a Farkasréti temetőben.

Felidéztek szervezői és művészi alkotói munkáját s azt a klubestet is, amelyen nem hagyományos technikával készített színes diapozitívjainak vetítések arra kérte a nézőket, adjanak címet a képeknek. Az egyik képre egyhangúlag a "Magányos cédrus" aláírást javasolták. Gerendás professzor úrtól ekkor tudtuk meg, hogy a képeket polarizációs mikroszkópra szerelt fényképezőgéppel készítette s a "Magányos cédrus" a C-vitaminnak egy cseppje a tárgylemezen.

A diaporámát, a fotózás új kifejezési módját alapító elnökünk honosította meg hazánkban. Kizárólag kristályképekből álló és ma is etalonnak számító "Barangolás a mikrokozmoszban" című művét csaknem kétezerszer mutatták be itthon és külföldön nagy sikerrel. Ezért és iskolateremtő tevékenységéért a Magyar Fotóművészek Országos Szövetsége még életében tagjai közé választotta.

Szarvassy Imre
a Fotóklub vezetője

HÍREK és ESEMÉNYEK

Beszámoló a FEBS 36. Council Meeting-jéről

A tanácsülést a 24. FEBS Meeting keretében (Barcelona, 1996. július 7-12) tartották. A házigazdák tájékoztatója szerint a kongresszusnak 1570 résztvevője volt (a meghívott előadókkal együtt). A résztvevők számbeli rangsora a következő volt: Spanyolország (627), Németország (124), Franciaország (119), Egyesült Királyság (80), Olaszország (77), Magyarország (70), Svédország (45), stb. A magyar részvétel tehát igen jelentős volt, ami elsősorban két szervezett társasút (MBKE és Richter Rt.) eredménye. Sajnos, a meghívott előadók listáján helyezésünk sokkal szerényebb volt (1 szimposium és 1 workshop előadó), ami nem annyira a magyar biokémia gyengeségét, mint inkább spanyol kapcsolataink fejletlenségét mutatja. (Emlékeztetőül: 1990-ben, a budapesti 20. FEBS Meeting kapcsán a spanyolok igen nehezményezték, hogy kevés az ibér meghívott...)

1) A FEBS anyagi helyzete szilárd. A netto bevétel 1995-ben 1.079 eDEM, ami gyakorlatilag azonos, mint az 1994. évi (1.033 eDEM). Félreértések elkerülése végett: ez a *netto* bevétel, ami az összbevétel (3.713 eDEM) és összkiadás (2.634 eDEM) különbsége. Persze a FEBS non-profit szervezet, így a bevétel döntő részét alapszabályában rögzített tevékenységébe vissza kell forgatnia. A bevétel zöme továbbra is a két folyóiratból származik: Eur. J. Biochem.: 948 eDEM, FEBS Letters: 2166 eDEM; ez a szám az EJB-nél kissé magasabb, a FL-nél kissé alacsonyabb, mint 1994-ben volt.

2) Tagok száma az egyesületekben. A jelenlegi 31 FEBS "tagállam" (tagegyesület) rangsorában a 11. helyet foglaljuk el 950 taggal, akik után 1996-ban 203 £ ~ 52 eFt tagdíjat fizettünk. Azon tagok után is fizetünk, akik MBKE tagdíjukat eddig nem rendezték (közel 70%!)). Ez olyan kelet-erurópai szokás, amit a tanácsülésen mélyen elhallgatok...

3) FEBS ösztöndíjak. 1996 során 3 rövid távú ösztöndíjat és 1 hosszútávú ösztöndíjat nyertek el magyar kutatók. Ez a többi országhoz képest közepes részesedés, jó pályázók többet is elnyerhetnének. Különösen a rövidtávú ösztöndíjat (átl. 2 hónap), amely célfeladatok elvégzésére szolgál, észszerű volna jobban igénybevenni. Az ország tudományos erejét persze jobban tükrözi, ha ilyen ösztöndíjakkal *hozzánk* jönnek más országokból (igen kedvező a díjazás, aki ilyen vendéget fogad, gazdag munkatárshoz jut...). 1996-ban egyetlen ilyen eset volt: egy moszkvai kutató jött rövid tanulmányútra Debrecenbe.

4) FEBS tisztségviselők. Horst Kleinkauf (Németország) Meetings Counsellor-i megbízatása lejárt, utóda a spanyol J.J. Guinovart lett. A Publications Committee új elnöke W. Stalmans (Belgium), két új tagja P. Ott (Svájc) és B. Rossignol (Franciaország); az Advanced Course Committee két új tagja S. Papa (Olaszország) és T. Özben (Törökország); mint tavaly jelentettem, ennek a bizottságnak tagja Sarkadi Balázs.

5) A FEBS és IUBMB korábban feszült kapcsolata enyhült (utóbbi inkorporálni akarta előbbi), továbbra is önállóan szerveznek, de egyeztetik egymással a rendezvénynaptárt és kölcsönösen delegáltakat küldenek egymás kongresszusára.

6) A soronkövetkező FEBS és IUBMB Kongresszusok listáját a FEBS Bulletin tartalmazza. A tagegyesületek számának szaporodása folytán nagy a vetélkedés a további összejövetelek rendezési jogáért. (Nem FEBS Council ügy, de ezúton közlöm a tagsággal, hogy egyesületünk megpályázta a 2003-ban tartandó 19. IUBMB Kongresszus rendezését. Döntés év végéig várható. A döntés eredményétől függetlenül, a pályázás ténye optimizmusunkat tükrözi: hisszük, hogy lesz MBKE a jövő évezredben is...).

Az 1996-ban pályázati tagdíjat (2.000.-Ft vagy több) fizetők névsora:

Édes István	Szeged	Kovács Judit	Budapest
Friedrich Péter	Budapest	Patthy László	Budapest
Gráf Márta	Budapest	Sarkadi Balázs	Budapest
Gullner Gábor	Budapest	Tomcsányi Tihamér	Pécs
Horváth Árpád	Adács	Tózsér József	Debrecen
Horváth Gábor	Budapest	Vígh László	Szeged
Kandra Lili	Debrecen		

Sem a témád fontossága, Sem tudásod nagysága, Nem pótolhatja
Sem műszereid teljesítménye, Sem terveid pontossága Gondolataid eredetiségét és
Megfigyeléseid élességét.

SELYE JÁNOS
(1907 - 1982)

ELECTRO **MED** Kft.

- NIKON laboratóriumi mikroszkópok forgalmazása és magyarországi szervizképviselése.

- Képanalizátoros-mikroszkópos video-rendszerek, szaktanácsadás.

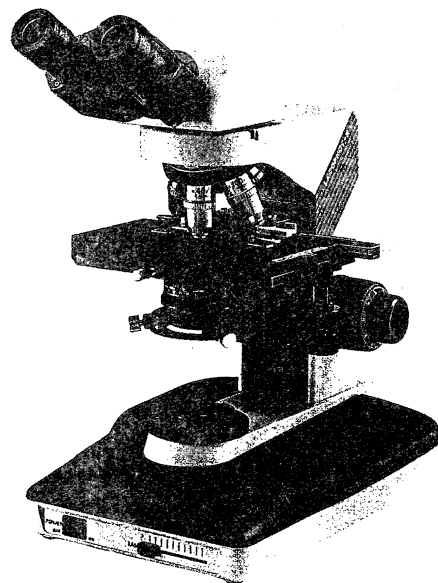
- Régi típusú használt mikroszkópok (C.Zeiss-PZO-Román-stb...) vétele, eladása, javítása, karbantartása.

- Speciális mikroszkóp izzók forgalmazása.

- Fedőlemezek, tárgylemezek, immerziós olaj, Bürker-kamra és speciális HIDRO-BIOS üvegedények, planktonkamrák forgalmazása.

Clinical/Routine Microscope

LABOPHOT-2



DOKTORANDUSZOK ELSŐ ORSZÁGOS KONFERENCIÁJA A MOLEKULÁRIS ÉS KÍSÉRLETES ÉLETTUDOMÁNYOK TERÜLETÉN

A Debrecenben 1996. augusztus 28-30. között megrendezett országos konferencián a kísérletes és molekuláris biológia területén dolgozó doktoranduszaink számára első ízben adódott lehetőség, hogy társaik és a terület hazai művelői előtt beszámolhassanak eddig elért eredményeikről. A konferencia megrendezését a Debreceni Orvostudományi Egyetem a Magyar Biokémiai Egyesülettel karöltve vállalta és a cél megvalósításához támogatókat is sikerült megnyernünk, így a Biogal Gyógyszergyárat, a Boehringer Mannheim GmbH-t, a Felzárkózás az Európai Felsőoktatáshoz Alapot, a Merck Sharp & Dohme Scientific Study Center-t, az OMFb-t és a Sigma-Aldrich Kft-t. Ezúton is szeretnénk köszönetet mondani támogatóinknak, akik felismerték a konferencia megrendezésének jelentőségét. Tavasszal megjelent felhívásunkra végül is az ország szinte minden kutatóhelyéről 185 hallgató jelentkezett, közülük 149-en tartottak 10 perces előadást, melyet 5 perces vita követett. Nagy örömünkre szolgált ez a magas részvételi arány, mutatva, hogy az elmúlt években jelentős igény alakult ki hasonló rendezvények megtartására. Az előadásokra három helyszínen párhuzamosan került sor, összesen 24 szekcióban. Néhány szekció a teljesség igénye nélkül: Neurobiológia, Patobiokémia, Genetika, Enzimológia, Immunológia, Növénybiológia, Onkológia, Biofizika, Mikrobiológia, Hematológia, Fiziológia. A szekciók vezetésére sikerült elhívunk az adott terület rangos művelőit, így a konferencia páratlan lehetőséggel szolgált minden fiatal számára az eddig elvégzett kutatómunka eredményeinek bemutatására igazán értő közönség előtt. A találkozás öröme, az alkalom, hogy a fiatalok megismerhessék egymást, remélhetően nagy jelentőséggel bír a jövőt illetően, hiszen egy-két évtized múlva már ez a nemzedék fogja meghatározó módon képviselni ezt a területet a hazai tudományos életben. Számos olyan intézmény képviselőjét hívtuk meg, melyek a doktori program országos szintű irányítói és döntéshozói, a konferencián tartott "Fórum" keretében megszólalási lehetőséget biztosítottunk nekik. A hallgatóság számára kiváló alkalom volt ez kérdések felvetésére. Jelen volt a Művelődési és Közoktatási Minisztérium, a Munkaügyi Minisztérium, az Országos Akkreditációs Bizottság és a Doktoranduszok Országos Szövetségének képviselője is. A tudományos munka finanszírozási helyzetéről az OTKA, az OMFb és az ETT képviselői adtak tájékoztatást. Központi szerep jutott elsősorban a végzős doktoranduszok számára nagyon fontos ösztöndíj lehetőségek bemutatására, egyfajta "Állásbörze" megrendezésével. Az egyre bővülő lehetőségekről a Magyar Ösztöndíj Bizottság, a Soros Alapítvány és a Fulbright Bizottság képviselői adtak tájékoztatást az érdeklődőknek. Rövidesen összefoglaló kiadványt jelentet meg a DOTE a résztvevők számára a különböző ösztöndíj és nemzetközi lehetőségekről. Az alig két és fél napos konferencia során lehetőség volt a három éve beindított doktori programról gyűjtött tapasztalatok megvitatására, a jelenlegi helyzet értékelésére az egész hazai tudományos élet és szűkebb értelemben a molekuláris és kísérletes élettudományok területén. Ebben az évben végeznek az első hallgatók a programban, a programból kilépők sorsának alakulása és a jövő lehetőségeinek felkutatása ezért különösen fontos. Reméljük, hogy a konferencia résztvevői kellemesen érezték magukat nálunk, sikerült hasznosan tölteni az idejüket Debrecenben, és rendezvényünk tapasztalatai hagyományt teremtenek hasonló találkozók szervezésére.

Dr. Fésüs László
a Szervezőbizottság
elnöke

Élmény(dús)beszámoló a FEBS 24. Kongresszusáról

A FEBS idei kongresszusának július 7-12. között Katalónia fővárosa, Barcelona adott otthont. A házigazda, a Spanyol Biokémiai és Molekuláris Biológiai Társaság a Barcelonai Egyetem Biológiai és Kémiai Tanszékét, illetve a közelben levő Princessa Sofia Szálloda konferencia termét választotta ki a rendezvény színhelyéül. Az Egyetem a város észak-nyugati részén, busszal, metróval könnyen megközelíthető helyen van. Igaz, a magas részvételi díjak ellenére sem kaptunk ingyenes heti bérletet a tömegközlekedési járművekre, mint a stockholmi FEBS Kongresszus idején (az lehetett a kivétel). Én sajnos a megnyitó eseményeiről lemaradtam, mert repülőjegyünk körül adódtak problémák, így egy nappal később érkeztünk. Városnéző túráink során (túl szép, hangulatos és étellel teli város ez ahhoz, hogy ne lettünk volna ott, amikor csak tehattuk) többször sikerült összefutni ismerős magyar kollégákkal, akik egybehangzóan állították, hogy a nyitó fogadás meglegedésükre szolgált az Egyetemmel átellenben található Királyi Palota díszkertjében. Általában az volt az érzésem, hogy a szociális események jól és elegánsan szervezettek voltak (pl. a Katalán Zene Palotájának gyönyörűsége, szecessziós nagytermében rendezett barokk ének hangverseny), a kongresszusi helyszíneken viszont találkoztam olyan szervezővel, aki egy szót sem tudott angolul.

Elkalandozásom után visszatérve írásom tárgyára, a kongresszuson egy nyitó és öt plenáris előadás hangzott el a hat napon. A plenáris előadások a következők voltak:

Massagué J. (New York): TGF β Family signals: from morphogens to antimitogens

Schell J. (Köln): Probing the mechanism of action of old and new phytohormones

Huber R. (Martinsried): Protein structures at the interface of chemistry, physics and biology

Klug A. (Cambridge): Protein designs for the recognition of DNA and gene regulation

Weissmann C. (Zürich): The role of Prp in prion disease

Az előadók közül többen is évről évre, különböző konferenciákon felbukkanó "állandó" plenáris előadók, nevük minőséget fémjelez. Például a Nobel-díjas Huber professzor a martinsriedi Max Planck Intézetből, vagy a magyar származású, hallgatóságát mindig elszórakoztató Weissmann professzor. Előadása a prion betegségekről külön aktualitást kapott az angliai kerge marha kór után (összefoglalója a FEBS Letters különszámában is elolvasható). A Biokémia 1995. decemberi számában ismertetett, a baseli FEBS Kongresszuson elmondott eredményeit kiegészítette a prion fehérje deléciós mutánsaival végzett kísérletek bemutatásával. A nem hibás prionra nézve "knock out" egerekkel végzett kísérletek alapján (ezek nem fogékonyak a hibás prion fehérje okozta betegségekre) pedig azt az érdekes javaslatot vetette fel, hogy megoldás lenne prion "knock out" birkák és marhák tenyésztése. Bár ennek gyakorlati kivitelezésére az előadó maga sem lát igazi esélyt.

A kongresszus témaköreit öt nagy szimpóziumra osztották: A betegségek molekuláris és metabolikus mechanizmusai; Makromolekulák szerkezet-működés összefüggései; Jelátvitel és sejtproliferáció; A genom szerveződése és génexpresszió; A fejlődés és a

differentiálódás molekuláris mechanizmusai. A szimpóziumok általában öt szekcióra oszlottak, természetesen átfedésekkel. Az előadók (szám szerint 165) többsége most európai volt, nem illethetjük hasonló kritikával a szervezőket, mint a baseli kongresszus esetén. Igaz, a kelet-európai előadó ritka volt, mint a fehér holló, mindössze egy cseh, egy szlovén, egy bolgár és két magyar (Vígh László, Szeged; Bánfalvi Gáspár, Budapest) kutatót ért ez a megtiszteltetés. Egzotikumként egy szingapuri és egy japán tudóst is meghívtak előadni. Aki nem akart leragadni egy-egy szekció előadásainál, annak bizony szednie kellett a lábát, ha a különböző helyszínek között vándorolt fel-alá (útba igazító táblák híján eleinte keresgélni is kellett). Az ilyen hatalmas kongresszusok jellegéből adódóan sajnos mi most saját szűkebb szakterületünkbe vágó előadásokat nem találtunk, helyette általános tájékoztatót kaptunk a kurrens témákban a tudomány jelenlegi állásáról. Délutánonként kétórás workshopok keretében vitathatták meg egy-egy szűkebb terület képviselői eredményeiket. Néhány a workshopok témáiból: Nitrogén metabolizmus, A fehérjék sejten belüli szállítása, Az Alzheimer-kór.

A résztvevők érdeklődési körére utalt a poszterek számának szekciónkénti erős ingadozása, a körülbelül hétszáz bemutatott poszter közül kiemelkedően sok csatlakozott a jelátviteli folyamatok, az apoptózis, a transzkripció regulációja és a lipidmetabolizmus témakörökhöz. Poszteremet a Molekuláris kölcsönhatások a membránokban című szekcióban mutattam be. Ez a szekció a népesebbek közé tartozott, 51 poszter került kiállításra, ám témánkban, a daganatok multidrog rezisztenciájának kutatásában nem találtunk "rokon lelkekre". Néhány lelkes érdeklődő alaposan áttanulmányozta poszterünk anyagát, és a metodikai kérdésekről mindkét fél számára hasznos és érdekes párbeszéd alakult ki. Laboratórimunkat még három poszter képviselte a kongresszuson, közülük kettő ugyanebben a szekcióban került bemutatásra (Holló Zsolt, Hegedűs Tamás), a harmadik a Proliferáció, differenciáció, apoptózis témakörben (Magócsi Mária).

A poszterszekciót kísérő kiállításon két tucat nemzeti illetve nemzetközi cég képviseltette magát (például az Amersham, a Molecular Probes, a Photon Technology International, a Pharmacia, a Sigma, a Springer Verlag).

A kongresszus zárásakor szívélyesen invitálták a résztvevőket a jövő évi FEBS Special Meeting-re (From Membrane to Nucleus), Amszterdamba.

Végül megpróbálom érzékeltetni a város hangulatát, a leírás persze csak halvány mása az élményeknek. Barcelona elbűvölt: a termő narancsfák (dísznövények, a gyümölcsük ehetetlen), a rengeteg hatalmas leander, a geometriai pontossággal futó széles sugárutak fáin mindenütt cserregő papagájok, a gótikus negyed sokszáz éves sikátorai, hatalmas katedrális és templomai, a kikötő pálmásora. Élvezettel nézegettük a vásárcsarnok tenger gyümölcseitől és déligyümölcsöktől roskadozó pultjait, kóstolgattuk esténként a nemzeti eledeleket (gazpacho, paella, tortilla), ízlelgettük igazi helyi kiskocsmákban a Sangria-nak nevezett gyümölcsbor zamatait.

Amszterdamban találkozunk?

Müller Marianna

Országos Haematológiai és Immunológiai Intézet