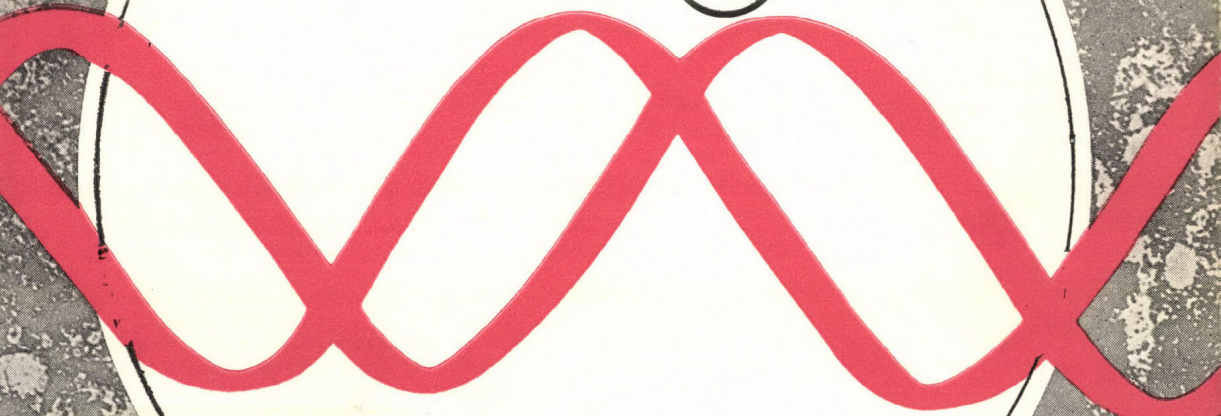


304 4141

50
1982

biológia



30, 1982/1

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

SZERZŐINK SZÍVES FIGYELMÉBE!

A **BIOLÓGIA** (korábban *Biológiai Közlemények*) évente két füzetet tartalmaz. Elsősorban az *elméleti és molekuláris biológia, a sejttan, örökléstan, és a kísérletes onto- és filogenetika* tárgyköréből közöl cikkeket. A dolgozatok következő típusait részesítjük előnyben:

- *teoretikus cikkek;*
- *valamely munkacsoport kísérletekre alapozott elméletének ismertetése, elsősorban a koncepció bővebb kifejtése;*
- *a biológia valamely részterületének legújabb irodalmát összefoglaló (review) munkák;*
- *az adott formában másutt nem publikált kísérleti beszámolók.*

A lap ezenkívül *vitákat indító, vagy azokhoz hozzászóló* cikkeket, valamint *könyvismertetések*et és *kongresszusi beszámolókat* is közöl.

A kéziratokat — az intézmény vezetőjének jóváhagyása után — *két példányban*, a mellékleteket (rajzokat, fényképeket) egy példányban, a következő címre kérjük beküldeni: **BIOLÓGIA Szerkesztősége**, Dobozy Ottó technikai szerkesztő, 1445 Budapest, Nagyvárad tér 4. A cikkek elfogadásáról a Szerkesztőbizottság — a beérkezett szakértői vélemények alapján — évente két alkalommal dönt. Az elutasított dolgozatokat visszaküldjük, ill. javasoljuk más profilú laphoz való beküldését.

A dolgozatok *fejléce* tartalmazza a *címet, a szerző(k) teljes nevét, az intézet és a város megnevezését, valamint a kulcsszavakat.*

A teoretikus cikkek és az irodalmi feldolgozások **tagolása** tetszőleges. A bonyolultabb tagolású cikkekhez „*fejezettrangsor*” kell mellékelni, amelyből világosan kitűnik az egyes fejezetek egymáshoz való viszonya. A decimális fejezetszámozást lehetőleg kerüljük. Az eredeti kutatómunkát ismertető cikkeket a következőképpen kell tagolni: Bevezetés — Anyag és módszer — Eredmények — Megvitatás — Összefoglalás — Irodalom.

A szövegben *dőlt betűvel* (amit folyamatos vonallal való aláhúzás jelöl) kell kiemelni:

- a tudományos *genus-* és *fajneveket;*
- az *in vivo, in vitro* és a *de novo* kifejezéseket;
- valamint az ábrákra, ill. a táblázatokra való hivatkozáskor azok sorszámát.

A szerzők neveit **NAGYBETŰVEL**, a ritkított szöveget *r i t k á n* kell írni.

A szövegben az irodalomra a cikkek sorszámával, vagy pedig a szerző(k) nevével és a cikk sorszámával kell hivatkozni. A cikkek sorszámát szögletes zárójelbe kell tenni.

Az **irodalomjegyzéket** sorszámozva, ABC sorrendben kell összeállítani a következő példák szerint:

A) folyóirat cikk esetén:

1. BROWN, J. (1973) Heredity and ontogeny. *Nature*, 238, 19—27.

B) könyv idézésekor:

1. MOURANT, A. E., KOBCECA, C. and DOMANIEVSKA-SZOBSZCAK, K. (1976) *The distribution of the human blood groups and other polymorphisms*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford

C) gyűjteményes mű felhasználásakor:

1. MILLER, O. L. and LEATTI, B. L. (1969) Nucleolar structure and function. In: LIMA DE FARIA, A. (ed.): *Handbook of molecular cytology*. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 605—619.

Az irodalomjegyzékben csak azokat a szerzőket lehet feltüntetni, akikre szöveg közben hivatkozás történt.

A lapban megjelenő dolgozatokat külföldi *referáló folyóiratok* angol nyelvű összefoglalóik, ill. címük alapján ismertetik. Ezért célszerű az **angol összefoglalás** informatív, szabatos megfogalmazása.

Az **ábramagyarázatokat** — magyar és angol nyelven — külön lapra kell gépelni, ábránként új bekezdésben. A grafikonokat és rajzokat ábra, a fényképeket kép megjelöléssel kell sorszámolni, arab számokkal. A cikkhez mellékelt ábrák hátoldalán szerepeljen azok sorszáma és a szerző neve. Színes ábrát a Szerkesztőség nem fogad el. Külön lapon kell mellékelni a **táblázatok** magyar és angol nyelvű címét római számokkal. Az ábrák és táblázatok magyar és angol sorszámát, valamint a magyar címét folyamatos vonallal való aláhúzással kell kiemelni.

A dolgozat végén jelöljék meg a *szerző* nevét és munkahelyének **pontos címét** (irányítószámmal).

A megfogalmazásnál ügyeljenek a világos, *magyar stílus* használatára, a helyesírási kérdések eldöntésénél az MTA legújabb kiadású „A magyar helyesírás szabályai”-ban foglaltak tekintendők irányadónak.

A közlemény elfogadása esetén a szerzők megkapják a *hasáb-* és a *tördelt lenyomatot*. Ezen a nyomda hibájából eredő javításokat kék, a szerzői korrektúrát piros színnel kell bejelölni. A kéziratból eltérő javításokat vagy kiegészítéseket csak kivételes esetekben lehet elfogadni.

Szerzőinket a kiadott cikkekért az Akadémiai Kiadó által szabályozott *ívhonorárium* illeti meg, és amennyiben előzetesen nem rendelkeznek másként, térítés ellenében 100—100 *különlenyomatot* bocsátunk rendelkezésükre.

BIOLÓGIA

ELMÉLETI ÉS KÍSÉRLETI BIOLÓGIAI
FOLYÓIRAT

A szerkesztőség elnöke:
CSABA GYÖRGY

Szerkesztőbizottság:

CSÁNYI VILMOS
DOBOZY OTTÓ
(technikai szerkesztő)
FARAGÓ ANNA
GÁNTI TIBOR
HEGYI GYÖRGY
KISZELY GYÖRGY
KOMÁROMY LÁSZLÓ
VIDA GÁBOR



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A TRANSZFER RNS ÉS LEHETSÉGES ENZIMFUNKCIÓJÁNAK ÉRTELMEZÉSE ÁLTALÁNOS TÉRSZERKEZETE ALAPJÁN

KORÁNYI PÁL

Rozmaring Mg. Tsz. ROTOX Kártevőmentesítő Ágazat, Budapest

Beérkezett: 1981. augusztus 10-én

Kulcsszavak: tRNS szerkezet, stabilitás, enzimfunkció

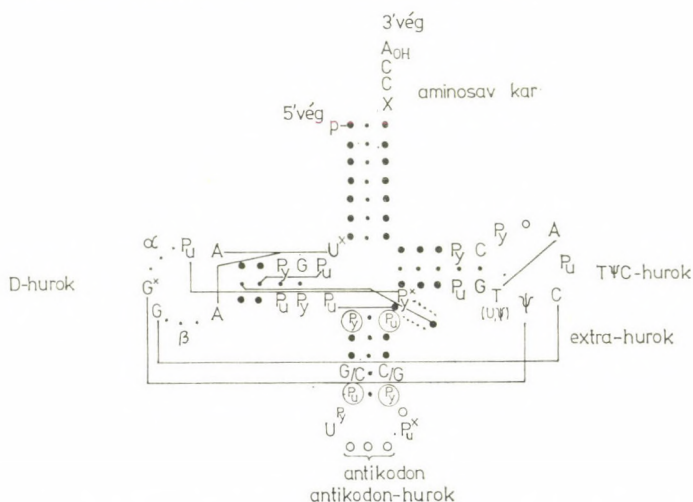
Általánosan elfogadott az a feltevés, miszerint az RNS az ősi genetikai információ hordozójaként előbb jelent meg az evolúció során mint a DNS. Ennek, illetve a mai enzimfehérjék koenzimeinek, valamint az egyes RNS-ek sajátosságainak alapján többen felvetik az enzimtulajdonságokkal rendelkező RNS-ek képződésének lehetőségét [2, 3, 12, 20]. A prebiológiai evolúció modern elmélete szerint az enzim-RNS-eknek centrális szerepük volt a korai anyagcserében [6]. Mai tudásunk szerint különösen a tRNS-ekhez hasonló struktúrák hordozhattak katalitikus funkciókat. Ez a korábban inkább közvetett bizonyítékokon alapuló hipotézis a tRNS-ek általános háromdimenziós szerkezetének tanulmányozásával reálisnak látszik.

A tRNS-ek ilyen jellegű kiemelése részben tercier szerkezetük kellő ismeretével, részben pedig az ősi élőlényekben betöltött feltételezett központi szerepükkel indokolható. Az 5S rRNS-ek minden bizonnyal közeli rokonságban állnak a tRNS-ekkel, térszerkezetükre vonatkozó tudásunk azonban egyelőre nem kielégítő [19]. A köztük levő strukturális, funkcionális és evolúciós kapcsolatok feltárása jelentős mértékben hozzájárulhat az enzimfunkciójú nukleinsavakról alkotott jelenlegi elképzeléseink továbbfejlesztéséhez. A viszonylag kis méretű tRNS-ek és 5S rRNS-ek mellett a 16S rRNS-ek vizsgálata is figyelemreméltó adatokat szolgáltat ebből a szempontból. A rendelkezésre álló szekvenciák alapján a prokarióta eredetű 16S rRNS-ek másodlagos szerkezete nagyon hasonló [15]. Ennek bonyolultságánál, valamint a molekula méreténél fogva a tercier szerkezet egyelőre ismeretlen, de minden bizonnyal — legalábbis elvben — az alább ismertetésre kerülő tRNS-ekéhez hasonló. A 16S rRNS-ek is számos konzervatív szekvenciát tartalmaznak, melyek a nem-bázispárosodott régiókban helyezkednek el és valószínűleg funkcionális jelentőségűek. Ezek a régiók bizonyíthatóan úgy helyezkednek el, hogy más molekulákkal könnyen kölcsönhatásba léphessenek. Ugyanakkor erősen variábilis régiók is megfigyelhetők. Az egész struktúra rendkívül flexibilis és konformációs változásokra képes. Mindezek a tulajdonságok — mint azt a tRNS-ek esetében is látni fogjuk — az enzimfunkció előfeltételei.

A molekula egyéb funkcióit most figyelmen kívül hagyva, a 16S rRNS-ek meghatározott konzervatív régiói felelősek az mRNS-ek és a tRNS-ek felismeréséért, a megfelelő kodon-antikodon kölcsönhatások létrejöttéért, illetve a transláció során fellépő transzlokációért. A transláció meghatározó elemei így nyilvánvalóan az RNS-ek, míg a fehérjék — a rekonstitúciós kísérletek tanúsága szerint is — csupán facilitáló szerepet töltenek be. Így igen valószínű, hogy

az ősi transzláció csupán katalitikus funkciójú RNS-ek működésén alapult. A folyamat evolúciója során épültek be a fehérjefaktorok és alakultak ki a riboszómák. Mindezek bizonyítására azonban az egyes rRNS-eket — beleértve a 23S rRNS-eket is — legalább olyan mértékben kell megismernünk, mint a tRNS-eket.

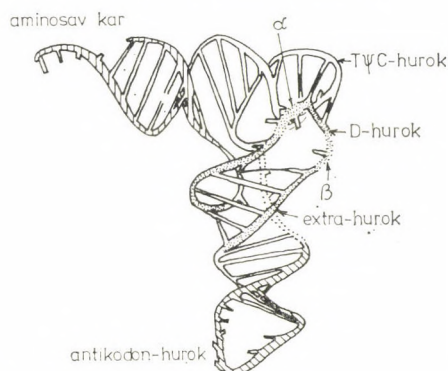
Az első tRNS szekvenciák megállapítása elvezetett a jól ismert lóhere alakú térszerkezeti modell megalkotásához, amely a maximális bázispárosodási rendszer kialakulását két dimenzióban értelmezi. Egy ilyen struktúrához — amely nagyjából egy síkban elhelyezkedő bázispárosodott régiókból és hidrogénhíd kötésektől mentes hurkokból áll — viszonylag nehezen rendelhető bármilyen katalitikus funkció. Ezen túlmenően a 3—7 bázispárra kiterjedő hidrogénhíd kötési magokból felépülő szerkezet stabilitása vizes oldatokban kétségbe vonható — noha a többé-kevésbé specifikus kölcsönhatások természetesen értelmezhetők segítségével. A tRNS-ek fizikai tulajdonságai azonban azt mutatták, hogy ennél — a többi RNS fajtaéhoz viszonyítva is — egy jóval tömörebb, ellenállóbb és stabilabb struktúrával van dolgunk, amelyben a nem bázispárosodott részek is viszonylag védve vannak [14, 22].



1. ábra. A tRNS-ek állandó nukleotidjait felüntető általános lóhere alakú térszerkezeti modell. A struktúra viszonylag távoli nukleotidjait összekötő kihúzott vonalak azokat a bázispárosodási kölcsönhatásokat jelölik, amelyek az L alakú szerkezetet stabilizálják. A változó bázisösszetételű régiókat (extra-hurok, a D-hurok alfa és béta régiói) pontozott vonal jelzi. Pu = purin bázis, Py = pirimidin bázis, a csillag erősen módosított bázisra utal, az X pedig a tRNS fajtájától függő tetszőleges bázis. A bekarikázott jelölések nem állandó, de igen gyakran előforduló összetevőkre utalnak. A kitöltött körökkel jelölt tetszőleges nukleotidok a bázispárosodási rendszer tagjai, míg az üres karikák olyan nukleotidokra utalnak, amelyek nem alakítanak ki hidrogénhíd kötéseket

Fig. 1. The general cloverleaf diagram of all tRNA-sequences illustrating their constant nucleotides. The solid lines connecting nucleotides indicate those hydrogen bonding interactions which stabilize the L-shaped tertiary structure and bring together the far parts of the molecule. The variable regions (variable loop, α and β regions of the loop D) are marked with dotted lines. Pu stands for purines, Py for pyrimidines, * for markedly modified bases and X for an arbitrary base depending on the nature of tRNA. The bases in circles are frequently occurring, however not general constituents of tRNA. The thick full circles are hydrogen-bonded nucleotides, the open circles are kinds of nucleotides which do not participate in base-pairing

Az említett megfigyeléseket alátámasztják azok az eredmények, amelyek szerint a tRNS-ek *in vivo* terciér szerkezete — további térbeli intramolekuláris kölcsönhatások révén — L betűhöz hasonló [9, 10, 11]. Ebben a modellben a maximális bázispárosodási rendszer már három dimenzióban definiált. Az 1. ábra szemlélteti a több mint száz primer szerkezet birtokában megszerkesztett általános tRNS szekvenciát, illetve azt, hogy az elsőrendű, lóhereszerű térszerkezetből (a továbbiakban terc I szerkezet) milyen további bázispárosodások útján alakul ki a másodrendű, L-szerű térszerkezet (a továbbiakban terc II szerkezet). A terc II szerkezetben a molekula viszonylag távoli részei között jön létre kölcsönhatás, hidrogénhidak révén (2. ábra). Az L betű két szárának az aminosav kar és az antikodon-hurok felel meg, míg a sarokrészben a D-hurok rásimul a TΨC-, illetve extra-hurokokra és hidrogénhid kötésekkel alakít ki velük. A bázispárok száma, illetve a komplementaritás így már maximális a több mint száz hidrogénhid kötés révén. Ez a struktúra egyben lehetővé teszi a szinte egész molekulára kiterjedő hidrofób (interplanáris) kölcsönhatási rendszer kialakulását, amely az említett extra hidrogénhid kötésekkel együtt jól értelmezi az enzimfunkcióhoz nélkülözhetetlen extrém stabilitást. Ugyanakkor kísérleti bizonyítékok vannak arra nézve, hogy ez a stabil szerkezet bizonyos környezeti hatásokra meghatározott konformációs változásokra is képes [5, 8, 16], tehát segítségével a tranziens állapotok is értelmezhetők.



2. ábra. A tRNS-ek L betűhöz hasonló térbeli modellje. A kettős szálú régiókat kialakító hidrogénhidakat a fehér keresztkötések, míg a további másodlagos kölcsönhatásokat a feketék jelölik
 Fig. 2. The L-shaped spatial diagram of tRNAs. Unshaded crossbars indicate the hydrogen bonds in double helical stems. Additional tertiary interactions are shown by black crossbars

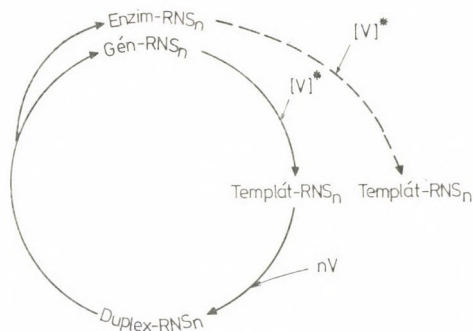
A terc II szerkezet hidrogénhid kötéseinek zömében a tRNS-ek állandó bázisalkotói között jönnek létre, ami alátámasztja a struktúra általános voltát. Eltéréseket ettől jobbra csak akkor találunk, ha a bázispárosodás három nukleotidot érint. Az extra hidrogénhidak kialakításában számos minor bázis vesz részt, ami részben értelmezi funkciójukat. Ezek a kötések csak részben a megszokott WATSON—CRICK-szerűek; kialakításukban sokszor a foszfátcsoportok is részt vesznek [17]. A terc I és terc II szerkezetek alapján belátható, hogy a tRNS-ek állandó alkotórészei a 3' végén elhelyezkedő CCA szekvencia és az antikodon-hurok három bázisa kivételével zömében szerkezetstabilizáló funkciókat töltenek be és így konzervatív régióknak tekinthetők. (Megjegyzendő, hogy az említett kivételes régiók különleges funkciói is nagyjából tisztázottak.)

Ugyanakkor a terc II szerkezet kialakulásával a terc I szerkezet olyan részei kerülnek szoros kapcsolatba, amelyek a tRNS szekvenciák változó összetételű régióiként ismeretesek. Nevezetesen ezek az extra-hurok, illetve a D-hurok alfa és béta régiói. Az ezeket alkotó nukleotidbázisok különleges tulajdonsága, hogy döntő többségük sem a hidrogénhid, sem pedig a hidrofób kötési rendszerben nem vesz részt. Atomcsoportjaik tehát viszonylag szabadon állnak és — a tRNS szekvenciák függvényében — specifikus kölcsönhatások kialakítására képesek, valószínűleg hasonlóan a 3' végen levő CCA szekvenciát követő 4. nukleotidbázishoz, mint arra már régebben utaltak [4]. Elképzelhető tehát, hogy a D-, a T^{YC}-, illetve az extra-hurkok kölcsönhatásaival specifikus szubsztrátkötő és katalitikus hely alakult ki a tRNS-eken — hasonlóan a fehérje-enzimekhez, ahol szintén távoli aminosavmaradékok kontaktusával jön létre az aktív hely, amelyet másodlagos kötések stabilizálnak. Ezeket az elméleti megfontolásokat alátámasztják azok a kémiai szerkezeti vizsgálatok, amelyek kitüntetett kölcsönhatásokra utalnak meghatározott, kis polimerizációs fokú oligoribonukleotidok és aminosavak között [1], illetve poliribonukleotidok peptidkötést kialakító hatásáról számolnak be [21]. Mindent egybevetve bizonyíthatónak látszik SMITHIES egykori feltevése, miszerint az ősi tRNS-ek specifikusan köthettek pl. aminosavakat és azok acilálására is képesek voltak [18].

A 16S rRNS-ekre vonatkozó és részben említett ismereteink alapján így a csupán RNS-ek közreműködésén alapuló, templát-dependens peptidszintézis egykori létezése valószínűsíthető. A tRNS-szerű struktúrák korábban összefoglalt enzimatis funkciói [13] közül a BREWIN által leírt [2] és később általánosított replikázfunkció a mechanizmus tekintetében is reálisnak tűnik. Így tehát a tRNS-ek valódi enzimekként viselkedhettek.

Az ismertetett stabilitási és térszerkezeti tulajdonságok alapján feltételezhető a tRNS-szerű struktúrák enzimatis aktivitása. GÁNTI a chemoton modell alapján feltételezte, hogy a prebiotikus evolúció során kifejlődő élő rendszerek genetikai anyaga nem egy gigantikus nagyságú makromolekula, hanem számos kisebb tRNS-szerű struktúra volt [6, 7]. Ezek az adott körülmények között spontán képződhettek és monomersorrendjüket utódról utódra örökíthették. Funkcióikat tekintve egyaránt betölthették a gén és az enzim szerepét. Az enzim-RNS-ek esetében ez a működésbeli kettősség egyértelmű, azonban a róluk készült komplementer RNS-ek (ún. gén-RNS-ek) — funkciós csoportjaik eltérő térbeli helyzetze folytán — nem rendelkeznek enzimaktivitással, vagy legalábbis ugyanazzal az enzimaktivitással, mint a megfelelő enzim-RNS pár. Viszont egyértelmű, hogy a gén-RNS-ekről mindig készülhet enzimhatású kópia.

Ahhoz azonban, hogy a prebiotikus metabolizmus vázolt elvei megvalósuljanak, feltétlenül szükséges, hogy az enzim-, illetve a gén-RNS-ek térszerkezete a replikáció idejére fellazuljon, majd pedig a folyamat befejeztével palindrómás intramolekuláris régióik révén visszanyerjék aktív globuláris konformációjukat. Ezek szerint az RNS-ek prebiotikus körülmények között ciklikus változásokon mennek keresztül, amit a 3. ábra szemléltet. A folyamat lényege az enzim- és gén-RNS-ek stabil tercier szerkezetének időleges megbontása és másolódásra való alkalmassá tétele. A korábban elfogadott tRNS térszerkezet (pusztán terc I szerkezet) a kettős szálú régiókat stabilizáló egyes hidrogénkötések hőmozgás hatására történő időleges felbomlása révén lehetővé tenné, hogy a közegben jelenlevő polimerépítő monomerek — már viszonylag alacsony koncentráció esetén is — komplementer módon beépüljenek a szintetizálódó iker-



3. ábra. A prebiotikus RNS-ciklus vázlatja. V a láncépítő monomereket, n pedig a polimerizáció fokát jelöli. $[V]^*$ az a monomerkoncentráció, amelynél az enzim-RNS-ek globuláris szerkezete felbomlik

Fig. 3. The scheme of the prebiotic RNA-cycle. V stands for the monomers and n is the degree of polymerization. $[V]^*$ is a supra-critical concentration of monomers which affects the structure of globular RNA

lánca. Így a replikáció időről időre folyamatosan végbemehet. Belátható azonban, hogy ez a struktúra szüntelen megbomlásánál fogva lehetetlenné tenné az enzimműködést, az ehhez szükséges szerkezeti stabilitás hiányában.

A terc II szerkezet létezése — extrém stabilitásánál fogva, amit a hidrolízissal szemben mutatott ellenállóképessége [14, 22] is bizonyít — eliminálja a folytonos replikáció lehetőségét. Így az enzim-RNS-eknek megfelelő idő áll rendelkezésre a katalitikus működés számára. A terc II szerkezet minden bizonnyal csupán egy olyan kritikusnál magasabb monomerkoncentráció ($[V]^*$) esetén lazul fel, ahol reálissá válik annak a valószínűsége, hogy a terc II hidrogénhidak statisztikus felbomlása elegendő komplementer nukleotid beépülését eredményezi. Ennek következtében a molekulának nagyságrendileg nagyobb stabilitást biztosító hidrofób kölcsönhatási rendszer felbomlik és a másodlagos kötések lassú dezorganizációját követően a terc I szerkezet már viszonylag gyorsan despiralizálódik, ami a replikáció teljes végbemenetelét vonja maga után. (A folyamat hasonló a DNS információátadását megelőző szuperhélix-despiralizációhoz, illetve az enzimfehérjék inaktiválódását megelőző terciér szerkezetdestrukcióhoz.) A keletkezett duplex RNS molekulák újból funkcióképes egyszálú, globuláris formává való alakulását az intramolekuláris palindrómás szekvenciák teszik lehetővé. Ezek kialakulását és jelentőségét GÁNTI részletesen tárgyalja [6, 7]. A replikáció szinkronizáltságát az anyagcserével a monomerkoncentráció gyors csökkenése és a kritikus érték alá való kerülése biztosítja.

A tRNS-ek különleges térszerkezete alátámasztja a prebiológiai evolúció értelmezését az RNS-chemotonok alapján, illetve a hasonló felépítésű polinukleotidok lehetséges enzimaktivitását fehérje-enzimek távollétében. Egyben felveti a replikáció és a szintézis fázisainak e szinten való elkülönülését, valamint ennek következtében a metabolikus szinten történő vezérlés és szinkronizáció alapelveit is.

A nukleinsav-enzimek elméletének részletes kifejtése, illetve bizonyítása megköveteli a tRNS-ek mellett a különböző rRNS-ek térszerkezetének pontos feltárását. Az előzetes eredmények szerint a transzfer és riboszomális RNS-ek

strukturális szerveződése alapvetően azonos és egyben lehetővé teszi a katalitikus működést. Elképzelhető, hogy az említett RNS-eket tekintve egy alapvetően ősi eredetű vegyületesoport különböző alcsoportjaival van dolgunk — hasonlóan a fehérje-enzimek egyes enzimosztályaihoz. Ezeknek a vegyületeknek az evolúciója azonban rendkívül töredékesen ismert.

IRODALOM

1. BALASUBRAMANIAN, R., SEETHARAMULU, P. and RAGHUNATHAN, G. (1980) A conformational rationale for the origin of the mechanism of nucleic acid-directed protein synthesis of "living" organisms. *Origins of Life*, **10**, 15—30.
2. BREWIN, N. (1972) Catalytic role for RNA in DNS replication. *Nature*, **236**, 101.
3. CRICK, F. H. C. (1968) The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.*, **38**, 367—380.
4. CROTHERS, D. M., SENO, T. and SÖLL, D. G. (1972) Is there a discriminator site in transfer RNS? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 3063—3067.
5. FRESCO, J. R., ADAMS, A., ASCIONE, R. HENLEY, D. and LINDAHL, T. (1967) Tertiary structure in transfer ribonucleic acids. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 527—537.
6. GÁNTI T. (1979) A prebiológiai evolúció értelmezése a chemoton elmélet alapján. *Biológia*, **27**, 161—175.
7. GÁNTI T. (1980) *Biológiai egységrendszerek belső szerveződésének elméleti vizsgálata*. Doktori értekezés, Budapest.
8. HENLEY, D. D., LINDAHL, T. and FRESCO, J. R. (1966) Hydrodynamic changes accompanying the thermal denaturation of transfer ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 191—197.
9. KIM, S. H., QUIGLEY, G. J., SUDDATH, F., MCPHERSON, A., SNEDEN, D., KIM, J. J., WEINZIERL, J. and RICH, A. (1973) Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: Folding of the polynucleotide chain. *Science*, **179**, 285—288.
10. KIM, S. H., SUDDATH, F. L., QUIGLEY, G. J., MCPHERSON, A., SUSSMAN, J. L., WANG, A. H. J., SEEMAN, N. C. and RICH, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science*, **185**, 435—440.
11. KIM, S. H., SUSSMAN, J. L., SUDDATH, F. L., QUIGLEY, G. J., MCPHERSON, A., WANG, A. H. J., SEEMAN, N. C. and RICH, A. (1974) The general structure of transfer RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 4970—4974.
12. KORÁNYI P. (1978) *Nukleinsavak enzimatikus tulajdonságai primitív biológiai rendszerekben*. Szakdolgozat, ELTE Genetikai Tanszék.
13. KORÁNYI P. and GÁNTI T. (1981) Koenzimek, mint az ősi enzim-RNS-molekulák maradványai. *Biológia*, **29**, 107—124.
14. NISHIMURA, S. and NOVELLI, G. D. (1965) Dissociation of amino acid acceptor-function of sRNA from its transfer function. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **53**, 178—184.
15. NOLLER, H. F. and WOESE, C. R. (1981) Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, **212**, 403—411.
16. OLSON, T., FOURNIER, M. J., LANGLEY, K. H. and FORD, N. C. (1976) Detection of a major conformational change in transfer ribonucleic acid by laser light scattering. *J. Mol. Biol.*, **102**, 193—203.
17. RICH, A. (1978) Transfer RNA: three-dimensional structure and biological function. *Trends in Biochemical Sciences*, **3**, 34—37.
18. SMITHIES, O. cit. by CRICK, F. H. C. (1968) The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.*, **38**, 367—380.
19. VIGNE, R. and JORDAN, B. R. (1977) Partial enzyme digestion studies on *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Chlorella*, *Drosophila*, HeLa and yeast 5S RNAs support a general class of 5S RNA models. *J. Mol. Evol.*, **10**, 77—86.
20. WHITE, H. B. (1976) Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *J. Mol. Evol.*, **7**, 101—104.
21. WHITE, D. W. and ERICSON, J. D. (1981) Enhancement of peptide bond formation by polyribonucleotides on clay surfaces in fluctuating environment. *J. Mol. Evol.*, **17**, 19—26.
22. WOESE, C. R. (1967) *The tape readers and the tape-reading process. The genetic code*. Harper and Row, New York, 114.

INTERPRETATION OF POSSIBLE ENZYMATIC FUNCTION OF t-RNA-s
ON THE BASIS OF THEIR GENERAL THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE

P. Korányi

Rozmaring Agricultural Cooperative, ROTOX Pest Control Service, Budapest, Hungary

The possible enzymatic role of t-RNA-like molecules in the prebiotic metabolism is well supported by the general three-dimensional structure of t-RNA-s. The L-shaped model shows appropriate stability and can at the same time explain the transitional states. The tertiary arrangement of t-RNA-like molecules enables them to bind substrates and act as catalysts specifically. The opportunity of the periodic replication is also ensured under prebiotic conditions.

On the basis of the structural features of various kinds of RNAs it looks like realistic that these RNAs are survival subgroups of the supposed ancient enzymatic RNAs.

AZ ANYAI HATÁS BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE

SZABAD JÁNOS és CZEIZEL ENDRE

MTA Szegedi Biológiai Központja, Szeged
és Országos Közegészségügyi Intézet Humángenetikai Laboratóriuma, Budapest

Beérkezett: 1981. október 15-én

Kulcsszavak: citoplazmás öröklődés, anyai hatású mutációk, riboszomális RNS, placentaris hatás, születési súly variancia eredete

Bevezetés

Senki sem lepődik meg azon az állításon, hogy az élővilágban az anyák általában nagyobb szerepet vállalnak az utódok reprodukálásában, nevelésében mint az apák. A megfogant peték, majd az ivadékok gondozása többnyire a nőstényekre marad. Az anyaság szerepén a mindennapi gondolkodásunkban is az ivadék- és az utódgondozást értjük. Az anyáknak van azonban egy sokkal ősbibb, alapvető biológiai funkciója is, amely ritkán kerül szóba. Az anya szervezetében képződő petesejtek, peték citoplazmája olyan anyagokat hordoz, amelyek a magzat-kezdeményt egyrészt táplálják, másrészt fejlődését meghatározzák. Ezen túl az anyai szervezetben fejlődő magzatokat számos olyan közvetlen és közvetett hatás is éri, amely nem hagyható figyelmen kívül a születés előtti fejlődés értékelésekor. Mindezeket anyai, *maternális hatásnak* szokás nevezni. A biológiában a maternális hatás értelmezése azonban — éppen összetettsége miatt — elég ellentmondásos. Szerepük az emberi reprodukcióban is jól ismert, de egészen mást jelent a genetikusok, a teratológusok, a gyermekgyógyászok vagy a pszichológusok számára. Éppen ezért érdemes megkísérelni ezeket sorba venni, és azonosságukat, illetve eltérésüket meghatározni. Márcsak azért is, mivel a szakirodalom elég mostohán bánik e témával. Hazánkban részletesebben csak GYÖRFFY BARNA [9] foglalkozott a nem-kromoszomális öröklődéssel és ezen belül az anyai hatással. E tanulmány az ő munkájának továbbgondolása és egyben életműve iránti tiszteletadás.

Az anyai hatás általános biológiai értelmezése

Az anya szerepéről

Mielőtt a maternális hatás lényegét és jelentőségét részletesen ismertetnénk, ismét utalunk az anyai *szerep* közismertebb oldalára. A magasabbrendű növényekben a nőnemű virág módosult leveleiből származó képződmények védik a magzatot, látják el tápanyaggal amikor az fejlődésnek indul. Az állatvilágban az ivadékgondozás alapját azok a magatartásformák adják, amelyek az evolúció folyamán jelentek meg. Csirái már a gyűrűsférgekben megfigyelhetők. Néhány púcafaj nősténye táskaszerűképződményt — kokont — fejleszt, és ebbe helyezi petéit. A kokont magával hordozza, majd az utódok kikelése előtt abba a csöbe dugja, amelyet előzőleg a nedves iszapba fűrt. Az ízeltlábúak körében az ivadékgondozásnak jól fejlett formáit ismerhetjük fel. Néhány békafajra

is sajátos ivadékgondozás a jellemző. A dél-amerikai pipabéka nőtényének hátbőrbe például belenőnek és ott fejlődnek a peték. A petékből kikelő ebihalak a hátbőrben képződő váladékkal táplálkoznak. A hullók legtöbb faja csupán elterjti tojásait. A madarak és az emlősök körében az ivadékgondozás általánosan elterjedt. Természetesen az anyai szerep és ennek biológiai következményei is részét képezik az általános maternális hatásnak. A továbbiakban azonban csak a maternális hatás közvetlen biológiai részével foglalkozunk.

A maternális effektus

A maternális effektus lényegét akkor érthetjük meg, ha tudjuk, hogy a petesejt sokkal nagyobb, mint a spermium. Az ember esetében több mint kétszázézerszer! A petesejtekbe, a peték citoplazmájába az oogenezis során kerülnek be olyan anyagok, amelyek a magzat fejlődésére hatást gyakorolnak. A spermium lényegében csak az apai eredetű haploid kromoszóma-szerelvényt és a centriolumot, a sejtközpontot hordozza, azt a sejtszervecskét, amely a sejtosztódások lefolyását biztosítja. A két sejt fúziójával alakul ki a zigóta, amely már a fajra jellemző diploid kromoszóma-szerelvényt ($2n$) hordozza. A magzat, az új élőlény kialakulása a zigóta osztódásával veszi kezdetét. (E munkában a *magzat* megnevezést, mint általános fogalmat használjuk, amely magába foglalja a zigótát, az embriót és a foetust.) Természetes, hogy az olyan élőlényekben, amelyekben az utód az anya szervezetében (pl. a méhlepényesek) vagy azzal szoros kapcsolatban (pl. kenguru) fejlődik, az anya szervezete táplálja a magzatot, nem a petében raktározott szikanyag. Ugyanakkor arra is lehetőség nyílik, hogy az anyai szervezet az utód fejlődésének későbbi szakaszait is befolyásolja.

Vajon milyen szerepe lehet a petesejt citoplazmájában raktározott anyagoknak? Milyen természetűek ezek a molekulák? Meddig és hogyan határozzák meg az utód fejlődését? Ezekkel a kérdésekkel kívánunk foglalkozni a továbbiakban.

A pete citoplazmájában raktározott anyagok szerepét viszonylag egyszerű tanulmányozni olyan esetekben, amikor az utód fejlődése az anya szervezeten kívül folyik (pl. a férgek, rovarok, halak, kétéltűek esetében). Ilyenkor az anyai hatás csak a pete citoplazmájában tárolt anyagok jelenlétén múlik. Bonyolultabb a helyzet az olyan esetekben, amikor az anya szervezetével szoros kapcsolatban fejlődik az utód. Úgy tűnik, hogy ilyenkor a petesejt citoplazmájának állománya csak a magzat fejlődésének legkorábbi szakaszaiban játszik szerepet. Nem eldöntött kérdés, hogy a magzat későbbi fejlődését mennyire határozza meg az anya szervezete, mennyire az utód saját genetikai állománya, vagy esetleg a környezeti tényezők. Az azonban biztos, hogy a magzat fejlődése e három tényező összhangján múlik. A petesejt *citoplazmájának* a magzat fejlődésére gyakorolt szerepét morfológiai, mikroszebészeti, genetikai és biokémiai módszerekkel tanulmányozhatjuk.

A morfológiai megközelítés

Az egyik zsákállat faj (*Cynthia partita*) petéjének¹ citoplazmája színes zónákra különül. A megtermékenyítést követő sejtosztódások során a színes citoplazma régiók a magzat-sejtek citoplazmájába épülnek be és meghatározzák

e sejtek további sorsát. A sötétsárga citoplazmát magukba foglaló sejtekből a lárva farki izomzata fejlődik. A világossárgából a másodlagos testüreg mezoderma, a világos szürkéből az idegrendszer kezdeménye, az opál szürkéből az entoderma, a petesejt áttetsző citoplazma régiójából pedig az ektoderma kezdeménye alakul ki. A *Cynthia* petéje tehát mozaikszerű: a petesejt citoplazmájában lokalizált anyagok határozzák meg a magzat főbb szöveteinek kialakulását [6].

Mikrosebészet és transzplantáció

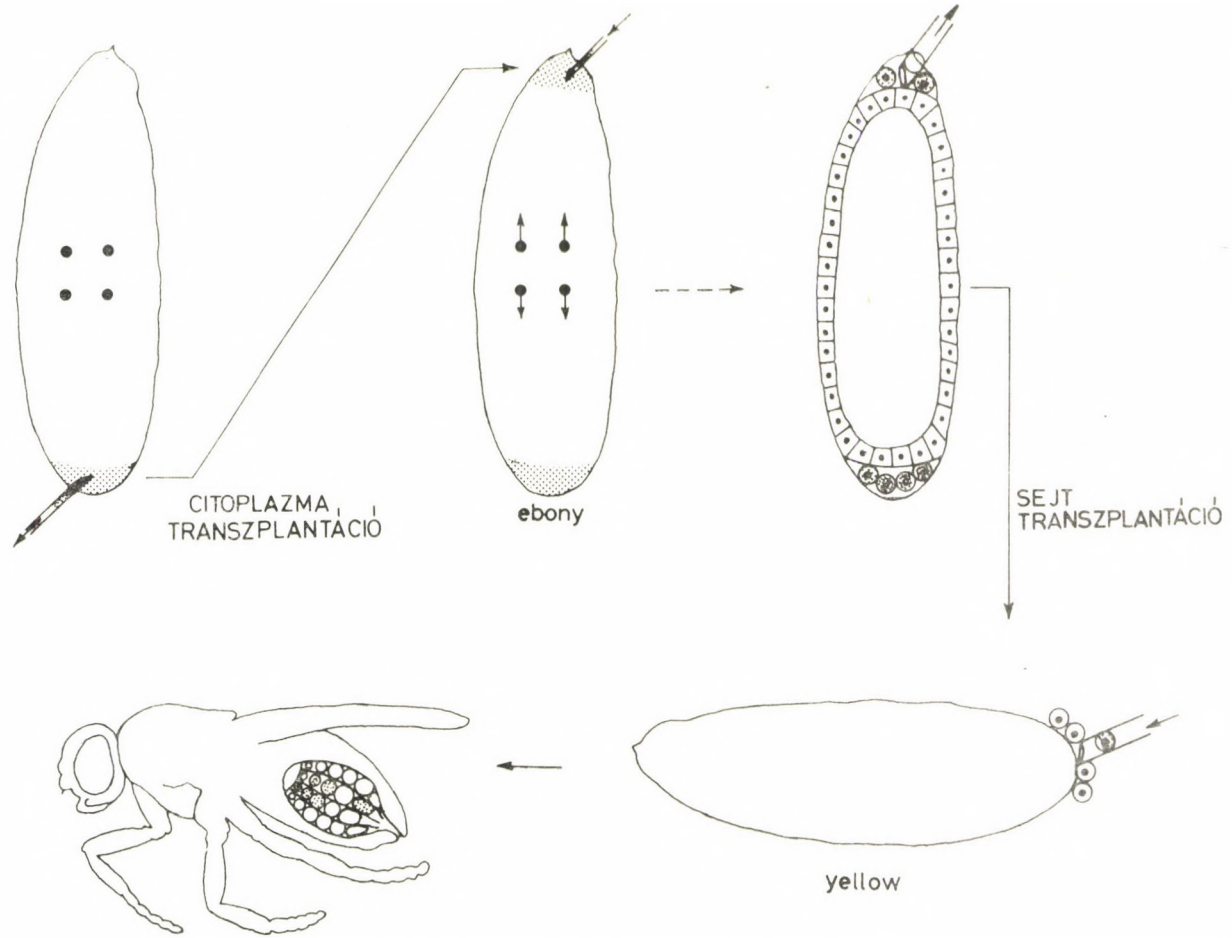
A magzat fejlődésének mozaik típusú meghatározottságára (determinációjára) további szép példát láthatunk egy gyűrűsféreg, a *Tubifex rivolorum* esetében. A peték bizonyos részét ultraibolya sugár keskeny nyalábjával besugározva meghatározott részek és azok anyagai (pl. nukleinsavak, fehérjék) elroncsolhatók. A besugárzott petékből rendellenes magzatok fejlődtek, amelyeknek bizonyos testtája, szövettípusa hiányzott. A különböző helyen besugárzott petékből származó rendellenes magzatok vizsgálatával meg lehetett állapítani, hogy a pete citoplazmájának mely részéhez a magzat testének mely tája rendelhető. Így végül is össze lehetett állítani egy mozaikszerű elrendeződés pontos tervrajzát, az ún. sorstérképet [6].

A csíraplazma anyai meghatározottsága

Nagyon meggyőzően mutatják a következőkben említendő példák, hogy milyen fontos szerepet játszik az anya szervezete az utódok ivarsejtképződésében, ezért a csíraplazma szerepével külön fejezetben foglalkozunk.

A sima karmos béka (*Xenopus laevis*) peték citoplazmájának bizonyos régiójában rögzös szemcsék figyelhetők meg [6]. A citoplazmának ezt a részét nevezik csíraplazmának. A csíraplazma sorsát a magzati fejlődés folyamán mikroszkóppal nyomon lehet követni. A gasztruláció kezdetére (amikor az embriót sok száz sejt alkotja) a csíraplazma 5—15 sejtbe épül be. Ebből a néhány sejtből származik a béka valamennyi ivarsejtje. Ha valamelyik petéből a csíraplazmát kiszívják (üvegapillárisal), akkor ebből a petéből terméketlen, steril béka fejlődik. A karmos béka példája azt mutatja, hogy az anya szervezete a pete képződése, az oogenezis során építi be a citoplazmába azokat a részecskéket (a csíraplazmát), amelyek az utód majdani ivarsejt képződéséhez, végeredményben a faj fennmaradásához szükségesek.

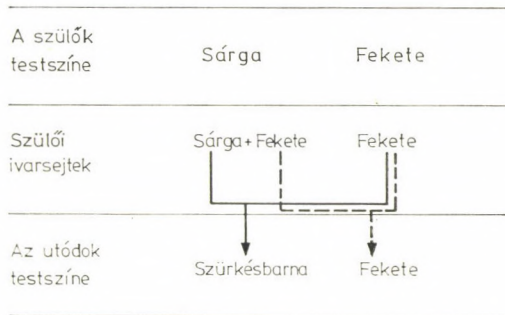
A genetikusok kedvelt kísérleti alanyának, az ecetmuslicának (*Drosophila melanogaster*) a petéjében is — a karmos békához hasonlóan — megfigyelhető a csíraplazma. Mielőtt azonban a csíraplazma szerepét ismertetnők, tekintsük át a muslica-embriogenezis első lépéseit. A 0,42 mm hosszú és 0,15 mm széles petét abban a pillanatban termékenyíti meg a nőstényben raktározott spermiumok közül egy, amikor az a nőstényt elhagyja. Az anyai és az apai eredetű magvak röviddel ezután egyesülnek. Az így létrejött, diploid kromoszóma-szerelvényű mag többször osztódik anélkül, hogy közben sejtek képződnének. Az osztódások folyamán a magvak a pete kérgi része felé haladnak sugárirányban, majd ott is osztódnak. Végül — már a kérgi részben — a magvak körül sejthártya képződik és ezáltal az anyai eredetű citoplazmának a pete kérgébe eső része e sejtekbe kerül. Három óra alatt kb. 5600 sejt képződik: kialakul a blasztoderma (hólyagcsíra). Azok a magvak, amelyek a petének azon a részén haladnak át,



1. ábra. ILLMENSEE kísérletének sémája
 Fig. 1. Schema of ILLMENSEE's experiment

amely a csíraplazmát tartalmazza, különösen viselkednek. Ezek ugyanis nem maradnak meg a pete kérgi részében, hanem lefűződnek és belőlük 10–25 sarki sejt alakul ki. A sarki sejtekből származik a muslica valamennyi ivarsejtje. Így érthető, hogy az olyan petékből, amelyek citoplazmájának csíraplazmát tartalmazó részét ultraibolya sugárzással károsítják, steril utódok képződnek. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a muslica petéjében levő csíraplazma szükséges ahhoz, hogy a petéből kifejlődő muslicának ivarsejtjei képződjenek, tehát termékeny legyen.

A csíraplazma meghstározó szerepét ragyogóan bizonyítják ILLMENSEE [11] kísérletei (1. ábra). A donor petéből vékony üvegcsővel kiszívta a sarki plazmát, és az ún. gazda-pete citoplazmájának olyan helyére transzplantálta, ahol különben nincs csíraplazma. A gazda-pete „ebony”, fekete színű szülőktől származott. A beültetett csíraplazmán áthaladó magvakból ugyanúgy sarki sejtek képződtek mint azokból, amelyek az „ebony” pete saját csíraplazmáján haladtak át. ILLMENSEE azt is bebizonyította, hogy a beültetett csíraplazma hatására képződött sejtek funkcióképes ősvarsejtek. A szokatlan helyen képződött sejteket sárga színű (yellow) szülőktől származó blasztoderma sarki sejtjei közé transzplantálta. Ebből a blasztodermából olyan sárga színű muslica származott, amely a saját ivarsejtjei mellett olyanokat is tartalmazott, amelyek az „ebony” sarki sejtekből képződtek. Ez a következő keresztezésből derült ki. ILLMENSEE a sárga muslicát feketével pároztatta. A sárga × fekete keresztezésből rendszeren csupa szürkésbarna színű utód származik (2. ábra). Most



2. ábra. A csíraplazma ivarsejt-képződést meghatározó szerepe

Fig. 2. Role of the germ plasm determining the development of gametogenesis

azonban az utódok között a szürkésbarnák mellett feketék is megjelentek. Ez csak úgy lehetséges, hogy a sárga színű gazda-muslica „sárga” ivarsejtjei mellett „feketék” is képződtek. A szokatlan helyen képződött „ebony” sejt transzplantációja tehát sikeres volt, és ez a sejt, mint ősvarsejt funkcionált. Összességében ILLMENSEE kísérletének eredményei meggyőzően bizonyítják, hogy az ivarsejtek képződéséért az a csíraplazma felelős, amely az anya szervezetében képződik, és amely a pete képződése során kerül a citoplazmába.

A genetikai „boncolás”

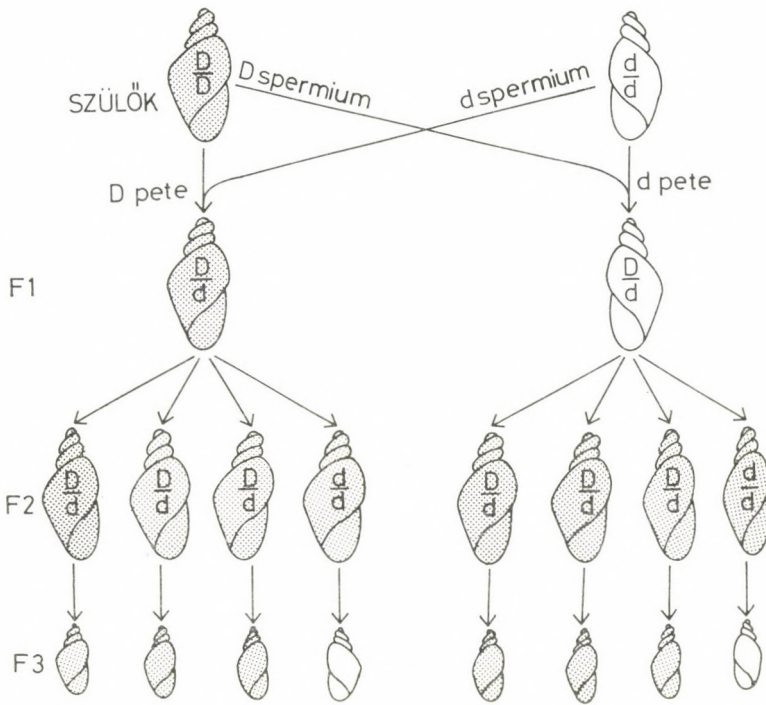
A pete citoplazmájának szintézise érthetően kizárólag az anya szervezetének szabályozása alatt áll. A peteképződést ugyanis csakis az anyai gének határozzák meg és így a pete molekuláinak szintézise, felhalmozódása és elrendező-

dése a citoplazmában kizárólag az anya szervezetétől és döntően annak genotípusától függ. Megeshet, hogy e gének között mutánsok is vannak, tehát hibásan vagy esetleg nem is működnek. Ilyenkor az anya szervezete nem megfelelően „tölti fel” a petesejt citoplazmáját. A hiányosan vagy hibásan feltöltött petékből vagy egyáltalán nem, vagy rendellenes utódok származnak. A fejlődési zavarok e kategóriájának létrejötté tehát független az apa, sőt az utód genotípusától és a mutációk speciális csoportját képviselik. Az ún. *anyai hatású mutációk* csakis a peteképződés rendellenessége révén érvényesítik hatásukat az utódokban. Az anyai hatású mutációkat homozigóta formában hordozó nőtények reprodukcióban résztvevő szerveiben semmilyen rendellenesség nem mutatható ki, viszont utódaik vagy nincsenek, vagy rendellenesek.

Az esetmuslicának nagyon sok anyai hatású mutációját ismerjük. Ezek közé tartozik az ún. *gs* (*grandchildless*, „unokátlan”) mutáció, amely abnormális csíraplazma képződéssel kapcsolatos [7]. A csíraplazma — mint láttuk — az ősvarsejtek képződését határozza meg. A *gs/gs* homozigóta nőtényeknek vannak petéi, és ezek meg is termékenyítődnek, belőlük utódok fejlődnek. Minthogy a peték csíraplazmája abnormális, a *gs/gs* nőtények utódainak nem képződnek ivarsejtjeik, sterilek. Ezért unokátlanok a *gs/gs* nőtények. Az ember esetében ilyen mutációt még nem észleltek.

Az anyai hatású mutációk tanulmányozása további hasznos ismereteket is eredményezhet. Tisztázható pl., hogy az utód fejlődésének milyen lépését határozzák meg az anya szervezetében szintetizálódó és a pete-citoplazmájában lerakódó anyagok. Így pl. *bic* (*bicaudal*, „kétfarkú”) mutációra homozigóta ecetmuslica nőtények petéiből származó magzatoknak a feji végük helyén is farki vég képződik (és emiatt természetesen elpusztulnak). A *bic* mutáció léte azt jelezheti, hogy a magzat „polaritását” is az anyai gének határozzák meg [17]. A *mat(3)1* mutációra homozigóta anyáktól pedig olyan peték származnak, amelyekben csak ősvarsejtek képződnek. Ezek a sejtek funkcióképesek is, amint azt sejtátültetéssel bizonyították [23]. Ugyanakkor a pete kérgi részében levő magvak körül sejthártya nem alakul ki. A *mat(3)1* mutáció megléte alapján feltételezhető, hogy a blasztoderma kialakulása (tehát sejthártya képződése a magvak körül) is anyai hatású gének szabályozása alatt áll [23]. Az ecetmuslicának számos további anyai hatású mutációját is ismerjük, ezek közül néhányra a későbbiekben még visszatérünk.

Egy mocsári csigafaj (*Limnaea peregra*) egyik mutánsának vizsgálata során derült arra fény, hogy a csigaház tekeredési irányát is anyai hatások határozzák meg [8], a csiga belső szervei a későbbiekben pedig a ház tekeredési irányának megfelelően rendeződnek el. Amint azt a 3. *ábra* mutatja, a *d* mutációra homozigóta *d/d*, jobbra tekeredő házú anya utódainak is jobbra tekeredik a háza, még akkor is, ha az apa *D/D*, balra tekeredő házú, pedig az F_1 generáció utódai *d/D* genotípusúak. *D* viszont genetikailag domináns a *d*-vel szemben, tehát minden *d/D* utód házában balra kellene tekerednie. A $d/D \times d/D$ csigák keresztezéséből az F_2 generációban csupa balra tekeredő házú utód származik (3. *ábra*), annak ellenére, hogy az utódok 1/4-e *d/d* genotípusú. A jobbra tekeredő házú csigák csupán a harmadik (F_3) generációban jelennek meg. A csigaház tekeredési irányának öröklődésmenete látszólag tehát nem követi a MENDEL-szabályokat. De csak látszólag nem, mert a jelleg egy generációval később a MENDEL-szabályoknak megfelelően jelenik meg. A *D/D* anya \times *d/d* apa csigák keresztezéséből pedig csupa balra tekeredő házú utód származik az első (F_1) generációban is. Ez pontosan fordítottja az előbb tárgyalt esetnek, amikor az



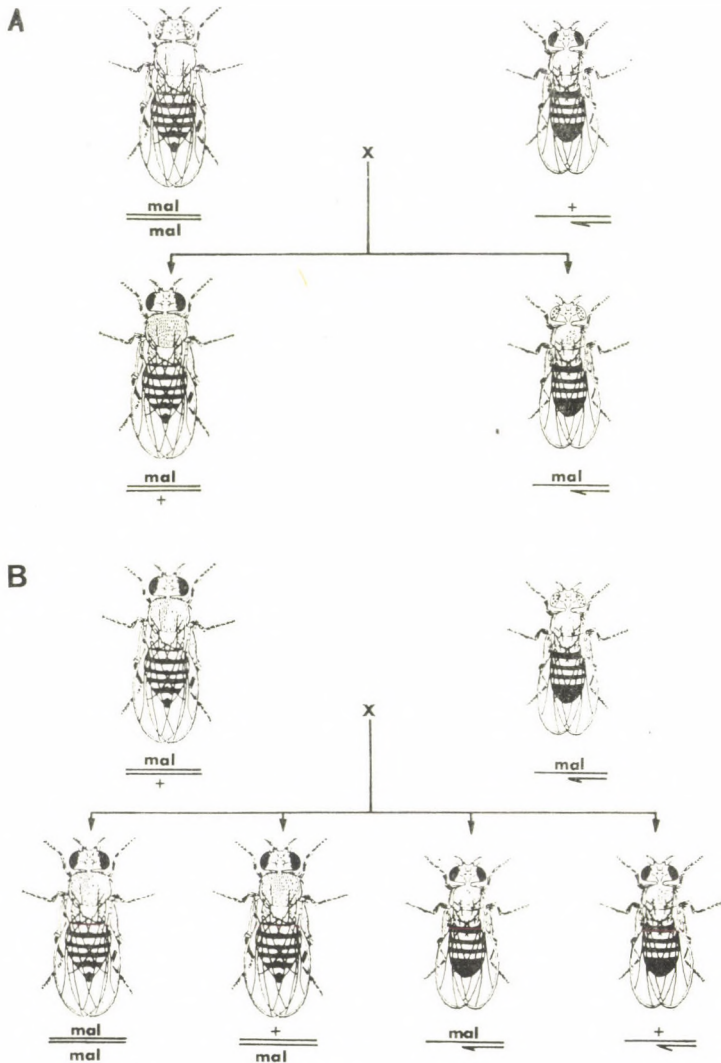
3. ábra. Az anyai hatás szerepe a *Limnaea peregra* csigaház tekeredési irányának létrejöttében
 Fig. 3. Maternal factors in the inheritance of *Limnaea peregra*

anya volt d/d . Az anyai hatást tehát az jelzi, hogy a reciprok keresztezések eredménye a nőténytől függ. Citológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a d/d anyától származó zigóta első sejtosztódásának iránya ellentétes azokéval, amelyek d/D vagy D/D anyáktól származnak. Ez azt jelenti, hogy a pete képződése során valamikor az anyai szervezet olyan anyagot helyez el a pete citoplazmájában, amely meghatározza a zigóta első osztódásának az irányát és ez független a zigóta saját genotípusától. Az anyai hatás miatt tehát csak egy generációval később ismerjük fel a genotípust. Ha a petesejtek közvetlen vizsgálata alapján eldönthetnénk azok genotípusát, akkor még világosabbá válna, hogy az anyai hatású mutációk is a MENDEL-szabályoknak megfelelően öröklődnek.

Az anyai hatásra tehát akkor kell felfigyelnünk, amikor valamely ártalom vagy jelleg létrejöttét nem az utód, hanem az anya genotípusa határozza meg. Lényegében tehát egy-egy anyai hatású mutáció egy-egy olyan eseményre derít fényt, amely az anya szervezetében a peteképződéskor játszódik le, és amely kihat az utód fejlődésére. Sok anyai hatású mutáció tanulmányozásával elvileg az anyai hatás részeire bontható. Ezt a megközelítést szokás „genetikai boncolásnak” nevezni.

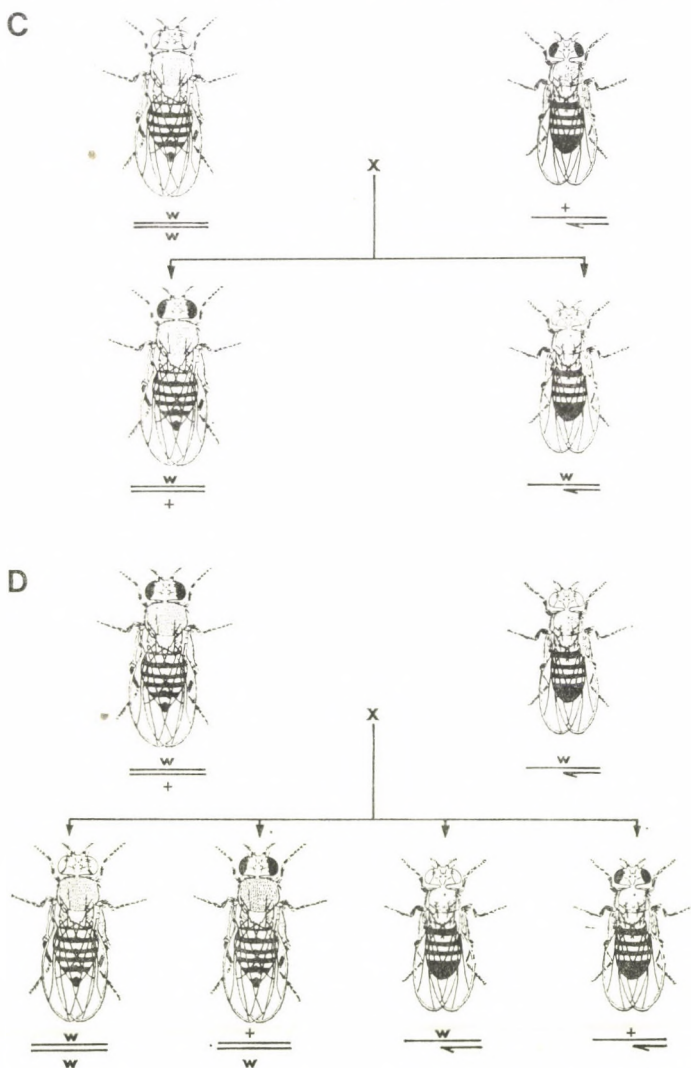
Biokémiai megközelítés

A maternális effektus megismerése után természetesen felmerül a kérdés: mit tudunk azoknak a citoplazmatikus tényezőknek a mibenlétéről, amelyek a magzati fejlődést befolyásolják? Az *ecetmuslica* egyes anyai hatású mutációi arra vezethetők vissza, hogy a petébe bizonyos molekulák nem kerülnek be. Emiatt az utódok fejlődésük egy adott pontján vagy elpusztulnak, vagy rendellenes irányba kényszerülnek [6]. Az ún. *rudimentary* mutációra homozigóta *r/r* nőténytől származó magzatok elpusztulnak. Ha viszont a petébe vad típusú (*r⁺*) pete citoplazmáját vagy pirimidin molekulákat injektálnak, a magzatok nem pusztulnak el, hanem életképes muslicákká fejlődnek. Ebből következően



az r/r nőstények nem képesek petéikbe pirimidin molekulákat helyezni és ez okozza a magzatok pusztulását. Érdekes, hogy ha az r/r nőstények vad típusú (r^+) hímekkel párzanak, a magzatok egy része — nemüktől függően — nem pusztul el. A megtermékenyítés után a heterozigóta r/r^+ nőstény-magzatok ugyanis képesek a pirimidin molekulák szintézisére. (Ezt az apai eredetű X kromoszóma r^+ génje teszi lehetővé.) A nőstényekkel ellentétben a hím magzatok elpusztulnak. Ez érthető, mivel ők az apa Y kromoszómáját öröklik és azon r^+ gén nincs. Ezért nem származik hím utód az $r/r \times r^+/Y$ keresztezésből.

A *mal* (*maroonlike*) anyai hatású mutáció esetében a helyzet nem ennyire tragikus [15]. A *mal/mal* homozigóta nőstényektől származó petékből hiányzik



4. ábra. Az ún. maroonlike (*mal*) anyai hatású mutáció megnyilvánulása

Fig. 4. Phenotypic manifestation of the so-called maroonlike (*mal*) maternal mutation

egy ez idáig ismeretlen faktor, amely három enzim (aldehid-oxidáz, xantindehidrogenáz, piridoxál-oxidáz) működéséhez szükséges. A *mal/mal* nőstényekből származó utódok szemének színe az enzimdefektus következtében barnás-bíbor színű, ha az apa *mal/Y*. Ha az apa vad típusú *mal⁺/Y*, akkor a *mal/mal⁺* nőstény utódok szeme téglapiros színű, vad típusú lesz. Az apai eredetű *mal⁺* gén jelenléte ugyanis lehetővé teszi a három enzim működéséhez szükséges faktor képződését és így a normális szemszín kialakulását (4A. ábra). Minthogy a hím utódokba *Y* kromoszóma kerül, bennük a *mal⁺* gén által termelt faktor nem képződhet, és így a szemük barnás-bíbor színű lesz (4A. ábra). A *mal/mal⁺* nőstényektől származó valamennyi utód szeme téglapiros, még akkor is, ha az apa *mal/Y* (4B. ábra). Ez azért lehetséges, mert a *mal/mal⁺* nőstény petéjébe *mal⁺* faktor kerülhet, ami a normális szemszín kialakulásához szükséges. A *mal* mutáció anyai hatását, anyai típusú öröklődését a *mal/mal⁺ × mal/Y* reciprok keresztezésből származó utódok szemszíne jelzi. A 4C. és 4D. ábrán összehasonlításként a *w* (*white*), fehér szemszín okozó, nem anyai hatású mutáció öröklődését is bemutatjuk. A *w* mutáció öröklődésekor a MENDEL-szabályok tisztán érvényesülnek, mivel a fehér szemszín kifejeződése csak az utód genotípusától függ.

Az előzőekben anyai hatású mutációkkal foglalkoztunk (*gs*, *mal*, *d* stb.), amelyek tehát valamelyik anyai kromoszómához kötött gén hibás működésére vezethetők vissza. A *gs*, *mal*, *d* stb. mutációk manifesztálódásában azonban a hímeknek is szerepe van. Az anyai hatást mutató homozigóta nőstények (pl. *gs/gs*) ugyanis csakis a heterozigóta: ún. mutáns gén-hordozó (*gs/gs⁺*) nőstények és mutáns gént hordozó (*gs/gs⁺*) hímek párzásából jöhetnek létre.

A továbbiakban az anyai hatás olyan példáit fogjuk áttekinteni, amelyeket nem a kromoszómákhoz kötött gének határoznak meg. Ezeknek a jellegeknek az átörökítésben a hímek kromoszómáinak semmilyen közvetlen szerepe nincs. Közvetve is csak annyi, hogy lehetővé teszik az új generáció létrejöttét és ezáltal az anyai eredetű citoplazmához kötött jellegek fennmaradását, illetve megnyilvánulását.

Az extrakromoszomális tényezők szerepe

A korábbiakban említett példákban az anyai hatás mediátorai viszonylag kis molekulák (pl. a pirimidinek, amint azt az *ecetmuslica rudimentary* mutánsa jelzi) és enzimek kofaktorai (a *maroonlike* mutációk esetében) voltak. Az anyai hatásért azonban felelőssé tehető olyan óriásmolekulák is, mint a mitokondrium és a kloroplasztisz DNS-e, sőt vírusok és baktériumok is.

A citoplazmában levő mitokondriumoknak és kloroplasztiszoknak saját DNS-ük és fehérjeszintetizáló rendszerük van. Sokan úgy gondolják, hogy ezek a sejtszervecskék olyan egyszerű baktériumok maradványai lehetnek, amelyek valaha endoszimbózisban éltek a már valódi sejtmaggal rendelkező élőlényekkel. Az évmilliók folyamán a gazdasejtekkel azonban erős függésbe kerültek, és ezért önálló életre többé már nem képesek.

A mitokondriumban levő kromoszómácskák annyi DNS-t tartalmaznak, amennyi csak néhány gén kódolására elegendő. A zöld szintestek, a kloroplasztiszok kromoszómája nagyobb. Az utódok mitokondriumi és kloroplasztiszi döntően anyai eredetűek, mivel a pete citoplazmája örökíti át őket generációról generációra. A spermium középdarabjának mitokondrium hüvelye is bekerül a magzatba. Mégis a mitokondrium- és a kloroplasztisz-kromoszómákhoz kötött jellegek öröklődése elsősorban anyai hatást mutat.

A mitokondrium DNS-ében indukált mutációk következtében a mitokondriumok funkciója, a sejtlégzés károsodik. A mitokondrium DNS-ében mutációt hordozó egyedek ezért lassan növekednek. Az ilyen típusú mutációk közül a *Neurospora crassa* tömlős gombafaj ún. „poky”, és az élesztő ún. „petite” mutációi a legismertebbek [8].

Az anyai hatásra a mezőgazdasági gyakorlatból is említhetünk példákat. A kukorica ún. citoplazmatikus hímsterilitása ugyanis a mitokondriumok hibájára vezethető vissza. Ilyenkor az érintett növényeknek nem képződik virágpóra, ezért hím virágjaik sterilek. A citoplazmatikus sterilitás a nővirágok funkcióját nem befolyásolja. A hím-steril kukoricák használatával a munkaigényes címerezés feleslegessé válik. A kukorica címerezésére (a hím virágok eltávolítására) a hibridek előállításakor van szükség. Ilyenkor egy *A* fajta virágpórának kell megtermékenyíteni a *B* fajta nővirágait. A *B* nővirágokat *B* virágpor nem termékenyítheti meg, ezért azokat el kell távolítani (címerezés), vagy hím-steril *B* fajtát kell használni. A *B* fajtát kukorica csöveiből fejlődő hibrid növények is sterilek, hiszen a *B* citoplazmát és ennek mitokondriumait örökölték. Ebből egy további előny is adódik. A hibridek így a virágpor képzéséhez szükséges jelentős mennyiségű energiát is a szemek képzésére fordíthatják. (A kukorica hím-sterilitásának más, nem citoplazmatikus öröklődésű lehetőségei is vannak.)

Nagyon látványos a kloroplasztisz kromoszómákhoz kötött jellegek öröklődése. Egy példát ezért részletesebben is ismertetünk [8]. A mindenki által ismert dísznövény, a csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*) hajtásainak némelyikén a levelek zöldek, másokon foltosak; a zöld levelek mellett olyanok is képződnek, amelyek színe a szürkészöldtől a fehérig terjed (ún. variegált mintázat). Néhány hajtáson a levelek halványszürkék. Ez utóbbi levelek kloroplasztiszi és pigmentjei is abnormálisak. Bennük nem is folyik fotoszintézis. Ezeket a hajtásokat a növény zöldlevelű részei táplálják. A pigmentátltság öröklődését nyomon követve kiderül, hogy az utód növénykének leveleinek színe annak a hajtásnak a színét követi, amelyen az anya-virág képződött (*I. táblázat*). A szürke hajtáson fejlődő női virágból származó növényke minden levele szürke. Akkor is, ha a virágot olyan virágpor termékenyítette meg, amely zöld ágon fejlődő virágból származott. A szürke hajtáson a kloroplasztisz struktúra és pigmentáció nem

I. táblázat

A csodatölcsér variegált mintázatának öröklődése

Table 1. Inheritance of the variegated pattern of *Mirabilis Jalapa*

	A levelek színe a HÍM és a NŐI virágot hordó ágakon	Az utódnövénykének leveleinek színe
zöld	zöld szürke variegált	zöld szürke zöld, szürke, variegált
szürke	zöld szürke variegált	zöld szürke zöld, szürke, variegált
variegált	zöld szürke variegált	zöld szürke zöld, szürke, variegált

alakulhat ki. Minthogy a magzatokba az anyai, mutáns DNS-ű kloroplasztiszok kerülnek, és mert a virágor sem kloroplasztiszt, sem kloroplasztisz-DNS-t nem tartalmaz, várható, hogy az utód növényke minden kloroplasztisza mutáns típusú lesz és ezért szürke levelei képződnek. Ezek a növénykéek nagyon fiatalon elpusztulnak. Ha a női virág variegált levelű ágon képződik, az utódnövényke leveleinek színe annak megfelelően alakul, hogy a magzat-zsákba milyen kloroplasztiszok kerülnek. Ennek megfelelően az utódok leveleinek színe háromféle lehet (lásd I. táblázat). A variegált levelűséggel mindennapi életünkben is találkozunk. Kedvelt dísnövényeink, mint pl. az ampolnavirág (*Zebrina pendula*), a *Sansevieria* stb. között sok a tarka levelű.

Az anya olykor vírusokkal fertőződik [6]. A vírusok a pete citoplazmájába is bekerülhetnek. Ennek különböző következményei lehetnek. Ha pl. a muslicák *sigma* DNS vírussal fertőződnek és széndioxiddal altatják őket, akkor megbénulnak és végül elpusztulnak. A nem fertőzött muslicák a széndioxidos altatás után 1–2 percen belül felélednek. Amikor CO₂-érzékeny nőtényeket CO₂-rezisztens hímekekkel kereszteznek, minden utód CO₂-érzékeny lesz. A fordított (reciprok) keresztezésből származó utódok viszont CO₂-rezisztensek. Azt is bebizonyították, hogy a CO₂-érzékenység a kromozómáktól függetlenül öröklődik és a pete citoplazmájába kerülő vírusok okozzák. A CO₂-érzékenység öröklődése ezért mutat anyai hatást.

Sok muslica faj nőtényeiben *Spirochaeta* baktériumok élnek endoszimbiózisban. Néha a baktériumok a pete citoplazmájába is bekerülnek. A fertőzött peték közül csak azokból származik utód, amelyeket X kromozómát hordozó spermium termékenyít meg. Az Y kromozómát hordozó hím embriók elpusztulnak. A *Spirochaeta* baktériummal fertőzött nőtényeknek ezért csak nőtény utódaik lehetnek. Legújabban kimutatták, hogy a hím magzatok pusztulásáért nem a baktérium, hanem azok a DNS fágok tehetők felelőssé, amelyekkel a baktérium fertőzött. Egyik esetben sem ismeretes viszont, hogy a vírusok miként okozzák az utódok halálát.

A pete riboszómáinak eredete

Az anya szervezete a petéket riboszómákkal is ellátja. Az anyai eredetű riboszómákon folyik a fehérjeszintézis a magzat fejlődésének kezdetén is. Az anyai eredetű riboszómák jelenlétét és szerepét ragyogóan bizonyítja a karmos béka *0-nu* (zero nucleolus) mutánsa [8]. Az *0-nu* mutációra homozigóta (*0-nu/0-nu*) utódok sejtmagjaiban nincs sejtmagvacska. Ezekben az egyedekben nem képződnek riboszómák, és így nem is játszódhat le sejtjeikben a fehérje molekulák szintézise. Mégis, a *0-nu/0-nu*⁺ × *0-nu/0-nu*⁺ hordozó szülők keresztezéséből származó *0-nu/0-nu* utódok élnek néhány napot, és mint fiatal ebihalak pusztulnak el. Sejtjeikből ugyanis hamarosan elfogynak az anyai eredetű riboszómák. Rövidke életüket azok a riboszómák teszik lehetővé, amelyek az *0-nu/0-nu*⁺ anya szervezetében képződtek és rakódtak le a pete citoplazmájában az oogenezis folyamán. Egy másik kísérlet eredményei is alátámasztják az anyai eredetű riboszómák jelenlétét a petesejtek citoplazmájában. Amikor a karmos béka meg nem termékenyített petesejtjébe a házinyúl-nak azokat a hírvivő-RNS molekuláit injektálták, amelyek a hemoglobin szintézisét kódolják, a petesejt nyúlhemoglobin molekulákat kezdett szintetizálni, és azt több mint két héten át folytatta.

A petesejt citoplazma komponensei közül egyelőre még csak néhánynak ismerjük a szerepét. Nem tudjuk pl., hogy milyen természetű az az anyag, amely a csigaház tekeredési irányát megszabja. Mégis, ismereteink jelenlegi szintjén is bizonyosnak látszik, hogy az anyai szervezet a petesejt citoplazmája révén meghatározza a magzati fejlődés kezdeti szakaszát.

A sejtmag-transzplantációs kísérletek igazolták, hogy a petesejt citoplazmájában *génműködést szabályzó anyagok* is vannak. Az érésben levő petesejtbe más szövetek (hám, ideg stb.) sejtjeiből átültetett magvak sohasem osztódnak és DNS-t sem szintetizálnak. Csupán az RNS szintézis igazolható. Az érett, de meg nem termékenyített petébe transzplantált sejtmagvakban ezzel szemben csak DNS-szintézis folyik. Ezek a sejtek osztódnak is indulnak: előbb embriók, majd kifejlett, ép béka-ivadékok származnak belőlük. A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a pete citoplazmájában az érés utolsó fázisában olyan anyagok jelennek meg, amelyek az RNS szintézisét leállítják, viszont DNS szintézist és a sejtosztódásokat idéznek elő. A sejtosztódások akkor is elkezdődnek, ha az érett pete magját eltávolítják (enukleált pete). Így néhány száz — sejtmag nélküli — „sejtből” álló képződmény alakul ki. Ez alatt az anyagcsere folyamatokat, a fehérjék szintézisét a pete citoplazmájában raktározott anyagok irányítják. Úgy tűnik, mintha a magzat fejlődésének kezdeti szakasza kizárólag csak az anyai hatáson múlték.

Ha az enukleált érett petébe kifejlett béka idegsejtjének sejtmagját ültetik, akkor a későbbiekben érdekes változások figyelhetők meg. A transzplantáció után a sejtmag kb. ötvenszeresére duzzad, miközben a citoplazmából fehérjemolekulák áramlanak belé. A sejtmag az idegsejtre jellemző tevékenységét beszünteti, és a magzati sejteknek megfelelő fehérjeszintézist kezd folytatni. Végeredményben ebből a petéből normális béka fejlődik ki. A fent leírt megfigyelések azt jelzik, hogy a petesejt citoplazmájában olyan faktorok is vannak, amelyek a sejtmag és ezen belül a gének aktivitását is meghatározzák. Sajnos az anyai „üzenetek” aktiválódásához szükséges tényezőt nem ismerjük. Csupán feltételezésekre szorítkozhatunk. Az anyai információkat tartalmazó hírvívő-RNS molekulákat fehérjék védik. A megtermékenyüléskor, partenogenetikus aktiválódáskor (szűznemzéskor) és a kísérleti beavatkozásokkor ezek a védő fehérje molekulák elemészródnek. Ezért állhat az anyai információ a magzatok rendelkezésére, és így válik lehetővé az anyai üzenet alapján történő fehérjeszintézis.

Fontos kérdés, hogy meddig hatnak az anyai információk a magzati fejlődés során. Az anyai eredetű riboszómák általában a gasztrulációig látják el feladatukat [6]. Ez a helyzet a tüskésbőrű embriókban is. A gasztruláció folyamán jelennek meg sejtjeikben a saját riboszómák. Az anyai eredetű riboszómák azonban — csökkenő részesedéssel — ezt követően is részt vesznek a fehérjeszintézisben. A sejtosztódások során az anyai eredetű riboszómák egyre inkább „kihígnak”, így egymagukban már nem képesek hatékony fehérjeszintézis biztosítására. Ezt láttuk az *0-nu/0-nu* homozigóta mutáns karmos béka embriókban. Az aktinomycin-D az RNS szintézist gátolja. Aktinomycin-D jelenlétében a magzatok fehérjeszintézise addig a pontig folyik, ameddig a saját maguk által szintetizált RNS-re nincs szükség. Úgy tűnik, hogy a törzsfajlás előrehaladtával a citoplazmatikus anyai eredetű RNS szerepe csökken. Az egérmagzatok már akkor elkezdik a saját RNS szintézisüket, amikor csupán négy sejtből állnak. Ezek a kísérleti eredmények persze nem jelentik azt, hogy az anyai információk nem juthatnak szerephez az egér és más magasabbrendű

magzatok fejlődésének későbbi szakaszaiban. Az anyai hatás érvényesüléséről az emlősökben viszonylag keveset tudunk. A méhlepényesek anya—utód kapcsolata sokkal bonyolultabb, mint az alacsonyabbrendű állatcsoportokban. Mint a bevezetőben említettük, az anya szervezete befolyásolhatja az utód fejlődését a petesejt citoplazmáján, de a méhlepényen át is, sőt a szoptatás periódusában is. Hogy a magzat fejlődésének kései szakaszai mennyire függenek az anyai, esetleg a környezet hatásától, ma még alig ismerjük. De hogy az emlősöknél is kell számolni anyai hatással, azt egy közkeletű példa igazolhatja. A szamár és a ló keresztezéséből öszvér származik. Az öszvér mindig jobban hasonlít az anyára, mint az apára. A hasonlóság annyira szembetűnő, hogy pl. az angol nyelvben külön névvel illetik a kétféle keresztezésből származó öszvéreket. A ló kanca \times szamár csődör fedezésből származó öszvér, a „mule” inkább lóra, a szamár kanca \times ló csődör (sokkal ritkábban alkalmazott) fedezésből származó „hinny” öszvér inkább szamárra hasonlít.

Szólnunk kell röviden az *apai* hatásról is. A spermium szinte csak az apai eredetű kromoszómákat és a sejtosztódások zavartalan lefolyását biztosító centriolumot tartalmazza. A petében nincsen centriolum. Ezért a sejtközpontról viselkedését befolyásoló minden jelleg apai típusú öröklődést mutat. Az apai eredetű kromoszómák szerveződésének rendellenessége is hatással lehet a magzatok fejlődésére. Ez utóbbi esetre említhetjük meg példaként az *ecetmuslica pal* (*paternal loss*) mutációját. A *pal/pal* homozigóta hím kromoszómái hibás szervezettségük miatt labilisak. Ezért megesik, hogy a magzatban (bárki is volt az anya) az első magosztódás folyamán az apai eredetű kromoszómák egyik-másika „elvész”: az utódsejtek némelyikébe a normálisnál kevesebb kromoszóma kerül. Ha ez az esemény olyan kromoszómát érint, amely létfontosságú funkciókért felelős, az egyik utód-sejt elpusztul. Más kromoszómák esetében a *pal* mutáció hatására genetikai mozaikok képződnek.

A maternális hatások értékelése az embernél

A maternális hatással az embernél is számolni kell, bár jelentősége elmarad a többi fajétól. S ez érthető is. A rovarok, a madarak, a hüllők lerakják a tojásukat és a többit elvégzi a napsugár vagy a rothadó avar. Az emlősöknél a maternális hatás egyik biztosítéka lehetett az evolúciónak, és így jelentősége nagynak ítéltető. A társadalmivá váló embernél viszont egyre inkább a tudatos cselekvés válik uralkodóvá a gyermeknemzésben is. Ez a családtervezés gondolatában és fogalmában fejeződik ki. Mégis, természetesen a biológiai hatások az embernél sem hagyhatók figyelmen kívül és így a sokrétű maternális effektussal is számolni kell.

Az embernél a maternális hatások értékelésekor genetikai, teratológiai és születés utáni kategóriákat különítünk el.

A maternális hatások a humán-genetikában

Itt legalább 5 különböző hatást érdemes elkülöníteni.

Az X-kromoszómahoz kötött öröklődés

Ez esetben nem szokás maternális hatásról beszélni, pedig csaknem mindig az anyai mutáns génhordozás hatása érvényesül a fiúk 50%-ában jelentkező nemhez kötött monolokuszos ártalmakban.

A beágyazódást megelőzően érvényesülő maternális hatás

Mint az előző, általános részből is kiderül, a fogamzáskor, tehát az ondósejt petébe történő behatolásakor feloldódik a petesejt citoplazmájában a különben gátolt fehérjeszintézis. Nemcsak oldódik a gátlás, hanem azonnal nagy intenzitással meg is indul a fehérje-termelés. Ennek mértéke az első osztódás időszakában tízszerese, esetleg hetvenszerese lehet a fogamzást megelőző állapotnak. Ekkor azonban csak az *anyai* eredetű ún. álcázott (masked) messenger RNS hatása érvényesül [4]. Tehát a barázdálódás során csakis maternális hatások érvényesülnek a fehérjeszintézisben. Kérdés azonban, hogy meddig. Mint említettük, minél magasabbrendű fajokat vizsgáltak meg, annál rövidebb ideig tartott ez a maternális effektus. Emberben ennek léte egyértelműen nem is igazolt, bár fennállását valószínűnek tartják. Jelentőségét még alig ismerjük, pedig minden bizonnyal sokat segítenének a magzati fejlődés megértésében. Elég két kérdésre utalni. Egyfelől a természetes kiválogatódás legintenzívebb szakasza éppen a fogamzást közvetlenül követő napokban-hetekben történik. Ma megegyeznek abban a szakemberek, hogy a fogamzásoknak csak 31%-a születik meg élve, 69% tehát prenatalisan kiválogatódik. A halvaszületések aránya nem éri el az 1%-ot. (Hazánkban 0,8% körül van.) A spontán vetélések aránya pontosan nem ismert, de 12–15%-nál nem több. Így a terhességek több, mint 50%-ában a magzatoknak a klinikailag érzékelhető magzati halálozási időszak *előtt* kell elpusztulnia. (Ezek a fel nem ismert, ún. inapparens terhességek, amelyeket legfeljebb megkészt vérzésként érzékelnek.) Ezek okai nyilvánvalóan a magzati genomban érvényesülő letális ártalmak lehetnek. Nagy kérdés azonban, hogy a *Xenopus* és más fajokban észleltekhöz hasonlóan a korai maternális eredetű fehérjeszintézis zavarának nincs-e ebben szerepe? A másik érdekes probléma az egypetéjű többesterhesség. Magyarországon minden 100. terhesség végződik többesszületéssel. Ezek több mint 99%-a kettős, tehát iker. Az utóbbiak egyharmada egy-, kétharmada kétpetéjű. A kétpetéjűek kialakulásának mechanizmusa ismert: az anya agyalapi mirigyében elválasztódó gonadotropinok következtében több tüsző érlik, majd reped meg és így két pete válik a mindig feleslegben levő spermiumok számára hozzáférhetővé. Az egypetéjűek esetében egy petét egy spermium termékenyít meg, de a magzat-kezdemény kettéhasad. Ez a fogamzás és a beágyazódás, tehát a magzati fejlődés 1–14. napja között történik. Kialakulásának okáról nem sokat tudunk. Itt sem zárható ki a maternális hatás lehetősége már csak az időbeni egybeesés miatt sem.

A citoplazmás öröklődés

Eddig emberben egyértelmű bizonyítást még nem nyert. Csupán a balkezesség esetében tételezik fel ennek hatását. A balkezes anyák gyermekei ugyanis sokkal inkább lesznek balkezesek, mint a balkezes apák gyermekei. Ez persze lehetne a születést követően szerzett: leutánczott vagy nevelési hatás

is. Azonban a balkezes anyjuktól külön nevelt gyermekekben állítólag gyakoribb a balkezesség jelentkezése, mint a balkezes apák hasonló körülmények között felnövekvő gyermekeiben [4].

A poligénes öröklődés maternális befolyásolása

Az emberi jellegek és a gyakori rendellenességek-betegségek döntő többsége poligén meghatározottságú. A poligénes öröklődés azonban inkább csak hajlamot jelent, amelyet azután bizonyos környezeti — szupresszálo vagy provokáló — hatások számottevően befolyásolnak. A végső hatás eredőjét, amely tehát a poligén hajlam és a környezeti hatások együttes következménye, szokás multifaktoriális kóreredetnek nevezni. A maternális provokáló hatások fontossága például a csípőficam [4] és a rejtettheréjűség [5] esetén jól ismert. Egyfelől a terhes nő nemi hormonjainak a hatása a magzat csípőízületét ellazítja és ezáltal megteremti a ficam lehetőségét. A fiúk heréjében termelődő relaxin ezt a hatást azonban közömbösíti és ez magyarázhatja a csípőficam jól ismert női többletét. Másfelől az anya medencéje és testalkata is hatást gyakorol a magzat fekvésére és a szülésre. A medencevégű fekvés pedig provokálhatja a magzat sekélyebb izületi vápáján keresztül érvényesülő poligén hajlamot. A rejtettheréjűség poligén hajlamának provokálásában az anya csökkent nemi hormon elválasztásának lehet meghatározó szerepe. A későn (15 éven túl először) menstruáló és túl rövid havi vérzésű nők fiú gyermekeiben a rejtettheréjűség ugyanis szignifikánsan gyakoribb. Az ok az anya agyalapi mirigyének elülső lebenyében termelődő gonadotropinok alacsonyabb szintje lehet.

A placentáris hatás révén érvényesülő maternális effektus

Az anya antropometriai adatai, tehát a testmagasság és a testsúly befolyással vannak az újszülött súlyára [1, 2, 10]. Minden eddigi vizsgálat tanúsága szerint az alacsony és kis-súlyú anyák újszülöttjeinek a születési súlya kisebb, míg a magas és nagy-súlyú anyák esetében az átlagot számottevően meghaladó súlyú újszülöttel kell számolni (*II. táblázat*). S mivel az átlagos születési súly

II. táblázat

Az átlagos születési súly [10] és 2500 g alattiak [1] %-os gyakoriságának alakulása az anyai testmagasság és testsúly függvényében

Table 2. Mean birth-weight and birth-weight groups under 2500 g of newborn in mothers of different weights and heights

Magasság, cm testsúly, kg	Alacsony (—155)	Átlagos (155—162,5)	Magas (162,5—)	Együtt \bar{x}	Baird 2500 g
Könnyű (—50)	2,99	3,11	3,22	3,11	9,6%
Átlagos (51—70)	3,11	3,23	3,40	3,25	7,6%
Súlyos (71—90)	3,20	3,35	3,48	3,35	4,1%
Együtt \bar{x}	3,10	3,23	3,37	3,24	7,1%
Baird < 2500 g	12,1%	7,7%	4,9%	8,2%	—

és a 2500 g alatti újszülöttek (tehát a kis súlyú újszülöttek, régi nevükön ún. koraszülöttek) között egyértelmű korreláció van, a filigrán és testes anyák kis súlyú újszülött gyakorisága jelentősen eltér. A különböző fő-rasszok, tehát az európai, a keleti és az afrikai fő-rassz tagjaiban észlelt eltérő újszülött súlyátlagok (III. táblázat) háttérben is — legalább részben — az egyes rasszokhoz tartozó anyák különböző testi adottságai állhatnak [2]. Éppen ezért pl. a kínai és az indiai újszülöttekben nem is tartották valósnak a 2500 g-os születési súly határt a kis súlyú újszülöttek („koraszülöttek”) elkülönítésére. Az európai rasszon belül (pl. az Egyesült Királyságban, USA-ban vagy Magyarországon) azonban legalább akkorák az eltérések, mint a különböző fő-rasszok között. Az újabb indiai és kínai adatok pedig már közel sem olyan kicsiny átlagos születési súlyról számolnak be, mint néhány évvel korábban. (Sőt, a magyar cigány újszülöttek már elmaradnak az indiai újszülöttek súly átlagától.) Éppen ezért a fő-rasszok közötti különbséget nemcsak genetikai tényezőkkel, hanem a szociális helyzetben és a táplálkozási viszonyokban, tehát a külső körülményekben meglevő különbségekkel is magyarázzuk.

III. táblázat

Az átlagos születési súly néhány népességben [2]

Table 3. Mean birth-weight in some populations

Populáció	\bar{x} (g)
UK	3415
USA	3280
USA	3226
USA	3370
Magyar	3125
Kínai	3086
Indiai	3909
Indiai	3020
Magyar cigány	2961
Magyar nem cigány	3213
Magyar cigány	2861

Az antropológiai adatok értelmezésekor érdemes felhívni a figyelmet az azonos anya újszülöttjei között észlelhető kifejezett születési súly hasonlóságra. A hasonlóság pedig mindig felveti az öröklődés szerepét is. Az emberi kvantitív jellegek családi hasonlóságát, így az elsőfokú rokonok, tehát szülő és utód, illetve a testvérek között korrelációs koefficienssel fejezzük ki (IV. táblázat). A születési súly esetében a testvéreken talált korreláció 0,5 körül van. Ez egyben az öröklődésre is utal, mivel a testvérek családi génállományának azonos-sága is 50%-os. A kapott korreláció részekre bontható és ezek az értékek a születési súly átlag (\bar{x}) körüli varianciájában
$$\left(V = \frac{(\bar{x} - x)^2}{n - 1} \right)$$
 szerepet játszó kör-eredeti tényezőket jelzik. Ezek mélyebb elemzése lehetőséget nyújt a születési súly háttérben álló tényezők részesedésének becslésére is. A legnevezetesebb ilyen vizsgálat PENROSE és mtsai [14, 22] nevéhez fűződik (V. táblázat). A genetikai tényezők lényegében a magzat genotípusán át érvényesülnek és elsősorban

IV. táblázat

Az elsőfokú rokonok hasonlósága néhány kvantitatív jellegben [3]

Table 4. Resemblance of some quantitative characters in first-degree relatives

Jelleg	Szülő—utód korreláció*	Testvér korreláció**
Testmagasság	0,51	0,53
Össz. bőrlécszám	0,48	0,50
Szisztolés vérnyomás	0,24	0,33
Élettartam	0,45	0,54
Intelligencia	0,49	0,49
Születési súly	—	0,50; 0,53;* 0,55*

Korreláció számítási módja:

$$* r_{p/o} = \frac{1/2 V_A}{V_A + V_D + V_E} \quad ** r_{s/s} = \frac{1/2 V_A + 1/4 V_D}{V_A + V_D + V_E}$$

V. táblázat

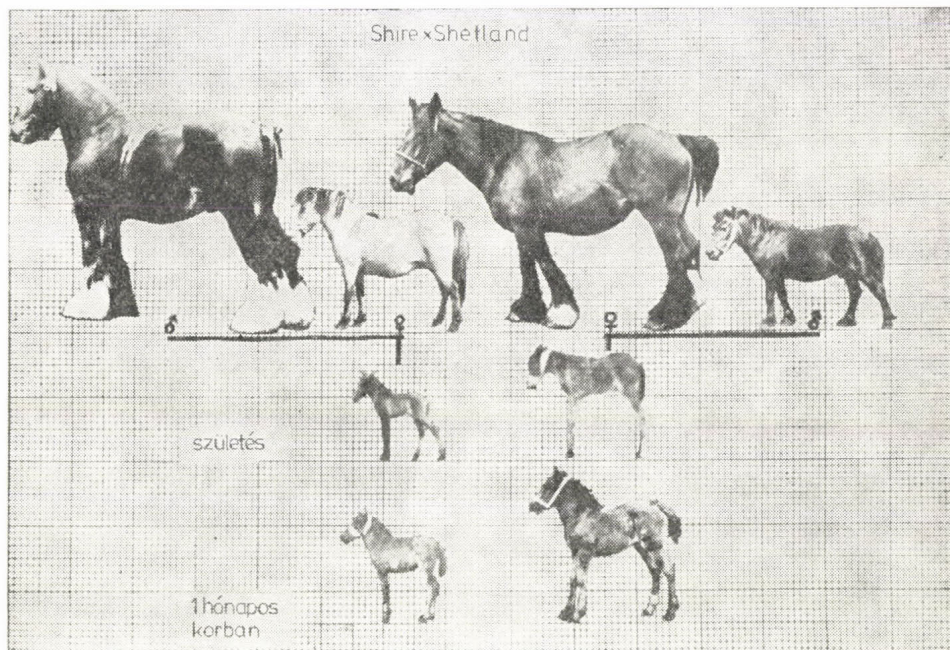
A születési súly varianciájának magyarázata [22]

Table 5. Variance of birth weight founded on PENROSES [22] calculation

A variáció eredete	A teljes variancián belüli %-os részesedés
Genetikai	
Additív	15
Non additív (monolokuszos)	1
Nemi (X-kromoszóma)	2
Környezeti	
Anyai genotípus	20
Állandó anyai környezet	18
Időleges anyai környezet	6
Anyai életkor	1
Születési sorrend	7
Egyéb	30
Együtt	100

a potenciális születési súlyt meghatározó poligén rendszerre, illetve az ezt alkotó gének összeadódó (additív) hatására vezethetők vissza. Emellett az egy-egy lokuszhoz kötött gének hatása, illetve a nemi kromoszómák eltérésére visszavezethető fiú—leány különbség sokkal jelentéktelenebb [12]. Ha 100%-nak vesszük a születési súly teljes varianciáját, akkor 18% a magzat genotípusának a részesedése. A magzat nézőpontjából vizsgált környezeti hatások között az anyai genotípus a legmeghatározóbb. Ezen túl az állandó, illetve időleges anyai környezet hatása további 24%-ért felelős. Az anyai életkor, még inkább

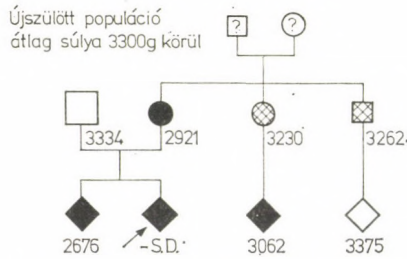
a szülei sorrend effektusa ugyancsak igazolható. Végül marad egy jelentős, 30%-os „egyéb” hatás, amely nem bontható pontosan részeire. A születési súly varianciájának létrejöttében tehát az anyai környezet a legmeghatározóbb (52%), míg ezen belül az anyai genotípus hatása a legfontosabb. S ez a következtetés összhangban volt az állattenyésztők megfigyelésével. Elég WALTON és HAMMOND [24] ma már klasszikusnak tekinthető lóvizsgálataira utalni. Két különböző lótípust mesterséges inszeminációval pároztattak, mégpedig a nagy testű Shire típust és a kis testű Shetland pónit. Ha az apa volt a nagy testű és az anya a póni, akkor az ivadékok súlya sokkal kisebb volt, mint a fordított esetben, tehát amikor az anya volt nagy testű és az apa póni (5. ábra). Ezt a



5. ábra. Shetland és Shire reciprok keresztelésének hatása

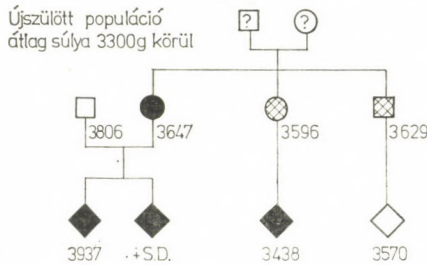
Fig. 5. Parents and offspring of reciprocal Shetland-Shire crosses — after WALTON and HAMMOND [24]

kísérletet még két fontos adalékkal kell kiegészíteni. Ha a pónikat egymás közt pároztatták, akkor az utódok súlya lényegében nem tért el azoktól az ivadékoktól, amelyeknek az anyja volt a póni és az apa a nagy testű. Viszont amikor a nagy testű állatokat pároztatták egymással, akkor utódaik születési súlya nem tért el azokétól, amelyeknek az anyja volt a nagy testű és az apja a póni. E vizsgálatokból tehát egyértelműen következett, hogy az újszülött születési súlyát döntően az anya testi adottságai határozzák meg. Mint PENROSE adataiból sejteni lehetett, ez a szabály az emberre is érvényes. Számos más fajban is — így a kutyában is — így van. Viszont a rágcsálókon (az egéren, a patkányon és a nyúl) nem észlelhető ez a szabályszerűség. Emberi vonatkozásban ezt az összefüggést legpontosabban OUNSTED és OUNSTED [18—21] vizsgálatai igazolták (6. ábra). Ők olyan újszülötteket választottak vizsgálati alanyul, akiknek a szü-



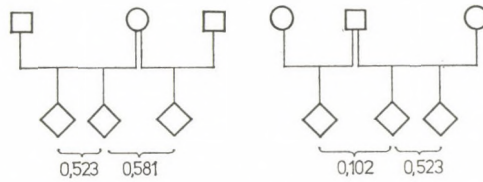
6. ábra. Az átlagos születési súly alakulása az időre született kis súlyú újszülöttek rokonságában
Fig. 6. Trend of mean birth weights among the relatives of small-weight newborns born in due time

letési súlya minimum egy standard deviációval elmaradt az átlagtól (amely esetükben 3300 g volt). Rokonaik születési súlyát meghatározva egyértelmű korreláció rajzolódott ki. A korábban született testvérek és az édesanya születési súlya ugyancsak számottevően elmaradt a születési súly átlagától. Az apa születési súlya viszont nem tér el az átlagtól, igazolva, hogy az apa születési súlyának nincs befolyása az újszülött súlyára. Még az anya testvéreinek születési súlyában is észlelhető bizonyos elmaradás az átlagtól. Sőt, az anya leánytestvérei — de nem a fivérek — utódainak a születési súlya megint csak kifejezettebben kisebb az átlagnál, vagyis hasonló az általuk vizsgált újszülött súlyához. Az átlagot legalább egy standard deviációval meghaladó újszülöttek genetikai család-vizsgálata már nem vezetett ilyen egyértelmű következtetésekhez (7. ábra). Az anya és a korábbi testvérek hasonlósága ez esetben is igazolható. Viszont



7. ábra. Az átlagos születési súly alakulása az időre született nagy súlyú újszülöttek rokonságában
Fig. 7. Mean birth weights in relatives of large-weight newborns born in due time

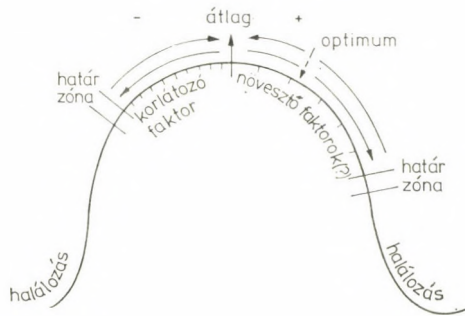
e megközelítésben az apában és az anya fivéreinek gyermekeiben is átlagost meghaladó volt a születési súly. Az anya születési súlyának fontosságát MORTON [16] vizsgálatai is szembetűnően igazolták (8. ábra). Féltestvérek adatait elemezve igazolta, hogy amikor egy anya két különböző férfitől szült gyermekeket, akkor a születési súlyuk korrelációja 0,581, tehát a szokásos (IV. táblázat). E gyermekek születési súlya lényegében hasonló korrelációt mutat az anya azonos házasságából született testvérekével is (0,523). Viszont, amikor olyan féltestvérek adatait hasonlította össze, ahol az apa volt a közös, akkor az apa két független nőtől nemzett gyermekeinek születési súlya szinte semmilyen (0,102) korrelációt nem mutatott. Az egy asszonytól származó testvérek korrelációja ugyanakkor ilyenkor is a szokásos (0,523).



8. ábra. A féltestvérek és testvérek születési súlyának korrelációja MORTON [16] vizsgálatában
 Fig. 8. Correlation of birth weight in sibs and half-sibs [16]

Mindezekből egyértelműen következik a tanulság: a születési súly fiziológias létrejöttében az anyának meghatározó jelentősége van. Az anya genotípusa egyrészt a terhességet megelőző testméretek, elsősorban a testmagasság alapján (a testsúly sokkal inkább függ a környezeti hatásoktól, ezért kevésbé érzékeny jelzője a genotípusnak), másrészt — és ez még fontosabbnak tűnik — az anya születési súlya, illetve a korábban született gyermekei születési súlya révén mérhető fel. Az idő előtti szülés hátterében más tényezők állnak, így arra az itt elmondottak nem érvényesek.

OUNSTED [21] kísérletet tett a háttérben álló oki tényezők meghatározására is (9. ábra). Feltehetően az anya genotípusában van egy vagy több olyan



9. ábra. A magzat súlyát szabályozó rendszer modellje OUNSTED [21] után
 Fig. 9. Regulation model of birth weight [21]

gén, amely(ek) a lepény nagyságán és így annak működésén keresztül érvényesíti(k) a hatásukat. Ha ennek a génnek a hatása korlátozódik, akkor az újszülött súlya kisebb lesz, míg ha ilyen gátló tényezők nem érvényesülnek (vagy esetleg bizonyos növesztő faktorok hatnak), akkor az újszülött súlya az átlagot meghaladó lesz. Mindezek hatása bizonyos szélső határokon túl már kedvezőtlen és a túl kicsi vagy a túl nagy súly akár halálozásban is megnyilvánulhat.

Maternális hatások a teratológiában

A teratológiai szakirodalom e kérdéssel viszonylag keveset foglalkozik, illetve csupán kiragadott kórokokra koncentrálódik a figyelem. A hatás jellege alapján a következőképpen osztályozhatók:

A szorosabban vett teratogén ártalmak

Ilyen pl. a rubeola-vírus, bizonyos gyógyszerek (pl. Contergan), amelyek az anyai szervezet közvetítésével, illetve az anyai szervezeten keresztül érik el a magzatot. Itt azonban nem passzív áthatolásról van szó. A rubeola-vírus esetében az anyai szervezet immun-állapota alapvetően megszabja, hogy a vírus eljuthat-e a magzathoz avagy sem. A gyógyszerek esetében az anyai anyagcsere milyensége is fontos tényező. Így még e szorosabban vett teratogén ártalmak esetében is számottevő befolyásoló hatása lehet az anyai szervezeten. Ennek igazságát, nevezetesen az *anyai genotípus* fontosságát bizonyítja KALTER [13] következő kísérlete is. Ő is az *A/Jax* és *C₅₇BL* egerek pároztatása útján kapott ivadékok kortizon-indukálta szájjpadhasadék gyakoriságát vizsgálta (*VI. táblázat*). Két beltenyészetű törzs F_1 generációjának egyedei — a hímek nemi kro-

VI. táblázat

A kortizonnal kiváltott szájjpadhasadékok gyakorisága két beltenyészetű egértörzs különböző keresztezésű ivadékaiban [13]

Table 6. Proof of maternal factors in the etiology of cleft palate caused by cortisone in cross breeding of two inbred mice strains

Keresztezés	Ivadékok szájjpadhasadékkal, %
<i>A/Jax</i> × <i>A/Jax</i>	100
<i>A/Jax</i> × <i>C57BL</i>	44
<i>C57BL</i> × <i>A/Jax</i>	3
<i>C57BL</i> × <i>C57BL</i>	19

moszómáitól eltekintve — genetikailag azonosak, függetlenül az apa-, illetve anya-állat hovatartozásától. A táblázatban a 2. és 3. sorban közölt keresztezések után — a várt azonos gyakoriság helyett — mégis eltérő szájjpadhasadék előfordulást talált és ez csakis az anyai genotípus hatásával magyarázható meg. Az 1. és 2., illetve 3. és 4. sorban megadott keresztezések utáni különbség vezethető vissza a magzat genotípusában levő differenciákra. Lényegében tehát mind a magzati, mind az anyai genotípus számottevő befolyásával kell számolni.

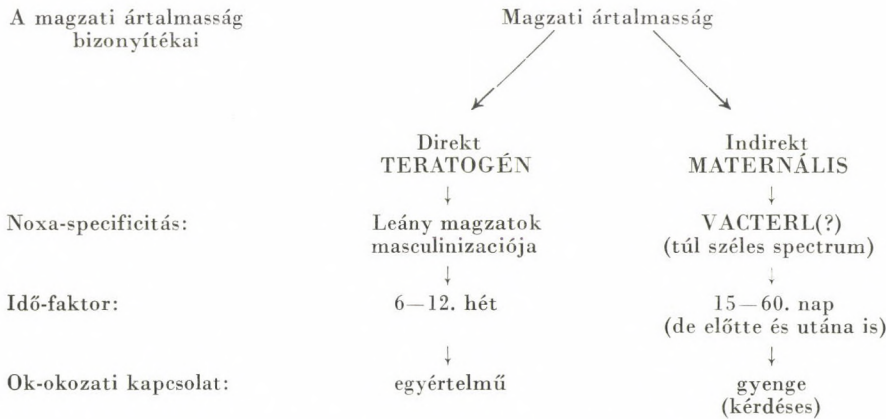
A szorosabban vett maternális hatások

Ide elsősorban az anya lokális rendellenességei (pl. kétszarvú méh, szűk medence) és betegségei (pl. cukor-, pajzsmirigy-, vese-, szív-betegség, magasvérnyomás) tartoznak. Ezek ártalmas magzati következményei a szülészeti szakirodalomban jól ismertek.

Az anyai szervezet bizonyos állapotai

Itt mindenekelőtt bizonyos immunológiai állapotokra kell utalni. Például az Rh negatív vércsoportú asszonyokban, ha a férjük Rh pozitív és már előfordult Rh pozitív magzatú terhesség és ezzel szembeni izoimmunizálódásukra sor került, a következő terhességekben az anya anti-D ellenanyagai végzete-

sek lehetnek az utódra. Ide sorolhatók a hormonális egyensúly zavarai is, amelyek maguktól vagy esetleg külső hatástól — például fogamzásgátló tablettáktól — provokálva a megtermékenyítés, illetve beágyazódás körülményeit zavarhatják meg. E maternális eredetű magzati ártalmakra általában az aspecifikusabb megjelenés (szemben az igazi teratogének noxa-specificitásával), a szélesebb időhatárok (az időfaktor elmosódása) és a gyenge ok-okozati kapcsolat a jellemző (10. ábra). Így jöhet létre a VACTERL-rendellenesség kapcsolódás



10. ábra. A direkt teratogén és indirekt maternalis hatás jellemzése

Fig. 10. Characteristic features of teratogenic and maternal factors in the etiology of congenital abnormalities

vagy az egyes összetevők, pl. a végtagredukciós rendellenességek fokozott előfordulása. Végül ide sorolható az anya életkora, terhességi-szülési sorrendje, szociális helyzete stb. Az életkor az anyai szervezet általános állapota, az ivarsejtképződéssel kapcsolatos gyakoribb zavarok pl. non-diszjunkció, és sok minden révén érvényesítheti hatását. A szülési sorrend hatása, feltehetően mint kondicionáló tényező, is jól ismert. Bizonyos veleszületett rendellenességek, pl. a csípőficam és dongaláb az elsőszülöttekben számottevően gyakoribbak. Más rendellenességek inkább a magasabb szülési sorszámok mellett fordulnak elő, ilyen például a koponyahiány és a nyitott gerinc. A szociális helyzet hatása sem hanyagolható el. Így például a familiáris értelmi fogyatékoság vagy az előbb említett koponyahiány, nyitott gerinc a szegényebb néprétegekben számottevően gyakoribb. Ennek hátterében a rosszabb táplálkozás, a személyi higiénia alacsonyabb szintje és mások állhatnak.

Az anya személyisége

Itt mindenekelőtt a terhesség alatti élvezeti cikkek fogyasztására lehet utalni. A terhesség alatti cigarettázás ma közegészségügyileg a legfontosabb magzati ártalomnak tekinthető. A méhen átfolyó vér mennyiség csökkenése és

az oxigén-tartalom redukálódása a magzati fejlődés ütemét jelentősen visszafogja és ez magyarázhatja a számottevően kisebb születési súlyt, a kisfokú agykárosodást, a fokozott méhen belüli és születést követő halálozást. A terhesség alatti alkoholizálás a lepényen szabadon átáramló alkohol mitózis-gátló hatása miatt jellemző ártalmat, a magzati alkohol szindrómát idézheti elő. Az életmód természetesen más, kevésbé nyilvánvaló hatások révén is befolyásolhatja a méhen belül fejlődő magzatot.

A maternális hatásokat az effektus érvényesülési ideje alapján is lehet osztályozni, így *a*) a fogamzás és beágyazódás; *b*) az organogenezis; *c*) a magzat kvantitatív fejlődésének és érési időszakában; *d*) a szülés alkalmával érvényesülő hatásokat érdemes elkülöníteni.

A születést követően érvényesülő maternális hatások

A bonyolultan összefüggő hatások rengetegéből 3 hatást emelünk ki.

A szoptatás jelentősége

A szoptatásnak számos fontos biológiai előnye van. Egyrészt az anyatej optimális tápanyag, amelynél jobb tápszert eddig még sehol sem sikerült előállítani. Másrészt a szoptatás révén az anya képes gyermekeinek azokat az ellenanyagokat átadni, amelyek a fertőző betegségekkel szemben időleges védelmet biztosítanak. Harmadrészt a szoptatás alatt általában nem következik be újabb terhesség. A korábbi történeti korokban ez lehetett a leghatékonyabb születéskorlátozási módszer.

Az anyai magatartás

A sok lehetséges megközelítés közül egyet ragadjunk ki. Csaknem mindig egyik anyja a bal oldalon tartja a csecsemőjét. Az első és ésszerű magyarázat a jobb-kezesség túlsúlya volt. A jobb kezes anyák könnyebben tudják etetni, gondozni bal oldalt tartott gyermekeiket. A további vizsgálatokban azonban meglepetéssel tapasztalták, hogy míg a jobb kezes anyák 83%-ban, addig a bal kezesek 78%-ban bal oldalt tartják a csecsemőt. Nincs értékelhető különbség tehát a két csoport között és ezért ez a magyarázat nem fogadható el.

A vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a bal oldalon tartott csecsemők kevesebbet sírnak (ill. bal oldalra téve hamarabb megnyugszanak), sőt harmonikusabban fejlődnek (pl. súlygyarapodásuk is kedvezőbb). Biológiai okoknak kellett tehát a háttérben állni. S hamarosan rájöttek a megfejtésre: bal oldalt az anyai szívdobogást érzik a csecsemők, s ez jó, megnyugtató számukra. Hiszen a méhen belüli életükben már megszokták az anyai szív ritmusos verését és ezt igénylik a születés után is.

Az anyán keresztül érvényesülő szociokulturális hatások

Az emlősök ivadékgondozásának — a testméretek növekedése, az élet és a terhesség tartamának meghosszabbodása, az ivadékszám csökkenése, az utódok születéskori éretlenségének fokozódása stb. miatt — kiemelt a jelentősége. Ráadásul az ember esetében — aki a marxi meghatározás szerint kettős termé-

szetű lény: döntően emberi, tehát társadalmi és csak másodlagosan természeti, tehát biológiai — a szociokulturális hatásoknak meghatározó a fontossága. Ennek érzékeltetésére elég két adat. Az egyik: az anya értelmi szintje sokkal meghatározóbb az utód értelmességének alakulására, mint az apáé. Pedig a két szülő genetikai részesedése az utód genomjában bizonyosan egyforma. A másik: az Ődipusz-komplexus, amelyet a pszichológiában fontosnak tartanak nemcsak az utód későbbi szexuális életének (pl. homoszexualitás) alakulásában, hanem bizonyos betegségek (pl. az alkoholizmus) létrejöttében is.

Összefoglalás

A maternális hatás értelmezése ellentmondásos a biológiában, egyrészt mert jelentőségét kevésbé ismerik, másrészt pedig mást értenek alatta a genetikusok, a teratológusok, és az orvosok.

Az anyának az ivadékgondozásban játszott szociális szerepét helyes elkülöníteni a biológiai jellegű maternális effektustól. Ezalatt elsősorban a petesejt citoplazmájában raktározott anyagok hatását értjük.

A tanulmány első részében a maternális effektus tanulmányozására felhasználható morfológiai, mikroszebészeti, transzplantációs, az ún. genetikai boncolásos, és biokémiai módszereket ismertetik a Szerzők. Az ezek segítségével nyert ismereteket egy-egy jellemző példán mutatják be. Az extrakromoszomális tényezők szerepével külön alfejezetben foglalkoznak. A pete riboszómáinak eredete is figyelmet érdemel a maternális effektus elemzésekor.

A tanulmány második részében a maternális effektus humán jelentőségével foglalkoznak. Genetikai nézőpontból különösen a beágyazódást megelőzően igen magasra becsült magzati veszteségben lehet jelentős szerepe a maternális hatásnak, pontosabban a masked mRNS-nek. A magzati súlyfejlődésben meghatározó fontosságúnak bizonyuló maternális effektus feltehetően a placentaris faktorok révén érvényesül. A teratológiában mind az anyai genotípusnak, mind az anyai szervezet bizonyos állapotainak hatását figyelembe kell venni. Végül a születést követően az ivadékgondozás révén — közvetve — érvényesülő hatásokra (szoptatás, anyai magatartás, szociokulturális öröklődés) utalnak.

IRODALOM

1. BAIRD, D. (1945) Influence of social and economic factors on stillbirths and neonatal deaths. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, **52**, 339.
2. BOGNÁR Z. és CZEIZEL E. (1971) Az ismert kórokok részesedése a kis súlyú újszülöttek (koraszülöttek) aetiológiájában. *Orvosképzés*, **46**, 231—240.
3. CAVALLI-SFORZA, L. L. and BODMER, W. F. (1971) *The genetics of human populations*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
4. CZEIZEL, A., TUSNÁDY, G., VACZÓ, G. and VIZKELTY, T. (1975) The mechanism of genetic predisposition in congenital dislocation of the hip. *J. Med. Genet.*, **12**, 121—124.
5. CZEIZEL, A. (1981) Epidemiological study on undescended testis. *J. Urol.* **126**, 524—528.
6. DAVIDSON, E. H. (1976) *Gene activity in early development*. 2nd ed. Acad. Press, New York, 1—452.
7. FIELDING, C. J. (1967) Developmental genetics of the mutant grandchildless of *Drosophila subobscura*. *J. Emryol. exp. Morphol.*, **17**, 375—384.
8. GOODENOUGH, U. (1978) *Genetics*. 2nd ed. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1—840.
9. GYÖRFFY B. (1966) Nem-kromoszomális öröklődés. *MTA Biol. Oszt. Közl.*, **9**, 55—90.
10. HYTTEN, F. E. and LEITCH, I. (1964) *The physiology of human pregnancy*. Blackwell, Oxford.

11. ILLMENSEE, K. (1978) *Drosophila* chimeras and the problem of determination. In: GEHRING, W. J. (ed.): *Genetic mosaics and cell differentiation*. Springer-Verlag, Berlin—New York, 51—69.
12. JAMES, D. A. (1967) Some effects of immunological factors on gestation in mice. *J. Reprod. Fert.*, **14**, 265—275.
13. KALTER, H. (1965) Experimental investigation of teratogenic action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **123**, 287—293.
14. KARN, M. N. and PENROSE, L. S. (1951) Birth weight and gestation time in relation to maternal age, parity and infant survival. *Ann. Eugen. Lond.*, **16**, 147—164.
15. MARSH, J. L. and WIESCHAUS, E. (1977) Germ-line dependence of the maroonlike maternal effect in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **60**, 396—403.
16. MORTON, N. E. (1958) Empirical risk in consanguineous marriages: birth weight gestation time and measurements of infants. *Amer. J. Hum. Genet.*, **10**, 344—349.
17. NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1977) Genetic analysis of pattern formation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archives*, **183**, 249—268.
18. OUNSTED, M. and OUNSTED, C. (1966) Maternal regulation of intra-uterine growth. *Nature*, **212**, 995—997.
19. OUNSTED, M. and OUNSTED, C. (1968) Rate of intrauterine growth. *Nature*, **220**, 599—600.
20. OUNSTED, M. and OUNSTED, C. (1973) *On fetal growth rate*. Clinics in Developmental Medicine No **46**, Heinemann, London.
21. OUNSTED, M. (1974) Familial trends in low birth weight. *Brit. Med. J.*, *iv*, 163.
22. PENROSE, L. S. (1961) *Recent advances in human genetics*. Little and Brown Company, Boston.
23. REGENASS, U. and BERNHARD, H. P. (1978) Analysis of the *Drosophila* maternal effect mutant *mat(3)* by pole cell transplantation. *Molec. Gen. Genetics*. **164**, 85—91.
24. WALTON, A. and HAMMOND, I. (1938) The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc. R. Soc.*, **125**, 311—314.

THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE MATERNAL EFFECT

Szabad, J. and Czeizel, E.

Biological Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged
and Department of Human Genetics, National Institute of Hygiene, Budapest

The different interpretations of maternal factors are reviewed. First the characteristic features of cytoplasmic inheritance and the different types of extrachromosomal factors are demonstrated in connection with the different approaches. Next the importance and manifestation of maternal factors are summarized in man, particularly in the preimplantation period (masked mRNA), in the development of birth weight and in the etiology of congenital abnormalities.

OPIÁT RECEPTOROK ELŐFORDULÁSA ÉS FARMAKOLÓGIAI JELLEMZÉSE MOLLUSKÁK KÖZPONTI IDEGRENSZERÉBEN

S.-RÓZSA KATALIN, HIRIPI LÁSZLÓ és *STEFANO G. B.

MTA Biológiai Kutatóintézete, Tihany;

*East Coast Neuroscience Foundation, Northport N. Y. 11768, USA

Beérkezett: 1981. június 4-én

Kulcsszavak: Molluska, neuron, opiat peptid, endorfin, morfin, naloxon, sztereospecifikus receptor kötődés, dopaminerg receptor, morfin tolerancia molluskákon

Bevezetés

Az opiát receptorok felfedezésének egy évtizedes múltja sincs, s a leggyorsabban fejlődő kutatási területek közé tartozik. E kutatások kezdetétől HUGHES és mtsai eredményeit jelölhetjük meg, akik meghatározták két endogén opioid peptid, a metionin- és a leucin-enkefalin aminosav sorrendjét [13]. Ezt megelőzően is történtek kísérletek a fájdalomérző receptorok feltárására. GOLDSTEIN és mtsai [9] megfogalmazták a specifikus és nem-specifikus opiát kötődés kritériumait gerinces agyban, majd három kutatócsoport egymástól függetlenül sztereospecifikus opiát kötődést mutatott ki az agyban, s ezt nevezték el opiát receptornak [21, 30, 48]. E kutatások után logikusan következett az endogén ligandok meghatározása. HUGHES és mtsai [13] vizsgálatai igazolták, hogy a 91 aminosavból álló hipofízis hormon, a β -lipotropin két endogén opiát peptidet tartalmaz, és pedig a β -endorfint (vagy C-fragmentumot), mely a 61–91 aminosav-sornak felel meg, továbbá a met-enkefalint, mely a 61–65-ös fragmentummal azonosítható. Annak ellenére, hogy a met-enkefalin a β -endorfinnak 61–65-ös fragmentuma, mégsem volt igazolható, hogy a met-enkefalin a β -endorfin bomlásakor keletkezik. A leu-enkefalin hordozó-molekuláját sem ismerjük, bár számos laboratóriumban intenzíven keresik. Opiát receptorok nemcsak a központi idegrendszerben, hanem a gastrointestinalis rendszerben, továbbá a szimpatikus idegrendszerben és mellékvesében is előfordulnak [31, 53].

Az endogén ligandok, valamint a specifikus receptor bénító — a naloxon — felismerése jelentősen vitte előre az opiát receptorok kutatását [32]. Két eltérő tulajdonságú opiát receptort írtak le gerincesek agyában, az egyik főként a morfint, míg a másik az enkefalint köti [1, 15, 23].

Gerinctelenekben az opiát receptorok és endogén peptidek előfordulásának igazolását nagymértékben hátráltatta az a tény, hogy a kutatások kezdetén olyan adatok láttak napvilágot, melyek szerint az opiát receptor és az enkefalin érzékenység hiányzik a gerinctelenekből, de valamennyi gerincesben kimutatható [22, 28]. Ugyanakkor a gerinceseken belül legkevesebb enkefalint az emberben és majomban, legtöbbet a békában mutattak ki [28], tehát egy filogenetikai sorral csökkenő tendenciát tártak fel. Gerincesekben az enkefalin előfordulás az agy ősbibb anatómiai egységeiben magasabb [28]. Mindezek az adatok felhívták a figyelmet az opiát receptorok és endogén peptid-érzékenység újrazivsgálásának szükségességére gerinctelen állatokban. *Helix pomatia* identifikált neuronjai [26, 35, 36] alkalmasak opioid peptidek sejt-szinten történő érzékeny-

ségének vizsgálatára, mivel a sejtek más transzmitterekre való reakcióját és gyakran monoamin tartalmát, továbbá bemeneteit és kimeneteit is ismerjük [36].

Vizsgálataink kezdetén már ismert volt a met-enkefalin dopamin-szintet moduláló hatása egy tengeri kagyló, a *Mytilus edulis* központi idegrendszerében [39, 40], azonban e faj idegsejtjei méretüknél fogva kevésbé alkalmasak mikroelektrofiziológiai vizsgálatokra, ezért Intézetünkben a *Helix pomatia* vált az enkefalin és morfin érzékenység sejt szintű vizsgálatának objektumává, míg a monoaminok és ciklikus nukleotidok szint változásának vizsgálatára [10, 41, 43, 44] egy édesvízi kagyló, az *Anodonta cygnea* L., valamint az éticsiga, a *Helix pomatia* szolgált. A *Mytilus edulis* fajon nyert adatok STEFANO [38, 39, 40, 42, 43, 45] eredményei.

Anyag és módszer

A vizsgálatokban *Helix pomatia* L. (Gastropoda), *Anodonta cygnea* L. és *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) fajokat használtunk.

A mikroelektrofiziológiai vizsgálatokat *Helix pomatia* éber egyedeiből készült félizolált készítményen végeztük. A preparátum tartalmazta a garatkörüli gangliongyűrűt, az intestinális ideget és a cardio-renális rendszert, mely magába foglalja a szívet, perikardiumot, vesét, májat, vénát és aortát. A membrán- és az akciós potenciál elvezetése a jobb parietális ganglion korábban identifikált legnagyobb neuronjából (RPa2 sejt) és a viscerális ganglion egyik ismert neuroszekrécios sejtjéből (NS) történt [38]. A két neuron intracelluláris, a szív-ideg extracelluláris aktivitását, valamint a szívkontrakciót egyidejűleg regisztráltuk. A szív-kontrakciók regisztrálása foto-optikus módszerrel történt, az intestinális ideg aktivitását Ag/AgCl elektródák segítségével vezettük el. A neuronok intracelluláris aktivitását 2,5 M KCl-dal töltött 8–20 MOhm ellenállású mikroelektrodákkal vezettük el, a jelek erősítésére nagy bemenő ellenállású, negatív kapacitású erősítőt használtunk. A kísérletekben Tektronix oszcilloszkópot és négyesatornás Gould—Brush-440 kiírót használtunk.

A kísérletekben a MENG-féle fiziológiás oldatot alkalmaztuk [18], és ebben oldottuk a vizsgálandó anyagokat is. Az anyagok applikálása a sejtfelszínre mikropipetta segítségével történt. Az anyag ismert koncentrációját és mennyiségét tartalmazó mikropipettát a sejtmembrán meghatározott területéhez közelítettük mikromanipulátor segítségével, majd az anyag kiáramlását nyomás alkalmazásával biztosítottuk. Az anyagot a membránfelszínről átfolyó perfúzióval mostuk ki a preparátumot tartalmazó kamrából. Az elektrofiziológiai vizsgálatokat szobahőmérsékleten (20–24 °C) végeztük az év minden szakában.

A biokémiai vizsgálatokban *Anodonta cygnea* L. és *Mytilus edulis* L. fajokat használtunk. Ebben a kísérletsorozatban az *Anodonta* és *Mytilus* cerebrális ganglionjait met-enkefalin, morfinnal vagy naloxonnal kezeltük, majd a 20 perces kezelést követően 30, 60 vagy 120 perc múlva meghatároztuk a ganglion dopamin (DA), szerotonin (5HT) vagy ciklikus nukleotid (cGMP, cAMP) tartalmát. A spektrofotofluorimetriás mérés, valamint a szignifikancia számítások részletes leírását korábbi közleményeink tartalmazzák [10, 41, 46]. A ciklikus nukleotid szint meghatározásához standard kitéket használtunk, s a folyamat részletes leírása korábban megtörtént [41].

Az opiát receptor denzitásának mérése ³H-naloxon (15,2 Ci/mmol) kötéssel történt, a gerinces agyra leírt módszernek megfelelően [28]. A receptor kötő-

dést *Helix*, *Anodonta*, *Mytilus* és *Locusta* agyban mértük az év minden szakában.

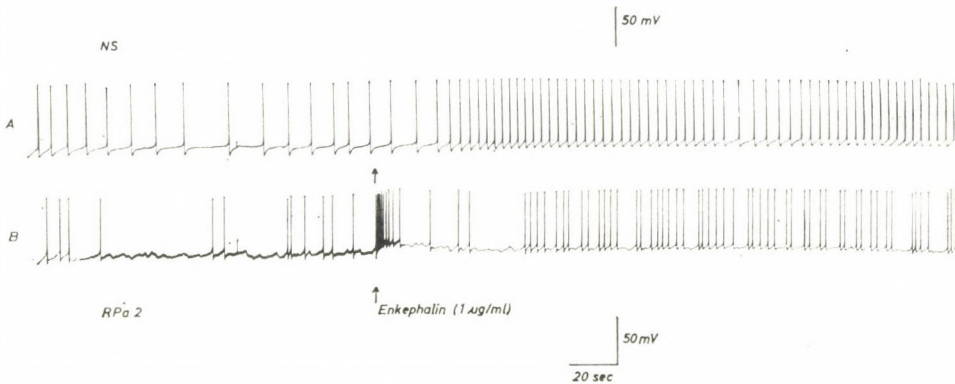
Morfin tolerancia kialakulását *Helix pomatia* L. fajban vizsgáltuk. Az állatoknak desztillált vízben oldott 50 μ l mennyiségű, eltérő töménységű morfin oldatot vittünk be subcutan. Az egyik kontroll csoport desztillált vizet kapott a morfinnal azonos feltételek mellett, a másik nem kapott injekciót. A kezelt és nem kezelt állatok rigiditását, immobilizációját, taktilis ingerre adott válaszreakcióját és testhelyzet korrigáló képességét hasonlítottuk össze 5 napon át [46]. Az összehasonlítást végző személyek nem tudták, melyik a morfinnal kezelt csoport. Az anyag injektálását 6 óránként megismételtük 5 napon át, éjjel is.

A következő anyagok hatását vizsgáltuk: metionin-enkefalin (Calbiochem), naloxon (Endo Labs), morfin (Chinoin), dopamin (Sigma), 5-hydroxi-triptamin (Sigma).

Eredmények

Met-enkefalin és morfin hatása identifikált Helix neuronokon

A dopaminerg RPa2 neuron és a viscerális neuroszekréciós sejt (NS) aktivitásának fokozásával reagál a lokálisan applikált met-enkefalinnra (1. ábra):



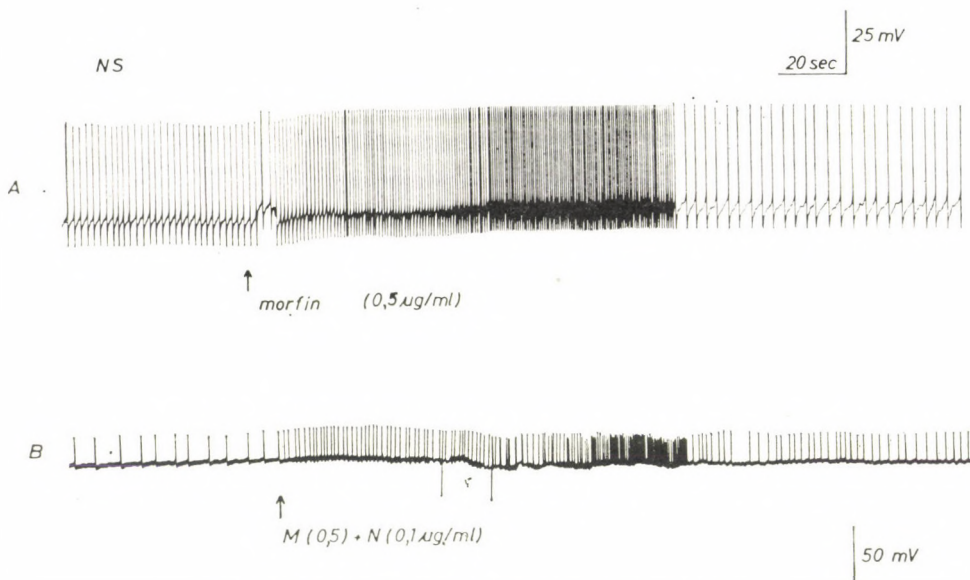
1. ábra. A neuroszekréciós (NS) és a dopaminerg (RPa2) neuron aktivitási mintázata.

A met-enkefalin sejt felszínre történő applikálását nyíl jelöli

Fig. 1. The activity pattern of the neurosecretory (NS) and dopaminergic (RPa2) neurons. Application of met-enkephalin to the cell surface is shown by an arrow

mindkét neuron tüzelési frekvenciája megnőtt és az aktivitási mintázatban megjelentek vagy megszorodtak a serkentő posztzinaptikus potenciálok (EPSP). Azonban a két sejtben a met-enkefalin serkentő hatásának lefutásában különbségeket lehetett kimutatni, amennyiben a neuroszekréciós sejtben a hatás hosszan tartó, míg az RPa2 neuronon gyors lefutású volt. Az RPa2 sejtben a gyors serkentő választ rövid idejű (10–20 sec) gátlás követte, majd az eredeti aktivitási mintázat helyreállt. A met-enkefalin hatékonyabb volt a peptiderg neuroszekréciós sejtben, mint a dopaminerg RPa2 neuronon. A met-enkefalin hatása fiziológiai oldattal gyorsan és jól megszüntethető az RPa2 sejtben, de a peptiderg neuronon a mosás ellenére percekig fennmarad.

Ugyanezen a két sejten vizsgáltuk a morfin hatását is, mely erős serkénytést váltott ki (2. és 3. ábra). A morfin hatása rendkívül intenzív volt és az applikálást követően 8–10 sec múlva jelent meg, de az applikálás teljes idején változatlan erősséggel fennmaradt. A spontán tüzelés frekvenciáját a morfin a neuroszekrécións sejten maximum 300%-al, az RPa2 neuronon pedig 600–700%-al növelte (2. és 3. ábra). A morfin hatás csak többszörös mosással szüntethető meg.



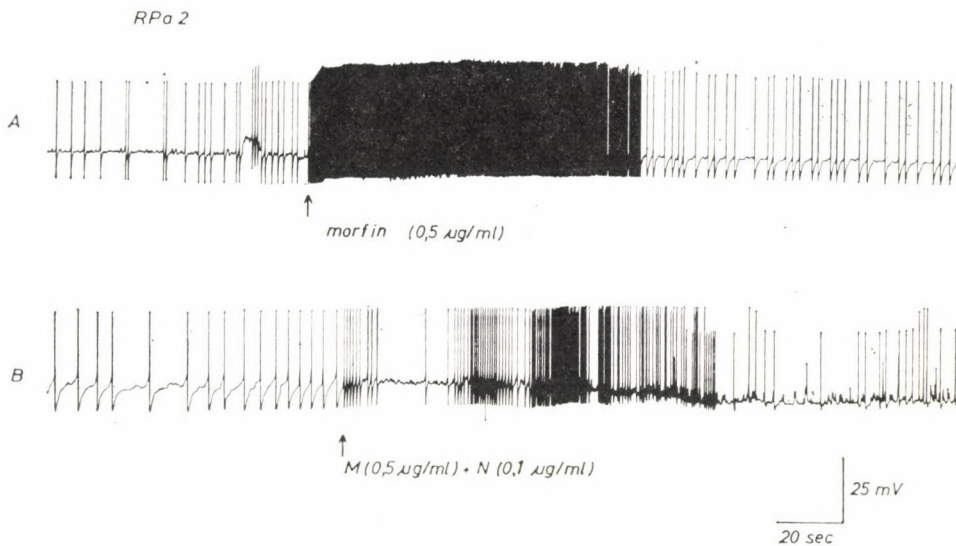
2. ábra. Morfin hatása a neuroszekrécións sejten (NS) naloxon nélkül (A) és naloxon jelenlétében (B)

Fig. 2. Effect of morphine on the neurosecretory (NS) cell without (A) and in the presence (B) of naloxone

Morfin kezelés hatására nemcsak a spontán kisülés frekvenciája változik meg az RPa2 neuronon, hanem a szív ingerlésére fellépő gátló válasz is változik. Tíz perces morfin kezelést követően az RPa2 sejten a szív taktilis ingerlése nem vált ki gátlást (4. ábra). E hatás kiváltásához a morfin 10 µM-nál magasabb dózisa szükségesek.

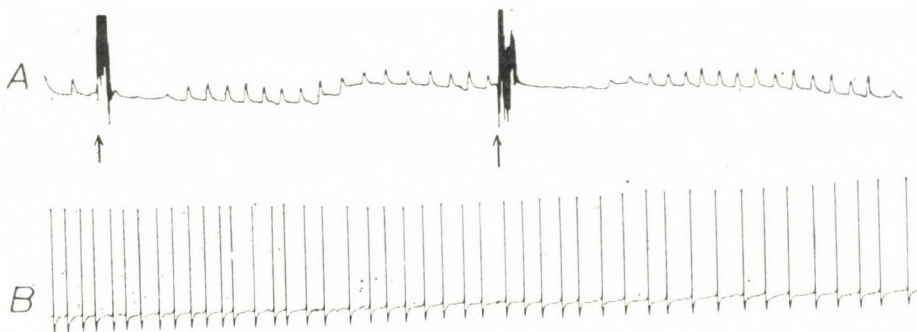
Naloxon hatása a met-enkefalin és morfin indukálta változásokra

A naloxon morfin-, és endogén peptid antagonistája tulajdonsága mindkét vizsgált sejten igazolható volt. Az RPa2 sejten a naloxon teljesen blokkolta a met-enkefalin serkentő hatását (5. ábra), míg a morfin erős serkentő hatását teljesen nem szüntette meg, csupán csökkentette (2. és 3. ábra). Magasabb naloxon koncentrációk a neuroszekrécións sejten is antagonizálták a morfin hatását (6. ábra). A naloxon önmagában nem befolyásolta a vizsgált neuronok tüzelési aktivitását. A naloxon nem befolyásolta a szív ingerlésével RPa2 neuronon megjelenő gátló válasz lefutását sem.



3. ábra. Morfin hatása a dopaminerg sejten (RPa2) naloxon nélkül (A) és naloxon jelenlétében (B)

Fig. 3. Effect of morphine on the dopaminergic neuron (RPa2) without (A) and in the presence (B) of naloxone

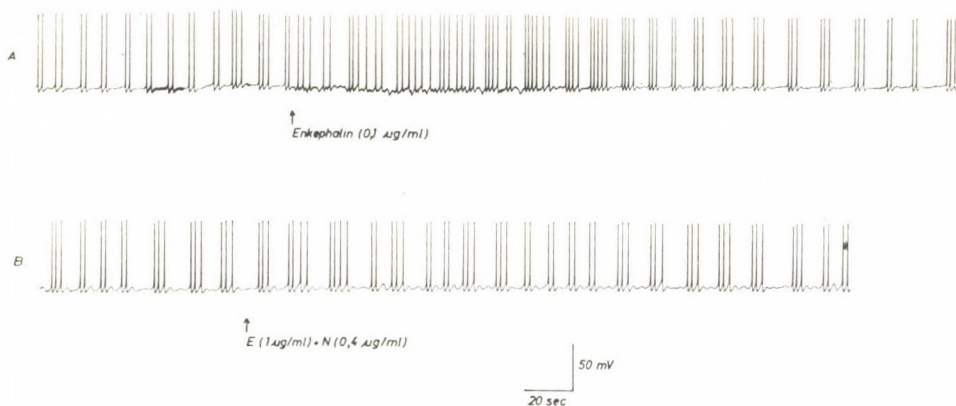


4. ábra. Morfin hatása a dopaminerg sejt (RPa2) szívből eredő gátló bemenetére

Fig. 4. Modification of the inhibitory input running from the heart to the RPa2 neuron upon the influence of morphine

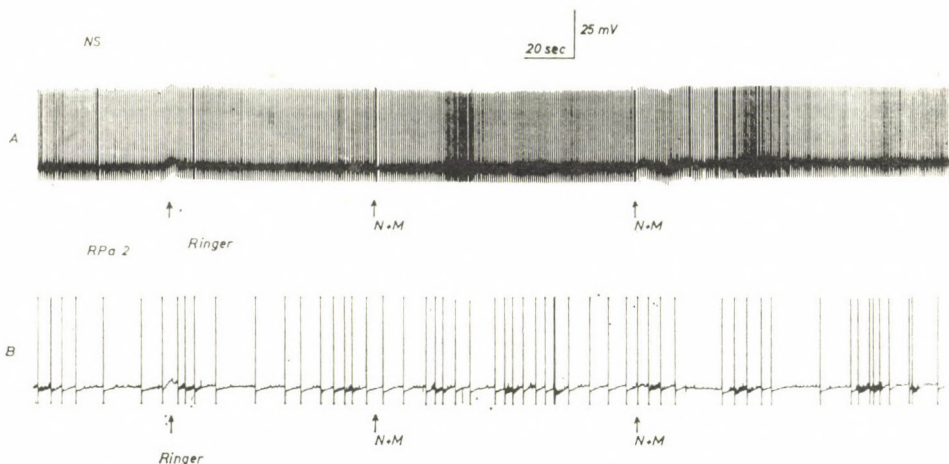
A met-enkefalin, a dopamin és az 5HT hatás kapcsolata

Korábban STEFANO és CATAPANE [39, 40], valamint STEFANO és HIRIPI [41] igazolták a met-enkefalin dopamin-szintet növelő hatását *Mytilus* és *Anodonta* fajokon s ezt a hatást naloxonnal bénítani lehetett. Tisztázni kívántuk, hogy a dopamin és met-enkefalin azonos mechanizmusok révén befolyásolja-e a neuroszekréciós és dopaminerg neuron aktivitását. A dopamin növeli a NS sejt tüzelési frekvenciáját és gátolja az RPa2 sejt kisüléseit (7. ábra). A dopamin e



5. ábra. Met-enkefalin hatása a dopaminerg sejten (RPa2) naloxon nélkül (A) és naloxon jelenlétében (B)

Fig. 5. Effect of met-enkephalin on the dopaminergic cell (RPa2) without (A) and in the presence of (B) naloxone

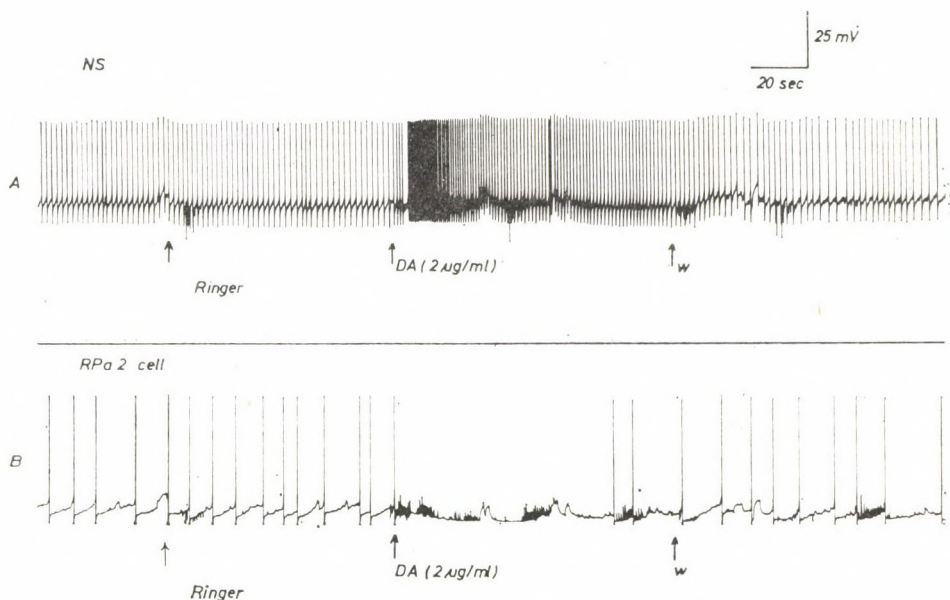


6. ábra. A morfin és naloxon ismételt applikálása a neuroszekrécións (NS) és dopaminerg sejten (RPa2). A nyíl a fiziológias oldat cserét, ill. a naloxon és morfin applikálást jelzi

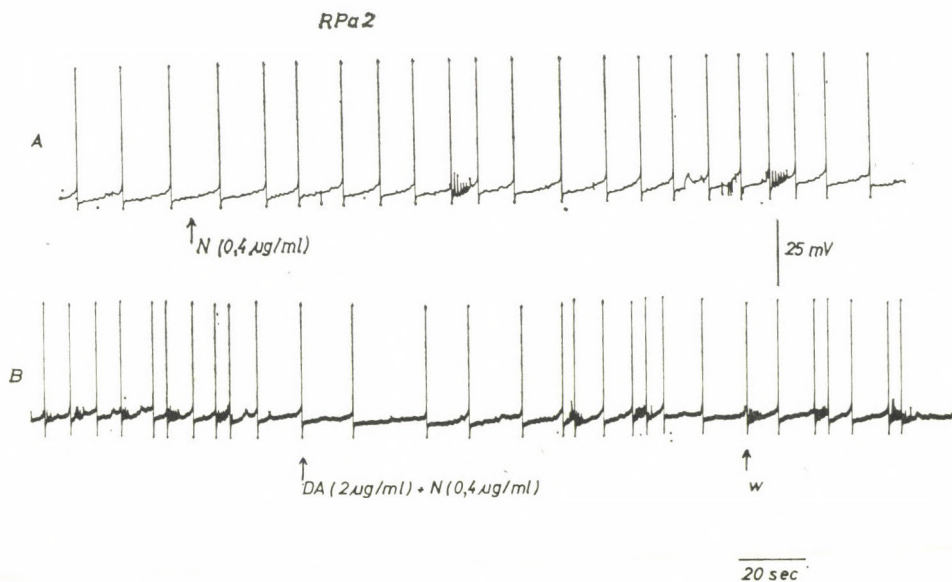
Fig. 6. Effect of repeated application of morphine and naloxone on the neurosecretory (NS) and dopaminergic (RPa2) neurons. The arrows show the change of physiological saline and/or that of the application of morphine and naloxone

két hatása közül a naloxon csak a gátlást antagonizálja az RPa2 sejten (8. ábra).

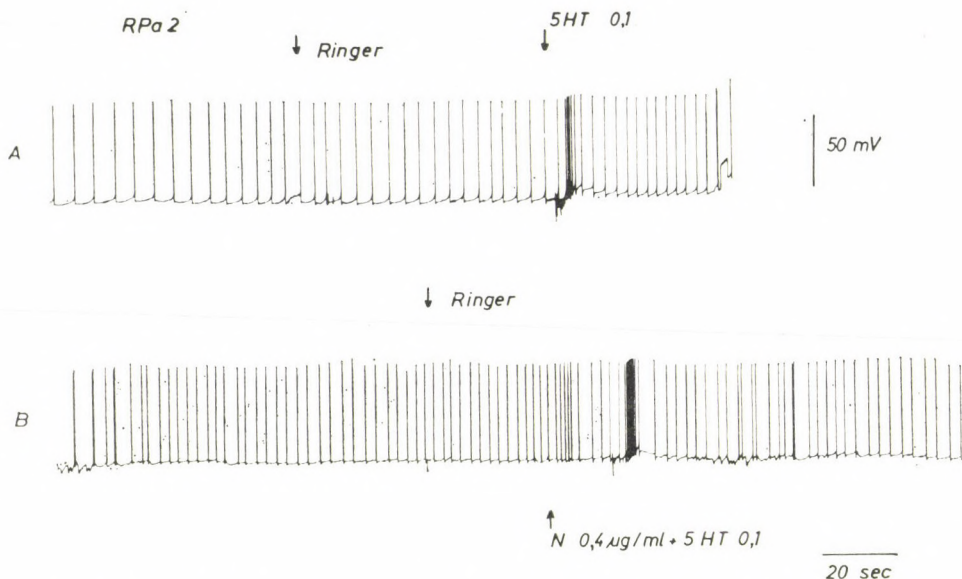
Az 5-hidroxitriptamin az RPa2 neuron tüzelési frekvenciáját megnöveli, s ezt a naloxon nem képes kivédeni (9. ábra).



7. ábra. Dopamin hatása a neuroszekréciós (NS) és dopaminerg (RPa2) sejten
 Fig. 7. Effect of dopamine on the neurosecretory (NS) and dopaminergic (RPa2) neurons



8. ábra. Naloxon hatása a dopamin indukálta gátlásra az RPa2 sejten
 Fig. 8. Effect of naloxone on the inhibition evoked by dopamine on the cell RPa2

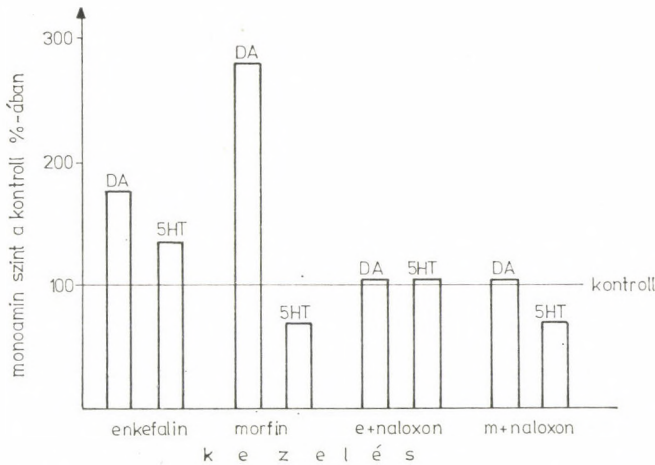


9. ábra. 5HT hatása az RPa2 sejten naloxon nélkül (A) és naloxon jelenlétében (B)
 Fig. 9. Effect of 5HT on the cell RPa2 without (A) and in the presence of (B) naloxone

*A monoaminok és ciklikus nukleotidok szintjének változása
 Anodonta cerebrális ganglionjában met-enkefalin és morfin
 kezelést követően*

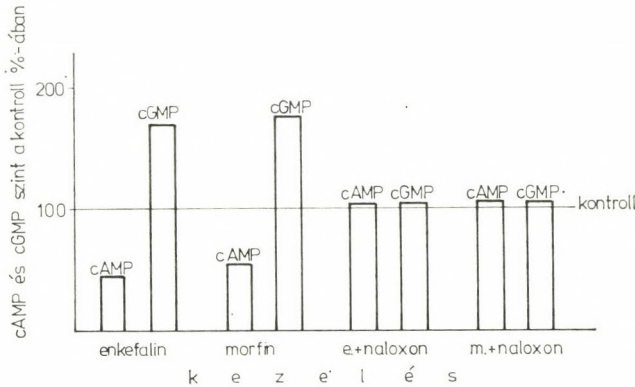
Anodonta cerebrális ganglionjában met-enkefalin kezelés hatására a dopamin szint 73%-al az 5HT szint pedig 32%-al növekszik (10. ábra). Morfin kezelés a dopamin-szintet 169%-kal növelte, s ugyanakkor az 5HT szintet 31%-kal csökkentette. A naloxon a met-enkefalin 5HT és DA szint növelő hatását kivédte. Azonban a naloxon a morfinnak csak DA-szintet növelő hatását antagonizálta az 5HT szintet csökkentő hatását nem (10. ábra).

A monoaminok szintjében fellépő változások mechanizmusának feltáráshoz a ciklikus 3',5'-AMP és ciklikus 3',5'-GMP változásait is vizsgáltuk met-enkefalin és morfin kezelés után. A met-enkefalin 45%-kal csökkentette a cAMP szintet és 68%-kal növelte a cGMP szintet. A hatás dózis-függő volt (11. ábra). A morfin hasonló hatású volt, 43%-kal csökkentette a cAMP szintet, és 74%-kal növelte a cGMP szintet *Anodonta* cerebrális ganglionjában. A ganglion naloxonnal való előkezelése kivédte mind a met-enkefalin, mind a morfin ciklikus nukleotid szintre kifejtett hatását (11. ábra). A naloxon az együttesen adott met-enkefalin és morfin hatását is antagonizálta a ciklikus nukleotid szint modulálásában. A ciklikus nukleotidok szintjére spontán fluktuáció nem volt jellemző [37].



10. ábra. Met-enkefalin és morfin hatása, valamint a hatás naloxonnal való antagonizálhatósága *Anodonta cygnea* cerebrális ganglionjának monoamin szintjére

Fig. 10. Effects of met-enkephalin and morphine on the monoamine levels in the cerebral ganglia of *Anodonta cygnea* and their inhibition by naloxone



11. ábra. A met-enkefalin és morfin hatása *Anodonta cygnea* cerebrális ganglionjának ciklikus nukleotid szintjére, valamint a hatás naloxonnal való antagonizálhatósága

Fig. 11. Effects of met-enkephalin and morphine on the cyclic nucleotide levels in the cerebral ganglia of *Anodonta cygnea* and their inhibition by naloxone

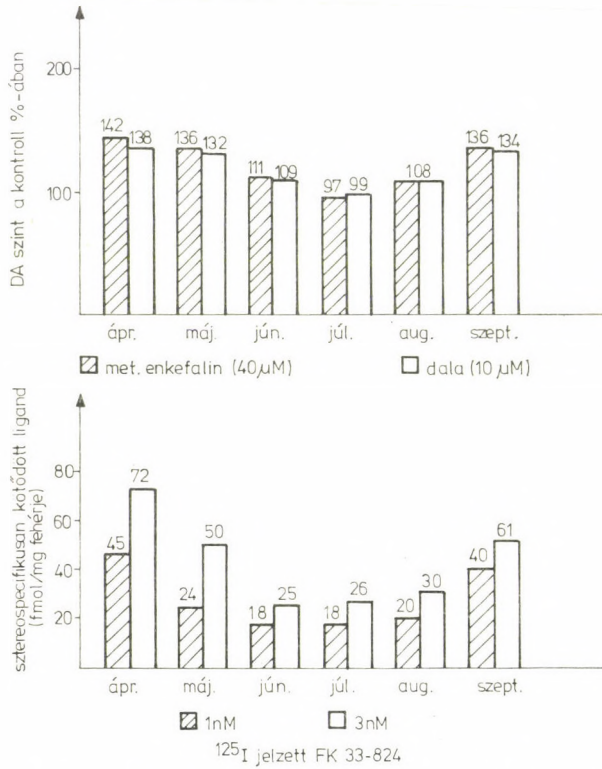
Opiát receptor kötődés gerinctelenekben

$1,5 \times 10^{-9}$ M ^3H -naloxont használva levallorphan (10^{-7} , 10^{-6} vagy 10^{-5} M) jelenlétében a nem-specifikus kötődést 4-szer magasabbnak találtuk az *Anodonta* és *Helix* központi idegrendszerében, mint a patkány agyban [22, 28]. A specifikus kötődés a totál kötődésnek mintegy 10%-át teszi ki és a receptor

denzitás nem haladja meg a 0,5 fmoles ^3H -naloxon kötés/mg fehérje értéket. Ugyanakkor egy rovar, a *Locusta*, központi idegrendszerében a specifikus receptor kötődés elérheti a totál kötődés 40%-át is [37].

A sztereospecifikus enkefalin kötődésének szezonális változása

STEFANO és mtsai [43] az opiát peptidek dopamin-szint moduláló hatásában szezonális ingadozást találtak. A met-enkefalin és DALA tavasszal és ősszel növelték a DA szintet, de nyáron nem. Az enkefalin sztereospecifikus kötődése is hasonló szezonális változást mutatott, tavasszal és ősszel volt a legmagasabb és nyáron a legalacsonyabb (12. ábra).



12. ábra. A dopamin-szint valamint az opiát-receptorok sztereospecifikus kötődésének szezonális ingadozása *Mytilus edulis* cerebrális ganglionjában [43]

Fig. 12. Seasonal changes in the level of dopamine and the stereospecific binding of opiate receptors in the cerebral ganglia of *Mytilus edulis* [43]

Áprilisban, májusban és szeptemberben a met-enkefalin (4×10^{-5} M) és DALA (10^{-5} M) 40% körüli DA szint emelkedést eredményez 60 perccel a kezelést követően. Június, július és augusztusban ugyanezek az opiát peptid koncentrációk nem változtatják meg szignifikánsan az endogén dopamin-szintet. Ebben a periódusban a DALA és met-enkefalin nagy dózisa is hatástalanok voltak [43, 45].

A ^{125}J -jelzett FK 33—824 (a met-enkefalin met-sulfoxid-carbinol származéka, ami a met-enkefalin hatékony agonistája) sztereospecifikus kötődése is szezonális variációt mutatott (12. ábra). A kötődés minden hónapban sztereospecifikus, telíthető és reverzibilis volt. A maximális kötődést áprilisban mértük ($2,5 \times 10^{-13}$ mol receptor/mg fehérje, 10^{-8} M FK 33—824 adásakor), amely már májusban 30%-kal csökkent (12. ábra). A nyári hónapokban (június, július, augusztus) 33%-os volt a csökkenés az áprilisi értékhez viszonyítva. Az opiát receptorok érzékenységében megfigyelt szezonális változások is közbejátszhatnak abban, hogy mások [21, 22] nem tudtak Molluskákban sztereospecifikus kötődést kimérni. A szezonális változások oka még nem ismert.

A Molluskákon végzett kötődéses vizsgálatok alapján a gerincesekéhez hasonló jellegzetességekkel bíró opiát receptorok jelenlétét gerinctelenekben is igazoltnak tekinthetjük. A Molluskákban is kétfajta opiát receptor van [45]. SIMANTOV és SNYDER [29] írták le a met-enkefalin magas és alacsony affinitású kötőhelyeit gerincesekben. Úgy vélik, a met-enkefalin a két receptor közül bármelyikkel reakcióba léphet, vagy ugyanazon receptor eltérő konformációja biztosíthatja az eltérő reakciót [51]. A kettes számú opiát receptor viszonylag naloxon rezisztens gerincesekben és Molluskákban egyaránt [45].

Morfin tolerancia vizsgálata *Helix pomatia* viselkedésében

A morfin többszörös bevitelére fellépő viselkedési változásokat is vizsgáltuk *Helix pomatia* aktív egyedein. E faj alkalmas ilyen jellegű vizsgálatokra, mivel lokomóciós aktivitása, behúzódsái, megfordulási és taktilis ingerre megjelenő reflexei könnyen nyomon követhetők és mérhetők.

E kísérletekben a ganglionok környékére subcutan $50 \mu\text{l}$ morfint fecskendeztünk be, a kettős kontroll nem kezelt és fiziológias oldattal kezelt egyedekből állt. A kezelt és nem kezelt állatok rigiditását, immobilizálódását megfordulási viselkedését és a bőr taktilis ingerlésre fellépő reakcióit kísértük nyomon 5 napon át. A megfigyelő nem tudta, melyik állatcsoport kapott morfiomot. A morfin kezelést 6 óránként ismételtük 5 napon át.

A morfin subcutan bevitele *Helix*-ben dózis függően növelte az állatok rigiditását és immobilitását (I. táblázat). Megszűnt a válasz a bőr taktilis inger-

I. táblázat

Helix pomatia viselkedési reakciói morfin különböző dózisaira, valamint naloxon kezelésre
Table 1. Behavioral reactions of *Helix pomatia* to various doses of morphine and naloxone

Kezelés	Dózis (μM)	N	Immobilizáció ideje (perc)	Testhelyzet korrekció	Rigiditás 1—3
Fiziológias oldat	—	15	0	+	0
Morfin	0,1	5	0	+	0
Morfin	1,0	4	25	—	2—0,3
Morfin	3,0	4	180	—	3
Morfin	10,0	4	198	—	3
Morfin + Naloxon	3+1	4	15	—	1
Morfin + Naloxon	3+10	4	0	+	0

Megjegyzés: Mínusz jelet az elfordított helyzetben maradó állatok kaptak. A rigiditás értékét tetszőleges mértékegységben adjuk meg, legerősebb a 3 (lásd [46]).

lésére, majd a lábizom elernyed, kb. 30 perccel a morfin kezelést követően. Ebben az állapotban maradt az állat 2–3,5 órán át. Ha az állatot nem háborgatják, ebben az állapotban mozdulatlan marad, ha megérintik, lassú, helyi kontrakció figyelhető meg, de azt nem lehet a kezeletlen állat behúzódnási reakciójához hasonlítani.

A másik jellegzetes reakció az állat helyzetével kapcsolatos. A nem kezelt állatok, ha oldalra vagy hátra fordítjuk azonnal megpróbálják a normális testhelyzetet felvenni (megfordulási vagy testhelyzet korrigáló reflex). Ugyanakkor a morfin kezelt állatok oldalra fordítás után diszkoordinált mozgásokat végeznek a helyes testtartás felvétele helyett.

Naloxon előkezelés, vagy morfinnal egyidejű bevitele, alkalmas a morfin viselkedésre kifejtett hatásainak megszüntetésére. Egymagában a naloxon nem váltott ki viselkedés választ *Helix pomatia*-n.

Több napon át folytatódó morfin kezelés (6 óránként) csökkenti az állat mozdulatlanságban töltött idejét (II. táblázat), az állatok hiperaktívvá válnak. Hosszas morfin kezelés hatására az állatok nem kerülnek egyáltalán nyugalmi állapotba.

II. táblázat

Hosszas morfin kezelés hatása *Helix pomatia* aktivitására

Table 2. Effect of prolonged morphine treatment on the activity of *Helix pomatia*

Nap/inter- vallum	Dózis	N	Az az idő %, melyet bizonyos fajta aktivitásban tölt az állat (6 órás megfigyelési periódus alatt)								
			Immobilizált			Aktív			Nyugalom		
			K	F	M	K	F	M	K	F	M
1. 9 ^h –15 ^h 15 ^h –21 ^h	3	4	—	—	55	100	100	45	—	X	—
	3	4	—	—	45	100	91	55	—	9	—
2. 9 ^h –15 ^h 15 ^h –21 ^h	3	4	—X	—	25	66	16	68	34	84	7
	3	4	—	—	16	39	21	84	61	79	—
3. 9 ^h –15 ^h 15 ^h –21 ^h	3	4	—	—	2	5	65	97	95	35	—
	3	4	—	—	2	5	63	98	95	37	—
4. 9 ^h –15 ^h	3	4	—	—X	1	—	41	99	100	59	—
5. 9 ^h –15 ^h 15 ^h –21 ^h 21 ^h –3 ^h	10	4	—	—	31	—	35	69	100	65	—
	10	4	—	—	12	—	27	88	100	73	—
	10	4	—	—	2	10	30	98	90	70	—

Megjegyzés: Az állatokat 4 napon át folyamatosan megfigyeltük. Az egyes mozgásformákkal töltött időt 6 órás periódus %-ában fejeztük ki a morfinkezelést (M), vagy fiziológias oldatot követően (F). K = kezeletlen kontroll. A morfin kezelést 6 óránként megismételtük [46].

A morfin kezelés 4. napján az állatokon a tolerancia jelei kezdtek mutatkozni (3 μ M morfin adaghoz). Ekkor nagyobb dózis hatására (10 μ M morfin) az állatok nem kerültek nyugalomba, hanem hiperaktívvá váltak néhány órára, majd újra aktiválhatók voltak újabb 10 μ M adag morfinnal, de ekkor már csak 20 perces időtartamra. A morfin adást minden esetben hiperaktív fázis követte. A taktilis ingerre is megszűnt a válasz a kezelés 4. napján. A naloxon kivédte a morfin immobilizációt kiváltó hatását. A testhelyzet korri-

gáláson és taktilis reflexen is hatékony volt a naloxon, kivédte a morfin hatását. A morfin hatására hiperaktívvá vált állatokat a naloxon immobilizálta, de csak a csigahéjhoz közel húzódtak be, felületesen (III. táblázat).

III. táblázat

Helix pomatia testhelyzet korrigáló képességének változása morfin-kezelést követően

Table 3. The righting reflex of *Helix pomatia* after treatment with morphine

Nap	Idő (min)		
	Fiziológias oldat	Morfin	Kezeletlen kontroll
1.	0 : 20	3 : 45	0 ; 19
2.	0 : 21	3 : 00	0 : 18
3.	0 : 18	0 : 58	0 : 18
4.	0 : 21	0 : 40	0 : 18

Megjegyzés: Az állatokat 9 órakor kezeltük morfinnal, s a tesztelés 4 órával később történt. Az állatokat oldal-helyzetből való testhelyzet korrigálásra teszteltük [46].

Adataink az irodalomban először igazolták morfin tolerancia kialakulását gerinctelen fajon [46]. A tolerancia az a jelenség, amikor egy anyag adott dózisa ismételt adásra kisebb választ vált ki, mint első bevételre. Ez tulajdonképpen az adaptáció egy formája.

Émlősökben az opioid peptidek immobilizációt, a testhelyzet szabályozásának károsodását és nagyfokú izomrigiditást váltanak ki [11, 16]. Hasonló viselkedési változások figyelhetők meg *Helix pomatián* tartós morfin kezelésre. A tolerancia a 4–5. napra alakult ki *Helix*-ben, de ezt nagyobb morfin adagokkal meg lehetett szüntetni, bár a hozzászokás ekkor már gyorsabban alakult ki újra.

Az immobilizációt követő hiperaktivitás ideje tartós morfin kezelésben *Helix*-en egyre nőtt. Patkányokban ugyanilyen kétfázisos viselkedést írtak le morfin kezelést követően [4]. E hatást is kivédi a naloxon.

Az eredmények igazolják, hogy morfin tolerancia kialakítható gerinctelen állatokban. A lokomóciós aktivitás modulációjában vagy kiváltásában részt vesznek az endogén opioidok *Helix pomatián*.

Megbeszélés

Az irodalomból ismert, hogy gerinctelenek központi idegrendszere tartalmaz biológiailag aktív peptideket, s ezek az idegi aktivitást képesek befolyásolni [7]. Az utóbbi években immuncitológiai módszerekkel rovarok garat körüli ganglionjának neuroszekréciós sejtjeiben a vazopresszin és neurofizin mellett α -endorfin is kimutattak [24, 25]. ZIPSER [54] *Hirudo medicinalis* peptiderg neuronjaiban azonosított enkefalint. *Lumbricus terrestris* agyi ganglionjában enkefalin és β -endorfin jelenlétét igazolták immuncitológiai módszerekkel [2, 24]. Amőbákban az opiát peptidek Ca-mozgást, s ezen keresztül pinocitózist gátló szerepét írták le, ahol a met-enkefalin, morfin és kodein a Ca^{2+} -mozgás

gátlásával potencirozza a pinocitózist. A fenti effektusokat a naloxon kivédi [14]. Mindezek az adatok azt mutatják, hogy nem lehet az endogén opiát mechanizmusok jelenlétét és működését a gerincesekhez kötni, ellenkezőleg, az opiátok egysejtűektől kezdve részesei a kémiai szabályozásnak.

Saját korábbi és jelen vizsgálataink igazolták, hogy a met-enkefalin és morfin növeli egy dopaminerg és egy peptiderg neuron tüzelési frekvenciáját [10, 37, 44]. A naloxon éppúgy, mint *Mytilus* fajban [38] és gerincesekben [12] specifikusan blokkolja *Helix* központi neuronjain a met-enkefalin és morfin hatását. Az opiát receptorok naloxonnal történő blokkolhatósága igazolja, hogy molluskák idegsejtjeiben opiát-mechanizmusok működnek.

Az a megfigyelésünk, hogy a naloxon antagonizálja a dopamin gátló hatását a dopaminerg RPa2 neuronon, de nem befolyásolja a DA serkentő hatását a neoroszekreációs sejten két szempontból is figyelmet érdemel:

1. Mivel a met-enkefalin megváltoztatja a DA szintet is, ezért ha a rendszerben van reciprok mechanizmus, a DA képes modulálni az endogén peptid receptorokat.

2. A naloxon a dopamin és met-enkefalin hatását egyaránt blokkolja a dopamin-tartalmú RPa2 neuronon, bár e sejten a met-enkefalin rövid gátlás után serkenti, a DA pedig egyértelműen gátolja.

Ezen adatok megengedik azt a feltételezést, hogy a naloxon specificitás a DA-típusú receptorokra is kiterjed. A vizsgálatok szerint Molluskákban is két DA receptor van, egy naloxon-szenzitív és egy naloxontól független, a gerincesekhez hasonlóan [4].

*Helix pomatia*n ERDÉLYI és mtsai [6] a leu-enkefalin hatását vizsgálva a legtöbb neuront érzéketlennek találták leu-enkefalinra és naloxonra egyaránt. Egyes, nem identifikált sejteken 2–6 mV-os hiperpolarizációt regisztráltak leu-enkefalin hatására, s ezt a naloxon antagonizálta. Az ACh által létrehozott K-függő hiperpolarizációt a leu-enkefalin csökkentette, s ez utóbbi hatást is megszüntette a naloxon. Egyes sejteken a leu-enkefalint és naloxont agonistának találták. A szerzők szerint az a tény, hogy a leu-enkefalin hiperpolarizál egyes sejteket, míg másokon gátolja a lassú H-választ azt mutatja, hogy alacsony az opioid receptorok érzékenysége és sűrűsége csiga neuron membránban. ERDÉLYI és mtsai [6] adatainál azonban figyelembe kell venni, hogy a leu-enkefalin kevésbé, vagy egyáltalán nem hatásos opiát, és a metionin/leucin-enkefalin előfordulási aránya gerincesekben is 5/1 [17], így a leu-enkefalin hatásának vizsgálata *Helix pomatia* központi idegrendszerében nem elégséges az opiát receptorok jelenlétének igazolásához vagy kizárásához. A két opiát hatásában fellelhető különbségek eltérő sebességű lebomlásukkal is kapcsolatban lehetnek.

Aplysia kolinerg szinapszisaiban a morfin posztszinaptikus receptor gátló hatását írták le, melyet a naloxon nem antagonizál [52]. Mások a morfin preszinaptikus, transzmitter-felszabadulást moduláló hatásáról számoltak be *Aplysia* neuronokon [49]. Nem identifikált *Helix* neuronokon a morfin gátló hatását a naloxon kivédi [34]. *Helix pomatia* Br-neuronján az oxitocin, lys-vazopresszin és leu-enkefalin csoportos kisüléseket váltott ki, vagy növelte azok gyakoriságát, mely hatások ciklikus nukleotidok közreműködésével valósulnak meg [20]. Korábban VADÁSZ és STEFANO [44] igazolták a morfin és met-enkefalin burst-frekvenciát fokozó hatását *Helix* Br-neuronon, ill. azok naloxonnal való antagonizálhatóságát.

A vizsgálatok igazolták, hogy a morfin és enkefalin képes szabályozni a dopamin anyagszere ciklusát Molluskákban és gerincesekben egyaránt [27, 38,

42, 45], s e hatást mindkét törzsben naloxon antagonizálja. Az 5HT szint befolyásolása nem-specifikus receptorok aktiválásának következménye, amit az is igazol, hogy az RPa2 sejten az 5HT indukálta serkentést naloxon nem befolyásolja. Gerinceseken azonban feltételezik az opiát mechanizmusok triptaminerg regulációját, mivel az 5HT felvételt bénító anyag, az indalpin csökkenti a morfin és petidin fájdalomcsökkentő hatását, s ez nem a morfin receptorhoz való kötődésének megváltoztatására, vagy a receptorokra való hatásra épül [50].

A metionin-enkefalin és morfin csökkenti a cAMP-szintet és növelik a cGMP-szintet *Anodonta* központi idegrendszerében; mindkét hatást antagonizálja a naloxon. A második messenger részvétele peptid hatások megvalósulásában gerinceseken sem tisztázott egyértelműen.

Gerinctelenek központi idegrendszerében az enkefalin aktivitás és az opiát receptor kötés egyaránt bizonyítottnak tekinthető, bár Molluskákban a sztereospecifikus kötődés alacsonyabb, mint rovarokban. Immuncitokémiai módszerrel azonban férgékben, piócában, *Locusta* és *Bombyx* agyában specifikus neuroszekréción sejtet találtak, melyek β -endorfint választanak ki [2, 24, 25, 54]. A Molluskákban mért alacsony sztereospecifikusság az alkalmazott módszer elégtelenségét is tükrözheti. Ennek ellenére az általunk mért sztereospecifikus kötődés 25-ször magasabb a SIMANTOV és mtsai [28] által Molluskákra közölt értéknél. SIMANTOV és mtsai [28] rovarokban és Molluskákban egyformán alacsony opiát receptor sűrűséget írtak le, de adataink szerint rovarokban ez az érték magasabb.

Adataink szerint Molluskák központi idegrendszerében gerincesekben leírt tulajdonságú opiát receptorok vannak jelen és funkcionálnak. Adataink alapján feltételezhető, hogy az endogén opiátok hasonló szerephez jutnak gerinctelenekben is, mint gerincesekben [19, 33], vagyis a peptid hormonok és katekolaminok kölcsönösen szabályozhatják egymás felszabadulását. A szabályozás azonosságából következik, hogy az opioid peptidek emlékezési folyamatokban játszott szerepe is sejt szinten vizsgálható Molluskák központi idegrendszerében. Az utóbbi időben igazolták, hogy nemcsak a vazopresszin és oxitocin vesz részt az emlékezés kémiai modulációjában, de az opioid peptidek is [8, 47]. A morfin toleranciát az emlékezet sajátos formájának tekintik, melyet a vazopresszin facilitál [3, 5]. A tolerancia kialakulásának mechanizmusai is direkt vizsgálhatók Molluskák opiát-érzékeny neuronjain.

Összefoglalás

Vizsgálataink igazolták, hogy Molluskák központi idegrendszerében a gerincesek agyában feltárt opiát receptorokhoz hasonló tulajdonságú opiát receptorok és opiát-érzékenység van jelen.

1. *Helix pomatia* központi idegrendszerében a met-enkefalin és morfin növeli a dopaminerg (RPa2) és neuroszekréción (NS) neuronok tüzelési frekvenciáját, s e hatást a naloxon antagonizálja. A szív ingerlésével RPa2 sejten kiváltott gátló választ morfin kezelés megszünteti, s a naloxon a morfin hatását e reflex-válaszban is antagonizálja.

2. A naloxon blokkolja a dopamin gátló hatását az RPa2 sejten, de nem blokkolja a dopamin serkentő hatását a neuroszekréción sejtet. A dopamin receptorok közül csak az egyik mutat naloxon-érzékenységet. Az 5HT receptorok nem vesznek részt az endogén opiátok hatásában Molluskákban.

3. A met-enkefalin és morfin növeli a dopamin szintet *Anodonta cygnea* cerebrális ganglionjában. Ugyanakkor mindkét agens csökkenti a cAMP, és növeli a cGMP szintet. E hatás is bénítható naloxonnal.

4. *Anodonta* és *Helix* központi idegrendszerében a nem-specifikus naloxon kötődés 4-szer magasabb, mint a patkány agyban, de ennek csak 10%-a sztereo-specifikus, s a receptor sűrűség viszonylag alacsony. A met-enkefalin DA szint növelő hatása és a sztereo-specifikus kötődés Molluskák központi idegrendszerében szezonális ingadozást mutat. Legalacsonyabb értéket a nyári hónapokban lehet találni.

5. *Helix pomatia* a morfin több napon át történő bevitelére tolerancia kialakításával reagál, mely párhuzamba állítható gerincesek hasonló viselkedésével.

6. A Molluskákban kimutatott opiát receptorok felhasználhatók a morfin tolerancia sejt-szintű mechanizmusainak feltárására, továbbá az opioid peptidok és neurotranszmitterek kapcsolatának tisztázására.

IRODALOM

1. ADLER, M. W. (1980) Opioid peptides. *Life Sci.*, **26**, 497–510.
2. ALUMETS, J., HAKANSON, R., SUNDLER, F. and THORELL, J. (1979) Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and β -endorphin in the earthworm. *Nature*, **279**, 805.
3. COLLIER, H. O. J. (1980) Cellular site of opiate dependence. *Nature*, **283**, 625–629.
4. CREESE, J., BURT, D. R. and SNEYDER, S. H. (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*, **197**, 596–598.
5. ELCHISAK, M. A. and ROSENCRANS, J. A. (1979) Development of morphine tolerance and physical dependence in rats depleted of brain catecholamines by 6-hydroxy-dopamine. *Neuropharmacol.*, **18**, 175–182.
6. ERDÉLYI, L., JOÓ, F. and SOÓS, J. (1980) Effects of leu-enkephalin on certain neurones in snail, *Helix pomatia* L. In: AJMONE MARSAN, C. and TRACZYK, W. Z. (eds.): *Neuropeptides and neural transmission*. Raven Press, New York, 271–280.
7. FRONTALI, N. and GAINER, H. (1977) Peptides in invertebrate nervous system. In: GAINER, H. (ed.): *Peptides in Neurobiology*. Plenum Press, New York, 259–285.
8. GALLAGHER, M. and KAPP, B. S. (1978) Manipulation of opiate activity in the amygdala alters memory processes. *Life Sci.*, **23**, 1973–1978.
9. GOLDSTEIN, A. (1974) Opiate receptors. *Life Sci.*, **14**, 615–620.
10. HIRIPI, L., S.-RÓZSA, K. and STEFANO, G. B. (1980) Opiate receptors in the brain of molluscs (*Anodonta cygnea*, *Helix pomatia*). In: FÜRST, S. (ed.): *Opiate receptors and the neurochemical correlates in pain*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 59–66.
11. HONG, J. S., YANG, H. Y. T., FRATTA, W. and COSTA, E. (1977) Determination of methionine enkephalin in discrete region of rat brain. *Brain Res.*, **134**, 383–386.
12. HUGHES, J. (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.*, **88**, 295–308.
13. HUGHES, J., BEAUMONT, A., FUENTES, J. A., MALFROY, B. and UNSWORTH, C. (1975) Opioid peptides: Aspects of their origin, release and metabolism. *J. exp. Biol.*, **89**, 239–255.
14. JOSEFSSON, J. O. and JOHANSSON, P. (1979) Naloxone-reversible effect of opioids on pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Nature*, **282**, 78–80.
15. KOSTERLITZ, H. W. and PATERSON, S. J. (1980) Characterization of opioid receptors in nervous tissue. *Proc. R. Soc. Lond.*, **B210**, 113–122.
16. KUJAR, M. J., PERT, C. B. and SNYDER, S. H. (1973) Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, **245**, 447–450.
17. LARSSON, L. J., CHILDERS, S. and SNYDER, S. H. (1979) Met- and leu-enkephalin immunoreactivity in separate neurones. *Nature*, **282**, 407–410.
18. MENG, K. (1958) 5-Hydroxytryptamine und Acetylcholine als Wirkungsantagonisten beim *Helix*-Herzen. *Naturwissenschaften*, **19**, 470–481.
19. NORTH, A. R. (1979) Opiates, opioid peptides and single neurones. *Life Sci.*, **24**, 1527–1546.

20. OSYPOVSKY, S. A. and POLESSKAYA, M. M. (1981) Reaction of identified neurone of *Helix pomatia* to the application of peptides, transmitters, prostaglandins and cyclic nucleotides. *Neurophysiol. (Kiev)*, **13**, 80—87.
21. PERT, C. B. and SNYDER, S. H. (1973) Properties of opiate receptor binding in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**, 2243—2247.
22. PERT, C. B., APOSHIAN, D. and SNYDER, S. H. (1974) Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.*, **75**, 356—361.
23. REGGIANI, A., BATTAINI, F., KOBAYASHI, H., SPANO, P. and TRABUCCHI, M. (1980) Genotype-dependent sensitivity to morphine: Role of different opiate receptor populations. *Brain Res.*, **189**, 289—294.
24. RÉMY, C. and DUBOIS, M. P. (1979) α -Endorphin-like cells in the infra-oesophageal ganglions of the earthworm *Dendrobaena subrubicunda* and their immunocytochemical localization. *Experientia*, **35**, 137—138.
25. RÉMY, C., GIRARDIE, J. and DUBOIS, M. P. (1979) Vertebrate neuropeptide-like substances in the suboesophageal ganglion of two insects: *Locusta migratoria* R. F. (Orthoptera) and *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). Immunocytochemical investigation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **37**, 93—100.
26. SHAKAROV, D. A. and SALÁNKI, J. (1969) Physiological and pharmacological identification of neurons in the central nervous system of *Helix pomatia*. *Acta Physiol. Acad. Sci. hung.*, **35**, 19—30.
27. SATOH, M., ZIEGLANSBERGER, W. and HERZ, A. (1975) Interaction between morphine and putative excitatory neurotransmitters in cortical neurons on native and tolerant rats. *Life Sci.*, **17**, 75—80.
28. SIMANTOV, R., GOODMAN, R., APOSHIAN, D. and SNYDER, S. H. (1976) Phylogenetic distribution of a morphine-like peptide enkephalin. *Brain Res.*, **111**, 204—211.
29. SIMANTOV, R. and SNYDER, S. H. (1976) Isolation and structure identification of a morphine-like peptide „enkephalin“ in bovine brain. *Life Sci.*, **18**, 781—788.
30. SIMON, E., HILLER, J. and EDELMAN, J. M. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^3H -etorphine. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**, 1947—1949.
31. SLOTKIN, T. A. (1981) An intracellular opiate receptor. *Life Sci.*, **27**, 1975—1978.
32. SNYDER, S. H. and SIMANTOV, R. (1977) The opiate receptor and opioid peptides. *J. Neurochem.*, **28**, 13—20.
33. SNYDER, S. H. (1980) Brain peptides as neurotransmitters. *Science*, **209**, 976—983.
34. SOLNTSEVA, E. J. and BULAEV, V. M. (1979) Morphine and bradikinin action on the electrical activity of *Helix* neurons. *Neurophysiol. (Kiev)*, **11**, 89—91.
35. S.-RÓZSA, K. and SALÁNKI, J. (1973) Single neurone responses to tactile stimulation of heart in the snail, *Helix pomatia* L. *J. Comp. Physiol.*, **84**, 267—279.
36. S.-RÓZSA, K. (1976) Neuronal network underlying the regulation of heart beat in *Helix pomatia* L. In: SALÁNKI, J. (ed.): *Neurobiology of invertebrates, Gastropoda brain*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 597—613.
37. S.-RÓZSA, K., HIRIPI, L. and STEFANO, G. B. (1979) Pharmacological and biochemical properties of opiate receptors in Molluscs. In: VIZI, E. S. and WOLLEMAN, M. (eds.): *Aminergic and peptidergic receptors*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 115—131.
38. STEFANO, G. B., CATAPANE, E. I. and AIELLO, E. (1976) Dopaminergic agents: Influence on serotonin in the molluscan nervous system. *Science*, **194**, 539—541.
39. STEFANO, G. B. and CATAPANE, E. I. (1978) Methionine enkephalin and leucine enkephalin increase dopamine in the CNS of *Mytilus edulis*. *Soc. Neurosci.*, **4**, 892.
40. STEFANO, G. B. and CATAPANE, E. I. (1979) Enkephalins increase dopamine levels in the CNS of a marine mollusc. *Life Sci.*, **24**, 1617—1622.
41. STEFANO, G. B. and HIRIPI, L. (1979) Methionine enkephalin and morphine alter monoamine and cyclic nucleotide levels in the cerebral ganglia of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Life Sci.*, **25**, 291—298.
42. STEFANO, G. B., KREAM, R. M. and ZUKIN, R. S. (1980) Demonstration of stereospecific opiate binding in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Brain Res.*, **181**, 440—445.
43. STEFANO, G. B., KREAM, R. M., ZUKIN, R. S. and CATAPANE, E. J. (1980) Seasonal variation of stereospecific enkephalin binding and pharmacological activity in marine molluscs nervous tissue. In: S.-RÓZSA K. (ed.): *Neurotransmitters in Invertebrates*. Pergamon Press—Akadémiai Kiadó, Budapest, 453—458.
44. STEFANO, G. B., VADÁSZ, I. and HIRIPI, L. (1980) Methionine enkephalin inhibits the bursting activity of the Br-type neuron in *Helix pomatia*. *Experientia*, **36**, 666—667.
45. STEFANO, G. B. (1980) Opiates and neuroactive peptides: Binding characteristics and interactions with dopamine stimulated cyclase in the pedal ganglia of *Mytilus edulis*.

- In: S.-RÓZSA, K. (ed.): *Neurotransmitters in Invertebrates*. Pergamon Press—Akadémiai Kiadó, Budapest, 423—452.
46. STEFANO, G. B., HIRIPI, L., S.-RÓZSA, K. and SALÁNKI, J. (1980) Behavioural effects of morphine on the land snail *Helix pomatia*. Demonstration of tolerance. In: SALÁNKI, J. (ed.): *Neurobiology of Invertebrates*. Pergamon Press—Akadémiai Kiadó, Budapest, 285—293.
 47. STEIN, L. and BELLUZZI, J. D. (1979) Brain endorphins: Possible role in reward and memory formation. *Fed. Proc.*, **38**, 2468—2472.
 48. TERENIUS, L. (1974) A rapid assay of affinity for the narcotic receptor in rat brain: Application to methadone analogs. *Acta Pharmac. Toxicol.*, **34**, 88—91.
 49. TREMBLAY, J. P., SCHLAPFER, W. T., WOODSON, P. B. J. and BARONDES, S. H. (1974) Morphine and related compounds: Evidence that they decrease available neurotransmitters in *Aplysia californica*. *Brain Res.*, **81**, 107—118.
 50. UZAN, A., KABOUCHE, M., RATAUD, J. and LEFUR, G. (1980) Pharmacological evidence of a possible tryptaminergic regulation of opiate receptors by using indalpine, a selective 5-HT uptake inhibitor. *Neuropharmacol.*, **19**, 1075—1079.
 51. WALCZAK, S. A., WILKENING, D. and MAKMAN, M. H. (1979) Interaction of morphine, etorphine and enkephalins with dopamine-stimulated adenylate cyclase of monkey amygdala. *Brain Res.*, **160**, 105—116.
 52. WAZIRI, R. (1976) Morphine effects on cholinergic synaptic transmission in *Aplysia*: Evidence for receptor blockade. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55C**, 95—102.
 53. WILLIAMS, J. T. and NORTH, R. A. (1979) Effect of endorphins on single myenteric neurons. *Brain Res.*, **165**, 57—65.
 54. ZIPSER, B. (1980) Identification of specific leech neurones immunoreactive to enkephalin. *Nature*, **283**, 857—858.

DISTRIBUTION AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF OPIATE RECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF MOLLUSCS

Katalin S.-Rózsa, László Hiripi and G. B. Stefano*

Biological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Tihany, Hungary
and *East Coast Neuroscience Foundation Inc., Northport NY 11768, USA

The investigations demonstrated that opiate sensitivity and opiate receptors are present at the central nervous system of molluscs and have similar pharmacological properties as reported of mammals.

1. In the central nervous system of *Helix pomatia* met-enkephalin and morphine accelerated the firing frequency of the dopaminergic (RPa2) and neurosecretory (NS) cells. The effect of both agents was blocked by naloxone. The inhibitory effect evoked by heart stimulation on the cell RPa2 was blocked with morphine treatment and naloxone eliminated the effect of morphine in this reflex, too.

2. Naloxone blocked the inhibitory effect caused by dopamine on the RPa2 cell but failed to alter the excitatory effect caused by dopamine on the neurosecretory cell. Out of the dopamine receptors only one showed naloxone sensitivity. 5HT receptors were not involved in the effects of endogenous opiates in molluscs.

3. In the cerebral ganglia of *Anodonta cygnea* met-enkephalin and morphine increased the dopamine level. Both agents increased the levels of cGMP and decreased the levels of cAMP. Their effects on dopamine and cyclic nucleotide levels were blocked by naloxone.

4. In the central nervous system of *Helix* and *Anodonta* the non-specific binding of ³H-naloxone in the presence of levallorphan was 4 times higher than in the rat brain, however, only 10 per cent of the binding proved to be stereospecific, and the density of the receptors was comparatively low. The increase in the level of dopamine on the influence of met-enkephalin and the stereospecific binding showed seasonal variations in the central nervous system of molluscs. The lowest values were found in summer.

5. *Helix pomatia* can develop tolerance to repeated giving of morphine, which can be taken as an analogy of the similar behaviour of mammals.

6. The opiate receptors demonstrated in molluscs can be used for studying the cellular mechanisms of morphine tolerance, as well as for the investigation of the connections between opioid peptides and neurotransmitters.

L-ASZKORBINSAVVAL GÁTOLT SPONTÁN N-METILEZÉSI ÉS N-FORMILEZÉSI REAKCIÓK L-LIZIN ÉS FORMALDEHID KÖZÖTT ÉS ENNEK BIOKÉMIAI VONATKOZÁSAI

* TRÉZL LAJOS, * RUSZNÁK ISTVÁN, ** TYIHÁK ERNŐ és *** SZARVAS TIBOR

* Budapesti Műszaki Egyetem Szerves Kémiai Technológiai Tanszéke, Budapest;

** Gyógynövény Kutató Intézet, Budakalász és *** Magyar Tudományos Akadémia
Izotóp Intézete, Budapest

Beérkezett: 1981. október 15-én

Kulcsszavak: L-lizin, spontán metilezés, formaldehid, L-aszkorbinsavas gátlás, etilén-glikol

Bevezetés

Az utóbbi években többször beszámoltunk arról, hogy az L-lizin és formaldehid között szimultán spontán metilezési és formilezési reakció játszódik le. A reakcióban már szobahőmérsékleten biológiai (enzimatis) vagy kémiai (reduktív) katalízis nélkül is N-metilezett és N-formilezett lizinek képződnek, amelyeket izoláltunk a reakcióelegyből és megfelelően azonosítottunk [28, 32].

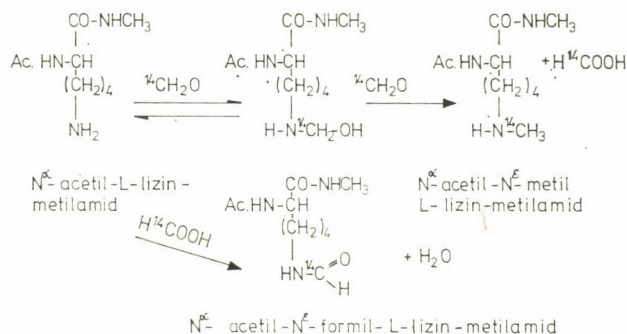
A reakció az ESCHWEILER által már 1905-ben publikált reakció határese-tének tekinthető. Míg azonban ESCHWEILER [2] N-metilezett alifás aminok formaldehiddel történő előállításakor nagy nyomást és nagy hőmérsékletet (120–160 °C) alkalmazott, ugyanakkor ez a reakció L-lizinnel spontán és már szoba-hőmérsékleten is lejátszódik.

A spontán reakció jelentőségét fokozza, hogy a fehérjékben a peptidkötés-ben levő L-lizinnel is lejátszódik, mivel a lizin extra ε-amino csoportja közel olyan erős bázis, mint az alifás aminok. A peptidkötésben levő L-lizint blokkolt lizinnel, N^ε-acetyl-L-lizin-metilamiddel modelleztük [32].

Jelzett formaldehiddel végzett vizsgálataink (¹⁴CH₂O, C³H₂O) azt is igazolták, hogy a reakció L-lizin, ill. blokkolt lizin esetében már nagyon kis formaldehid koncentrációval is végbemegy (0,001%-os formaldehid -¹⁴C oldat) és már 5 °C-os hőmérsékleten is.

A reakcióban mindig szimultán képződött a jelzett N^ε-metil, ill. N^ε-formil csoport [28].

A reakció skémája a következő:



Mivel a biológiai rendszerekben, mind szabad mind peptidkötésben levő lizinnel és endogén formaldehiddel is számolni kell, a fenti reakciók *in vivo* is játszódhatnak és nagy biológiai aktivitású N^ε-metilezett lizinek keletkezhetnek. Közülük az N^ε-trimetil-L-lizin a legaktívabb; sejtszaporodást fokozó hatása van [21, 30].

Ezek a vegyületek enzimátikus úton transzmetilezéssel is keletkezhetnek S-adenozil-L-metioninnal mint természetes metildonorral. Az ilyen reakció gátlásával ebben a közleményben nem foglalkozunk.

Az N^ε-metil-lizinek keletkezhetnek pl. különböző formaldehid prekursorokból (aminopirin [3, 4], dimetil-nitrozamin [6, 15, 29] stb.) demetiláz enzimek hatására felszabadult formaldehid és L-lizin reakciójakor.

TURBERVILLE és CRADDOCK [23] jelzett dimetil-nitrozaminnal injektált patkányok májában jelentős mennyiségű jelzett formaldehidet és jelzett N^ε-metilezett lizineket (N^ε-trimetil-L-lizint is) mutattak ki már 2 órával az injektálás után. Bár feltételezték, hogy a formaldehidnek is szerepet kell játszani a metilezésben (nemcsak más hipotézis szerinti metil-kationnak, $\oplus\text{CH}_3$) de erre bizonyítékot nem találtak. Ezért csak azt jegyezték meg a felszabaduló formaldehidről, hogy beépül a C₁-pool-ba. A két SAWICKI [15] legutóbb megjelent könyvében több száz különböző típusú és szerkezetű szerves vegyületet mutatott be, mint formaldehid prekuzort, amelyekből demetiláz enzimek hatására *in vitro* és *in vivo* körülmények között jelentős mennyiségű formaldehid szabadul fel. Ismertették a felszabaduló formaldehid számos reakcióját is, aminosavakkal, fehérjékkel, nuklein-bázisokkal és egyéb szerves vegyületekkel. Az N-metilezés lehetősége azonban még hiányzik e sorból.

Miután kimutattuk lizin és formaldehid között a spontán N^ε-metilezési és N^ε-formilezési reakciót, vizsgálni kezdtük, hogy lehet-e e reakciókat gátolni vagy megakadályozni. Feltételeztük, hogy a metilezés gátlásával egyidejűleg a formilezési reakció sem játszódhat le, mivel a formil csoportokat a metil csoportok keletkezésekor képződött aktív hangyasav hozza létre [28, 32].

A reakció gátlására csak olyan vegyületeket vettünk számításba, amelyeket biológiai rendszerekben fel lehet használni. Ismeretes, hogy a reakciót redukáló szerek (NaHSO₃, Na₂S₂O₄) és erős protonáló szerek (cc.HCl, cc.H₂SO₄, cc.HClO₄, cc.HCOOH) — amelyek a lizin-NH₂ csoportját $\oplus\text{NH}_3$ -má alakítják (ezzel a nukleofil addíciót gátolják) —, egyaránt megakadályozzák.

Biológiai rendszerekben ezek a vegyületek nem alkalmazhatók a szükséges töménységben. A reakció gátlására alkalmas általunk keresett vegyületeknek a következő feltételeket kell kielégíteniök:

- gátolja a spontán metilezési reakciót;
- redukálja a formaldehidet;
- jó antioxidáns legyen, redox rendszert képezzen;
- befogja a demetilezéskor keletkező gyökös termékeket;
- biológiai rendszerekben is viszonylag nagy dózisban lehessen alkalmazni és ne legyen toxikus;
- a vegyület metabolitjai kiürüljenek a szervezetből;
- a plazmamembránon könnyen áthatoljon.

Tájékoztató vizsgálatok és elvi megfontolások alapján jutottunk az előző feltételeket maradéktalanul kielégítő vegyületként az L-aszkorbinsavhoz [27].

Az aszkorbinsav alapvető biológiai szerepével részletesen foglalkozó összefoglaló munkák [1, 8, 20, 26] metilezést gátló hatását még nem említik.

Továbbiakban ismertetjük azokat a vizsgálati módszereket és eredményeket, amelyek igazolták az L-aszkorbinsav spontán metilezést gátló hatását.

Anyag és módszer

Vizsgálatra felhasznált vegyületek

L-lizin (Reanal); L-aszkorbinsav (Reanal); formaldehid (36–38%) (Lachema); szilárd paraformaldehid (Merck); metanol (Reanal); etilén-glikol (Reanal); N^α-acetyl-L-lizin-metilamid (CIBA); D-izo-aszkorbinsav (Szeczin); formaldehid-¹⁴C (radioaktivitás: 1,97 mCi/g = 19,98 KBQ/cm³) (MTA Izotóp Intézete); L-lizin-6-³H (radioaktivitása: 250 mCi/mmol = 9250 MBQ/mmol) (MTA Izotóp Intézete); D₂O (99,75% Deuterierungsgrad) (Merck).

A felsorolt vegyületek mind analitikai tisztaságúak voltak.

Azonosításhoz felhasznált teszt anyagok

N^ε-monometil-L-lizin. HCl (MML) (Sigma);
N^ε-dimetil-L-lizin. HCl (DML) (Vega Biochemicals, Columbia);
N^ε-trimetil-L-lizin. 2 HCl (TML) totál szintézissel előállítva [12];
N^ε-formil-L-lizin (F-Lys) (Reanal).]

Vizsgálati módszerek

1. Rétegekromatográfiás vizsgálatokkal összekapcsolt potenciometrikus titrálások

100 cm³ 0,01 molos L-lizin oldatot potenciometrikusan titráltunk 3%-os formaldehid oldattal 25 és 45 °C-on kombinált üvegelektóddal, Radelkis OP-205 típusú potenciométeren. A hozzáadagolt formaldehid mennyiségének függvényében mértük a rendszer pH-változását. A pH változásokkal egy időben a reakcióelegyből mintákat vettünk (10–10 μl-t) mind a kiindulási, mind a közömbösített, mind pedig a közömbösítés utáni reakcióelegyből 24 óráig és FIXION 50 × 8 erősen kationcserélő vékonyréteg lemezen (pH = 6,1 citrát pufferben) nyomon követtük a reakcióban keletkező ninhidrin pozitív terméket.

Ugyanezt a formaldehides titrálást 25 °C-on elvégeztük úgy is, hogy az 0,01-mól L-lizin mellett 0,001; 0,005; 0,01; ill. 0,05 mól L-aszkorbinsav is jelen volt. A 3%-os formaldehid oldatot titrálás előtt 0,01 n NaOH-dal pH = 7-re közömbösítettük.

2. NMR-vizsgálatok

Szilárd paraformaldehidből D₂O-dal, 100 °C-os forralással 1 mólos formaldehid oldatot készítettünk. Az oldat 5 cm³, ehhez 0,505 g N^α-acetyl L-lizin-metilamidot adtunk, hogy az oldat blokkolt lizinre 0,5 mólos legyen.

Az így előkészített reakcióelegyet 24 órán keresztül 37 ± 1 °C-on termosztáltuk és Perkin Elmer R-12 60 MHz NMR készülékkel felvettük a rendszer NMR-spektrumát, összehasonlítva az N^α-acetyl-L-lizin-metilamid 0,5 mólos

D₂O-dal készült oldatával. A reakciót megismételtük úgy is, hogy a reakcióelegyben a formaldehid és blokkolt lizin mellett 0,1, 0,5, illetve 1 mól L-aszkorbinsav is jelen volt.

3. Jelzett vegyületekkel történő vizsgálatok

Az L-lizin és formaldehid közötti reakciót pH = 7, foszfát pufferben L-lizinnel (0,001 mólos oldat) és jelzett formaldehiddel (0,001 mólos ¹⁴CH₂O-oldat, radioaktivitása 1,97 mCi/g 19,98 KBQ/cm³) is elvégeztük, 37 ± 1 °C-on, 24 óráig termosztálva a reakcióelegyet. A termosztálás után a reakcióelegyet FIXION 50 × 8 vékonyréteg lemezen felfuttattuk. A FIXION 50 × 8 rétegen a radioaktivitás eloszlását Berthold vékonyréteg-kromatogram-scanneren határoztuk meg. Esetenként a ninhidrin reagenssel előhívott kromatogramot 1 cm-es csíkokban lekapartuk, majd radioaktivitását az eluálás után Packard Tri Carb 3390, ill. Berthold BF 500 folyadék szcintillációs spektrométerben határoztuk meg. A mérési adatokból hisztogramot szerkesztettünk.

A reakció többoldalú megközelítése érdekében a vizsgálatokat radioaktív L-lizinnel (L-lizin-6-³H, 0,001 mólos oldat) és inaktív formaldehiddel (0,001 mólos oldat) is elvégeztük. Az előbb vázolt reakciókat 0,001 és 0,005 mól aszkorbinsav jelenlétében is megismételtük.

4. Gázkromatográfiás vizsgálatok

100 cm³ 0,1 mólos formaldehid oldathoz 3,52 g L-aszkorbinsavat adtunk, így az oldat aszkorbinsavra 0,2 molos lett. Az oldatot termosztátban tartottuk 37 ± 1 °C-on, 24 órán keresztül. Az idő függvényében mintákat vettünk és Packard típusú gázkromatográfal (töltet: Chromosorb W 5%; kolonna: 2 m, 4 mm Ø) vizsgáltuk a reakcióelegyet etilén-glikolra.

A reakció során eltávozó gázok egy részét felfogtuk és CO₂-ra azonosítottuk tömegspektrográfal. A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz a 0,1 molos formaldehid oldatot paraformaldehidből készítettük desztillált vizes forralással, hogy metanol mentes legyen, így egyértelműen el lehetett dönteni, hogy az aszkorbinsavas redukciókor keletkezik-e metanol vagy sem.

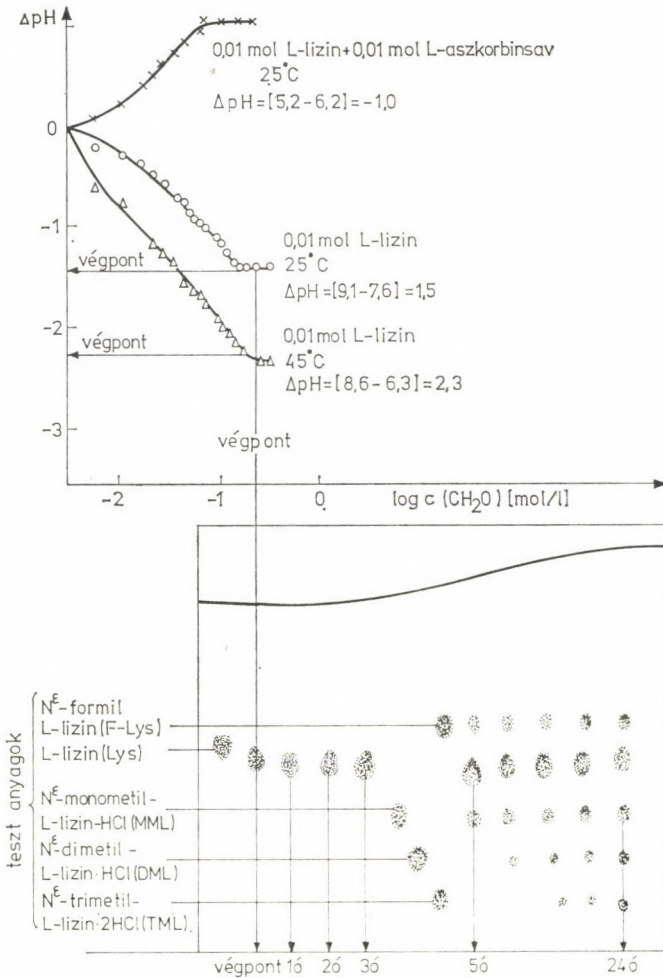
5. Redoxpotenciálmérés

A redoxpotenciált (E; mV-ban) Radelkis OP-204 típusú univerzál pH-mérőberendezésen határoztuk meg platina és kettős sóhidas Ag/Ag Cl referencia elektróddal. 40 cm³ 0,1 mólos L-lizin oldathoz 0,1 mólos 7 pH-ra közömbösített formaldehid oldatot adagoltunk növekvő mennyiségben és mértük a rendszer redoxpotenciál változását 37 °C-on. Ugyanezt a reakciót megismételtük úgy is, hogy a 0,1 mólos L-lizin oldat 0,1 mól L-aszkorbinsavat is tartalmazott. 50 cm³ 0,1 mólos L-aszkorbinsav oldathoz 0,1 mólos 7 pH-ra közömbösített formaldehid oldatot adagoltunk 37 °C-on és mértük a rendszer redoxpotenciál változását.

Kísérleti eredmények

A rétegekromatográfiás vizsgálatokkal összekapcsolt potenciometrius titrálások eredményeit az 1. ábrán mutattuk be. Az ábrán a pH változása látható a formaldehid koncentráció logaritmusának függvényében.

A 0,01 mólos lizin oldat pH-értékei mind 25 mind 45 °C-on megfelelnek a SÖRENSEN-féle formol titrálások alapján [16] várható értékeknek.

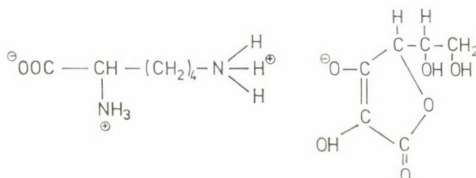


1. ábra. A 0,01 mólos L-lizin, ill. 0,01 mólos L-lizin + 0,01 mólos L-aszorbinsav oldatok pH-értékeinek változása formaldehid hatására és a reakcióban keletkezett L-lizin származékok ninhidrin pozitív foltjai

Fig. 1. Changes in pH values of 0,01 mol L-lysine and 0,01 mol L-lysine + 0,01 mol L-ascorbic acid solutions due to the effect of formaldehyde and the ninhydrin positive spots of L-lysine derivatives formed in the reaction

A formaldehid koncentráció növekedésével csökken a rendszer pH-ja (ΔpH -értékek pozitívak) és eljutunk a közömbösítési pontig. Ezután már hiába növeljük a formaldehid koncentrációját, nem csökken a rendszer pH-ja. L-aszorbinsav hatására azonban ilyen pH-csökkenésről 0,01 mól aszorbinsav esetén már nem beszélhetünk (0,001 és 0,005 mól hatására is jóval kevésbé csökken a rendszer pH-ja). A rendszer pH-ja nem csökken, hanem nő, már a legkisebb formaldehid koncentrációtól is, amely azt bizonyítja, hogy az L-aszorbinsav megakadályozza a formaldehid addícióját a lizinre.

Az addíció gátlás azzal magyarázható, hogy az aszkorbinsav só képez a lizin ϵ -amino csoportjával [8] és így gátolja a formaldehid addícióját. Így érthető, hogy a gátlás koncentráció függő, minél nagyobb az aszkorbinsav cc.-ja, annál nagyobb a gátlás. A 0,01 mól L-lizin + 0,01 mól L-aszkorbinsav oldat pH-értéke is igazolja ezt a feltevést. A lizin oldat eredeti 9,1-es pH-értéke 5,2-re csökkent aszkorbinsav jelenlétében.



L-lizin-L-aszkorbinsavas sója

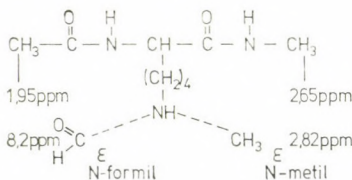
Formaldehid hatására a sókötés valószínűleg úgy bomlik, hogy közben az aszkorbinsav redukálja a rendszerhez adott formaldehidet (gázkromatográfiai vizsgálataink ismertetésekor erre részletesen visszatérünk). Így a lizin erősen bázikus ϵ -amino csoportjainak egy része felszabadul a sókötésből, növeli a rendszer pH-ját. Az addíció gátlással az aszkorbinsav gátolja a metilezést is.

A metilezés gátlását a rétegekromatográfiai vizsgálatok is alátámasztották. A reakcióelegyek rétegekromatogramjai L-lizin és formaldehid között az 1. ábrán láthatók. Igazoltuk, hogy 5 óra elteltével már kis koncentrációban is (0,1 mól) megjelentek az N^ϵ -metil (MML) és formil-lizin ninhidrin pozitív foltjai, hosszabb idő alatt az N^ϵ -di- és trimetil-lizin foltok is (DML, TML). A kromatogram tanúsága szerint a közömbösítési ponton még nincsenek N^ϵ -metilezett vegyületek, azaz csak a formaldehid adiciónálódott (N^ϵ -metilol vegyületek keletkeztek), amit a rendszer pH-csökkenése jelez.

Aszkorbinsav jelenlétében (sem N^ϵ -metil, sem N^ϵ -formil) ninhidrin pozitív foltokat nem tudtunk kimutatni, ha az aszkorbinsav 0,01 mól koncentrációban volt jelen. 0,005, ill. 0,001 mól aszkorbinsav koncentráció esetén kevés ninhidrin pozitív N^ϵ -metil-L-lizin folt már megjelent a kromatogramon.

N^α -acetyl-L-lizin-metilamiddal végzett NMR-felvételek megerősítették ezeket az eredményeket.

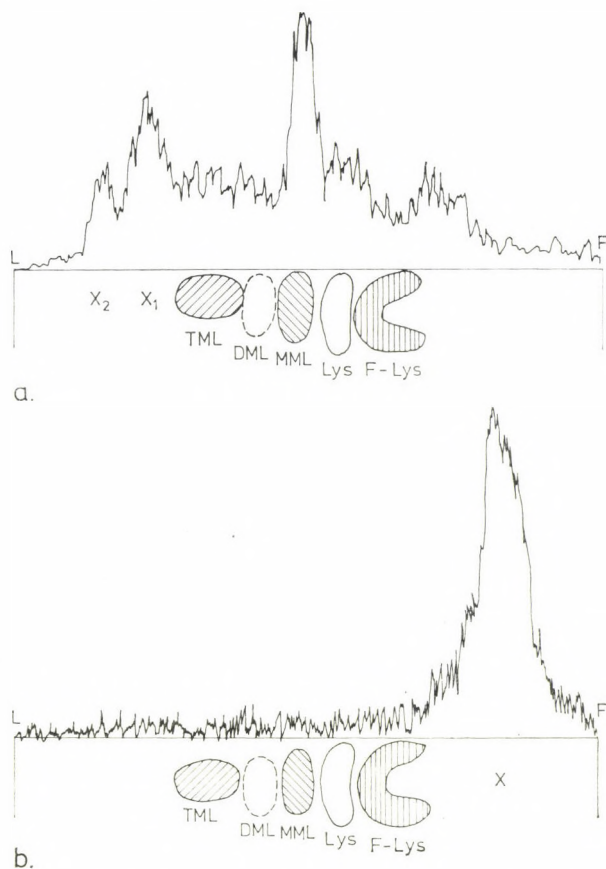
Az N^α -acetyl-L-lizin-metilamidban két metil-csoport van, a metil-csoportok 3 protonja a NMR-spektrumban két éles szingulett vonalban jelentkezett (1,95 ppm, 2,65 ppm). Formaldehid hatására megjelent az N^ϵ -metil csoport 3 protonjára jellemző éles szingulett vonal (2,82 ppm), ill. az N^ϵ -formil csoport egy protonjára jellemző szingulett 8,2 ppm-nél jelent meg.



Aszkorbinsav felesleg jelenlétében sem a metil-, sem a formil-csoportokra jellemző szingulett csúcsok nem jelentek meg az NMR-spektrumban.

Az NMR-felvételek is azt bizonyítják, hogy az aszkorbinsav gátolja a metilezést. Mivel azonban NMR vizsgálatokkal az N^ε-metilezett vegyületek kimutathatósági határa elég magas (5–10 mg/cm³, N^ε-metil-L-lizin), nem lehetett eldönteni, hogy egészen alacsony koncentrációban is gátolja-e a metilezési reakciót az L-aszkorbinsav.

Erre voltak alkalmasak a *radiometrikus vizsgálatok* jelzett formaldehiddel és jelzett lizinnel, igen kis koncentrációban. Aszkorbinsav jelenlétében (nagyobb koncentrációban mint a formaldehid) egyáltalán nem kaptunk radioaktív csúcsot a FIXION 50 × 8 vékonyréteg lemezen sem az N^ε-metil- sem az N^ε-formil-L-lizin helyén (2. ábra). Ebből következik, hogy rendkívül kis (10⁻⁸ g/cm³) koncentrációban sem képződtek az említett vegyületek. Az aszkorbinsav teljes metilezés gátlást biztosít kis lizin koncentrációkban is.



2. ábra. Reakcióelegyek radiogramjai FIXION 50 × 8 kationcserélő rétegen (37 °C, 24 óra reakció idő után) a) 1 mM L-lizin + 1 mM formaldehid-¹⁴C oldat; b) 1 mM L-lizin + 1 mM formaldehid-¹⁴C + 5 mM L-aszkorbinsav

Fig. 2. Radiograms of reaction mixtures on FIXION 50 × 8 cation exchanging layer (at 37 °C, after 24 hours reaction time) a) 1 mM L-lysine + 1 mM formaldehyde-¹⁴C solution; b) 1 mM L-lysine + 1 mM L-lysine + 1 mM formaldehyde-¹⁴C + 5 mM L-ascorbic acid

A 2. ábrán bemutatott radiogramok jól szemléltetik az előbb elmondottakat. Látható, hogy aszkorbinsav nélkül a reakcióelegyben formaldehid-¹⁴C hatására az N^ε-mono (MML)- di (DML) és trimetil (TML) L-lizin, valamint N^ε-formil-L-lizin (F-Lys) helyén radioaktív csúcsok vannak még néhány más ismeretlen összetételű csoport okozta radioaktív csúccsal (X₁; X₂) együtt.

Aszkorbinsav felesleg jelenlétében az előbb említett csúcsok egyáltalán nem jelentkeztek, tehát az említett mérési határig (10⁻⁸ g/cm³) a metilezett vegyületek nem keletkeztek. Mivel a reakció gátlása 1 milimólos oldatban és pH = 7-es pufferben játszódott le, valószínűsíthető, hogy a biológiai rendszerekben is végbemehetnek hasonló gátlások.

A reakció gátlása azért valószínűsíthető biológiai rendszerekben is, mert SPRINCE [17, 18] *in vivo* vizsgálataiból — amelyek milimól koncentrációkban történtek — ismeretesek, hogy az exogén toxikus formaldehid (LD 90 = 10,8 mM/kg dózisban adagolva) toxikussága 3 mM/kg aszkorbinsav adagolással jelentősen kivédhető (55%-os túlélés).

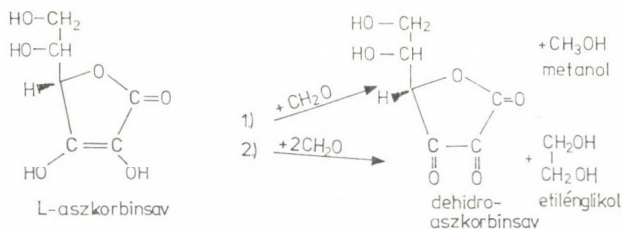
Mivel a kísérletek *in vivo* körülmények között, azaz semleges közegben (pH = 7,34) történtek, arra lehet következtetni, hogy valóban biológiai rendszerekben is redukálja az aszkorbinsav a formaldehidet és a redukióval egyidejűleg a lizin N^ε-metilezését is gátolja.

A FIXION 50 × 8 vékonyréteg lemezen legfelül azonban megjelent egy nagy radioaktív csúcs, amely egyúttal ninhidrin pozitív folt is (X).

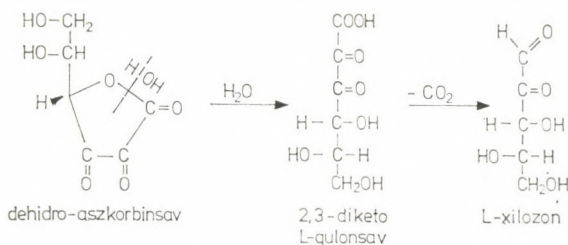
Valószínű, hogy az L-lizinen L-aszkorbinsav és a redukált formaldehid valamilyen komplexe képződött, mert a foltnak radioaktivitása is van. Azt, hogy az L-lizin ebben a rendszerben ezen a helyen jelentkezik, jelzett lizinnel (L-lizin-6-³H) is igazoltuk. Aszkorbinsavval, inaktív formaldehiddel és jelzett lizinnel végzett közös reakcióban a ninhidrin pozitív folt és radioaktív csúcs ugyanott jelentkezett.

Az eddig ismertett vizsgálati eredmények után még nyitva maradt a kérdés, hogy az aszkorbinsav csak a formaldehid addícióját képes-e meggátolni a lizin ε-amino csoportjára, vagy redukálni is képes a formaldehidet, és ha igen milyen vegyületté redukálja. Már a 40-es évek végén elemezték az aszkorbinsav és formaldehid között lejátszódó reakciókat. A kísérletek célja az volt, hogy az aszkorbinsav mennyiségi meghatározására módszert dolgozzanak ki élelmiszerekben [13, 14]. A lizin és formaldehid közötti spontán metilezési reakció gátlása fel sem merülhetett, mert a biológiai rendszerekben csak 1959-ben mutatták ki először az N^ε-metil-L-lizint [11] a *Salmonella typhymurium* baktériumok fehérjéiben. Ezek a vizsgálatok azt bizonyították, hogy az L-aszkorbinsav és formaldehid közötti reakció 30 °C felett pH = 4–8 tartományban jelentős CO₂ fejlődéssel jár együtt [13, 14], miközben az aszkorbinsav elveszíti redukáló képességét. Feltételezték, hogy a formaldehidet redukálja az aszkorbinsav, nem tisztázva, hogy milyen vegyületté.

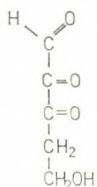
Feltételezhető, hogy az aszkorbinsav kétféle úton redukálhatja a formaldehidet. Vagy metanol, vagy etilénlikol képződik az első lépésben. Meg kell jegyezni, hogy az etilénlikol képződése a redukióban energetikailag kedvezőbb.



Mindkét reakcióban 1 mól dehidro-aszkorbinsav is képződik. A dehidro-aszkorbinsavban a lakton gyűrű már nem olyan stabilis, mint az L-aszkorbinsavban és az oldatban levő vízzel könnyen hidrolizálódik (37 °C-os reakció) 2,3-diketo-L-gulonsavvá, amely CO_2 veszteséssel stabilizálódik. Ezért van a jelentős CO_2 fejlődés, amit saját kísérleteinkben is azonosítottunk tömegspektrográffal ($M^+ = 44$).



A dehidro-aszkorbinsav bomlástermékei között (a CO_2 mellett) nemcsak L-xilozon keletkezik az oldat barnulása közben, hanem számos más vegyület is pl. a 3-keto-4-dezoxi-pentozon:



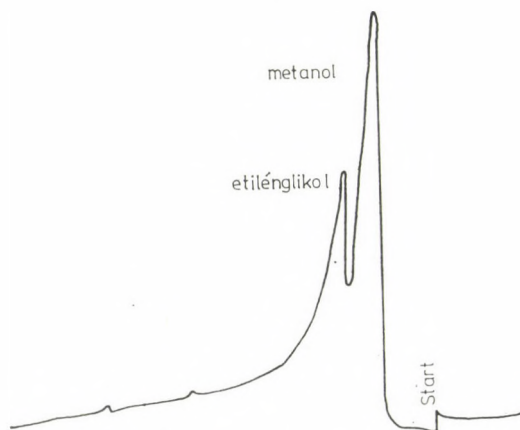
3-keto-4-dezoxi-pentozon

Irodalmi források részletesen foglalkoznak ezekkel a folyamatokkal [7].

Saját kísérleteink célja természetesen nem az aszkorbinsav bomlástermékeinek részletes elemzése, hanem a metanol vagy etilén-glikol azonosítása volt.

Packard típusú gázkromatográf készülékkel nem tudtuk a metanol jelenlétét kimutatni, még 24 óras 37 °C-on végzett reakció után sem. Ugyanakkor etilén-glikol jelentős mennyiségben képződött és egyértelműen azonosítottuk. A keletkezett etilén-glikol mennyisége a reakció idejének növekedésével fokozatosan nőtt.

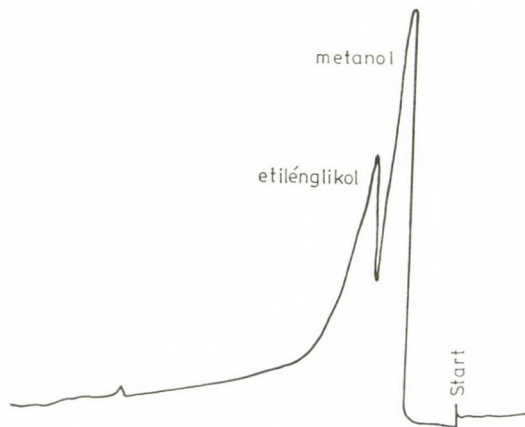
Az etilén-glikolt belső standardként adva a reakcióelegyhez, etilén-glikolnak azonosítottuk a reakcióban keletkező terméket. Hasonló módon metanol a reakcióelegyből azonosítani nem tudtuk (3. és 4. ábra).



3. ábra. Formaldehid-aszkorbinsav reakcióelegy gázkromatogramja (37 °C, 10 óra reakció idő után), metanol vivő oldószert adva a reakcióelegyhez

Fig. 3. Gas chromatogram of a formaldehyde-ascorbic acid solution (at 37 °C, after 10 hours reaction time) having added a solvent carrying methanol to the reaction mixture

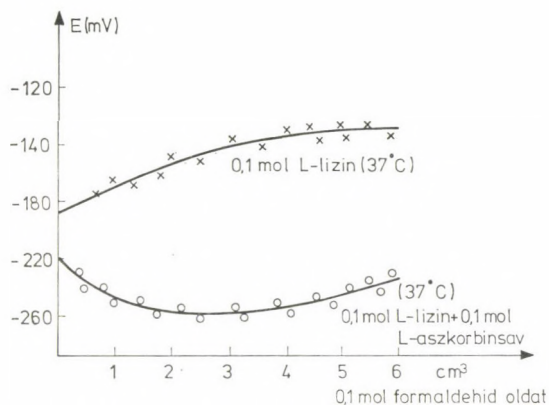
Meg kell még jegyezni, hogy a reakcióelegy formaldehidre jellemző szúrós szaga fokozatosan csökkent és 24 órás reakció idő után teljesen megszűnt, az odatnak kellemes, piroszólósavra jellemző szaga volt.



4. ábra. Formaldehid-aszkorbinsav reakcióelegy gázkromatogramja, metanolban oldott etilénglikolt belső standardként adva a reakció elegyhez (37 °C, 10 óra)

Fig. 4. Gas chromatogram of formaldehyde-ascorbic acid having added, as inner standard, ethylene glycol solved in methanol to the reaction mixture (at 37 °C, after 10 hours reaction time)

Az aszkorbinsav erős redukáló hatását a redoxpotenciál mérések is igazolták. Az 5. ábrán látható hogyan változik az L-lizin + formaldehid oldat redoxpotenciál értéke, viszonyítva ahhoz a rendszerhez, amikor a lizin mellett



5. ábra. A 0,1 mólos L-lizin, ill. a 0,1 mólos L-lizin + 0,1 mólos L-askorbinsav oldat redoxpotenciál értékeinek változása 0,1 mólos formaldehid oldat hatására 37 °C-on

Fig. 5. Change of the redox potential values of 0,1 mol L-lysine and 0,1 mol L-lysine + 0,1 mol L-ascorbic acid solutions upon the effect of 0,1 mol formaldehyde solution at 37 °C

askorbinsav is volt jelen. Az ábra jól szemlélteti az ellentétes tendenciákat a redoxpotenciál változásban. Egyedül lizin esetében a pozitív irány felé tolódtak el az értékek, askorbinsav jelenlétében a negatív redoxpotenciál értékek felé. A negatív irányban történő redoxpotenciál eltolódás azt jelenti, hogy a titráló ágens — esetünkben a formaldehid — redukálódik, míg az askorbinsav oxidálódik. Az askorbinsav oldat formaldehides titrálása is igazolja, hogy az askorbinsav az erősebb redukálószer és a formaldehid redukálódik, mert a kiindulási oldat redoxpotenciálja (+ 25 mV; 0,4 mól askorbinsav oldat) formaldehid hatására fokozatosan csökkent 0-ra, majd negatív értékeket vett fel, azaz a titráló ágens, a formaldehid redukálódott (I. táblázat).

I. táblázat

A 0,1 mólos L-askorbinsav oldat redoxpotenciál értékeinek változása 0,1 mólos formaldehid oldat hatására 37 °C-on

Table 1. Change of the redox potential values of a 0,1 mol L-ascorbic acid solution upon the effect of 0,1 mol formaldehyde solution at 37 °C

Hozzáadott 0,1 mólos formaldehid oldat, cm ³	Redoxpotenciál értékek (mV)
0 (Kiinduló oldat)	25
1	21
2	17
3	16
4	13
5	12
10	6
15	0
20	-4
25	-5

Annak, hogy az aszkorbinsav erősebb redukálószer, mint a formaldehid, biológiai rendszerekben lehet jelentősége. Ugyanis az N^ε-metil-L-lizin képződésekor az első lépésben keletkezett N^ε-metilol vegyület tovább redukálódik formaldehid hatására N^ε-metil vegyületté, azaz a formaldehid itt redukálószerként hat. Az aszkorbinsav ezt a redukciót megakadályozza, mert magát a formaldehidet redukálja és így nincs ami elvégezze a metilol csoport redukcióját.

Megbeszélés

Az előzőekben ismertetett modell kísérletek alapján látható, hogy az L-lizin formaldehides spontán metilezése és formilezése gátolható, ill. teljesen eliminálható L-aszkorbinsavval.

A reakciók gátlása koncentráció függő, és csak akkor teljes, ha az L-aszkorbinsav a formaldehidhez viszonyítva feleslegben van jelen.

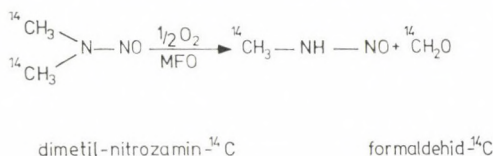
Az L-aszkorbinsav úgy gátolja a reakciót, hogy közben a formaldehidet etilénlikollá redukálja. Metanolból ugyanis a májban újra formaldehid képződhetne, míg az etilénlikol tovább alakulhat más homológ vegyületté.

A spontán metilezési és formilezési reakció gátlásának a biológiai rendszerekben lehet jelentősége, hiszen a formaldehid újabb vizsgálatok szerint alacsony szinten előfordulhat biológiai rendszerekben, így az emberi szervezetben is [22, 23]. A formaldehid spontán metilező hatására metilezett nuklein-bázisok (vagy nukleozidok) is keletkezhetnek [31], mégpedig spontán és szabálytalanul (randomly). A keletkező abnormális bázisok zavarokat idézhetnek elő biológiai rendszerekben is. Ezért is fontos, hogy az aszkorbinsav preventív védőszerepét minél jobban megismerjük. Az irodalomban egyre több közlemény foglalkozik az ilyen irányú hatásával [1, 8, 20, 26]. Az utóbbi időben több közlemény [5, 17, 18] foglalkozik az aszkorbinsav dimetil-nitrozamin, ill. az exogén formaldehiddel szembeni védőhatással. GUTTENPLAN [5] ismerteti, hogy a dimetil-nitrozamin mutagén hatását L-aszkorbinsavval gátolni lehetett *Salmonella typhimurium* baktérium törzseken Ames-teszt vizsgálatokban. Megállapította azt is, hogy a védő hatás erősen függ az aszkorbinsav koncentrációjától. SPRINCE és munkatársai [17, 18] pedig *in vivo* állatkísérletekben igazolták, hogy az aszkorbinsav jelentős védelmet nyújt a toxikus exogén formaldehiddel (LD 90 = 10,8 mM/kg dózis) szemben már 3 mM/kg aszkorbinsav előadagolás esetén is (55%-os túlélés). Megállapították, hogy a toxikus hatás kivédése erősen koncentráció függő és nemcsak formaldehiddel, hanem más aldehidekkel (acetaldehid) szemben is védelmet nyújt az aszkorbinsav.

Az említett kutatók azonban a formaldehidet csak erősen toxikus anyagnak tekintették, metilező hatását nem vették figyelembe. Ezért az eddigi kísérletekben az L-aszkorbinsav spontán metilezést gátló hatása fel sem merülhetett.

Az ismertetett kísérletekben nem alkalmaztak feleslegben aszkorbinsavat a formaldehidhez viszonyítva, eredményeik mégis jelentősek, mert *in vivo* elsőnek bizonyították, hogy az L-aszkorbinsav védelmet nyújt az exogén formaldehiddel szemben. Az, hogy ez a védelem erősen koncentráció függő, egybevág saját kísérleti eredményeinkkel és elképzeléseinket alátámasztja, csakúgy, mint saját előzetes vizsgálataink [24]. Májhomogenizátumokban vizsgáltuk, hogy a demetiláz enzimek mennyi formaldehidet szabadítanak fel ¹⁴C-gyel jelzett dimetil-nitrozaminból. Dimedonnal határoztuk meg a keletkezett jelzett formaldehid-¹⁴C mennyiségét.

A formaldehid a következő reakció szkéma szerint keletkezhet:



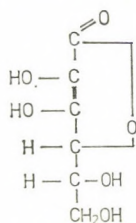
(MFO = Mixed function oxigenase, kevert funkciójú demetiláz enzimek keveréke).

Abban az esetben, ha megfelelő molarányban aszkorbinsavat adagoltunk előre a májhomogenizátumhoz, a keletkezett jelzett formaldehid (¹⁴C-vel jelzett formál-dimedon) mennyisége közel 1/6–1/10 értékre csökkent le.

Megfigyeléseink korrelációba hozhatók SPRINCE [17, 18] eredményeivel. A májhomogenizátumokon végzett vizsgálataink eredménye megfelel NISHIE [9] eredményeinek is, aki vizsgálataink fordítottját végezte el dimetil-nitrozaminnal *in vivo* állatkísérletekben. 200–250 g-os patkányok vizeletében vizsgálta az aszkorbinsavszint változását 1, ill. 2 nap után, miután előzetesen dimetil-nitrozamint adagolt — olívaolajban oldva — orálisan az állatokba, különböző dózisosokban (15–20 mg/kg). Azt tapasztalta, hogy a vizeletben az aszkorbinsavszint %-os csökkenése a kontroll állatokhoz képest (amelyek csak olívaolajat kaptak) arányos volt a dimetil-nitrozamin mennyiségével és a 2. napon elérte a 40–60%-ot is.

A kísérleti eredmények értékelésekor természetesen nem gondolt arra, hogy a dimetil-nitrozaminból felszabaduló formaldehiddel reagálhatott az aszkorbinsav és ezért csökkent a koncentrációja a vizeletben.

Az L-aszkorbinsavnak fontos szerepe lehet biológiai rendszerek védőmechanizmusában. Jelenleg nincs birtokunkban más vegyület, amely a biológiai rendszerekben a spontán metilezés gátlásával kapcsolatos összes követelményeknek eleget tenne. Sőt tulajdonképpen még a D-izoaszkorbinsav sem ilyen (gátolja a metilezést, de nem jó gyökfogó, nem jó antioxidáns).



D-izoaszkorbinsav

A D-izoaszkorbinsavval kapcsolatos kísérleteinkről a későbbiekben számolunk be.

A formaldehid L-aszkorbinsavas redukciójának biokémiai jelentősége

Kísérleti eredményeink interpretálása és diszkusziója után a formaldehid és L-aszkorbinsav reakciójának lehetséges biokémiai jelentőségére szeretnénk rámutatni.

Az L-aszkorbinsav, azaz a jól ismert C-vitamin biokémiai szerepe sokoldalú, amit SZENT-GYÖRGYI által 1928-ban történt első izolálása óta [25] számos kutató is megerősített. Ezért is javasolják preventív anyagként különböző nagyságú dózisokban — sőt esetenként megadózisokban —, humán szervezetekben a legkülönbözőbb kóros esetekben [1, 8, 20]. Azonban eddig még nem merült fel annak a gondolata, hogy az L-aszkorbinsav a szervezetben endogén formaldehidet redukálni képes, amely az anyagcserében (a C₁-pool-ban) részt vesz, tehát nemcsak a nitrozaminokból, vagy más prekursorokból felszabadulót.

Ebből viszont arra lehet következtetni, hogy a szervezetben levő L-aszkorbinsav mennyisége és az endogén formaldehid szint között összefüggésnek kell lennie, és hogy az aszkorbinsav mennyiségével szabályozni lehet a szervezetben levő formaldehid szintet. Ezzel kapcsolatban megvizsgáltuk, hogy a humán szervezetekben egyáltalán beszélhetünk-e endogén formaldehid szintről. Vizsgálataink azt bizonyítják, hogy az emberi vérben és vizeletben igen alacsony szintű, de határozott mennyiségű endogén formaldehid van [22, 23].

Több száz dimedon-¹⁴C-el történő endogén formaldehid szint meghatározás után azt mondhatjuk, hogy a normális emberi vérben 0,4—0,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a vizeletben, 2,8—4,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ formaldehid van.

A formaldehid szint a különböző tumoros stádiumokban ettől jelentősen eltért: vagy 8—10-szer magasabb lett, vagy csak 1/10-e volt a normális értékeknek. Volt olyan tumoros vérminta, amelyikben már egyáltalán nem tudtunk formaldehidet a vizsgálati módszerrel kimutatni, azaz 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ -nél alacsonyabb volt a formaldehid koncentráció.

Ezek az előzetes humán vizsgálatok eredményei egyébként jó korrelációban vannak PAIK és KIM eredményeivel [10]. Megállapították ugyanis, hogy a gyorsan növő NOVIKOFF hepatomában az N⁶-metilezett-lizinek demetilezéséért felelős ϵ -alkil-lizináz enzim aktivitása gyakorlatilag nulla, azaz nem szabadul fel formaldehid.

Az endogén formaldehid szinttel korrelációban modellekísérleteinkből az következik, hogy az L-aszkorbinsavnak *elsősorban a jelentős mennyiségű primer, még le nem reagált formaldehid eliminálásában lehet nagy szerepe a szokásosnál nagyobb dózisokban történő adagolásával.*

Konkrétan arra a kérdésre, hogy mekkora aszkorbinsav dózissal lehet az exogén vagy endogén formaldehidet eliminálni, nagyon nehéz választ adni. Ugyanis a szervezetben az aszkorbinsav koncentrációja nem egyforma. Különböző szövetekben, szövetekben az aszkorbinsav koncentrációja különböző [18], és függ az életkortól; idősebb korban egyre csökken. Az aszkorbinsav főleg a bázikus fehérjékhez (lizin ϵ -amino csoport, arginin guanidinoscsoport) van kötve [8]. Ugyanakkor, ha nagy dózisban adagolunk exogén aszkorbinsavat, annak jelentős része kiürül a szervezetből. Állandóan nagy dózist kell adagolni, hogy jelentősen fokozzuk az endogén aszkorbinsav szintet.

Ha valamilyen oknál fogva lokálisan megnő az N-demetiláz enzim aktivitása pl. karcinogén nitrozaminok, vagy benzpirén adagolás hatására (vagy megnöveljük a formaldehid szintet exogén formaldehiddel), akkor lokálisan is megnöveljük a formaldehid koncentrációját. Nem valószínű, hogy a szövetekben rendelkezésre álló aszkorbinsav elegendő a felszabaduló, vagy adagolt formaldehid eliminálására. Ugyanis ez az a formaldehid, amely a spontán (randomly) N⁶-lizin metilezési és egyéb reakciókban is részt vesz.

TUBERVILLE és CRADDOCK [29] nem kaptak volna olyan nagy mennyiségű

jelzett formaldehidet és jelzett N^ε-metil lizinet jelzett dimetil-nitrózaminból állatkísérleteikben, ha elegendő aszkorbinsav lett volna a májban jelen.

Pontosan ezt igazolták saját előzetes kísérleteink [24] is tengerimalac májhomogenizátumokban. Ha aszkorbinsavat adagoltunk előre a májhomogenizátumokhoz, akkor a jelzett dimetil-nitrózaminból felszabaduló jelzett formaldehid mennyisége közel egytizede volt az aszkorbinsav védelem nélkül végzett kísérleteknek.

Mivel az aszkorbinsav adagolás és a formaldehid elimináció problémája rendkívül összetett, sok paraméter függvénye, ezeket az összefüggéseket egyértelműen csak állatkísérletekkel lehet eldönteni. Különböző dózísú formaldehidet (illetve formaldehid prekursorokat) kell adagolni különböző dózísú (ill. megadózísú) aszkorbinsav prevenció mellett, hogy az aszkorbinsav formaldehid szint szabályozó (beállító, védő) szerepét tisztázhassuk.

Erre vonatkozóan 1981-ben szintén SPRINCE [19] végzett úttörő jellegű kísérleteket. Abból a tényből indult ki, hogy egy egyszeri nagy dózísú aszkorbinsav adagolással is csak részben tudja telíteni az állatokat, mert nagy része kiürül, nem szívódik fel; több napon keresztül kell nagy dózísú aszkorbinsavat (3 mM/kg) adagolni az állatokba.

3 mM/kg = 528 mg/kg, ez egy 80 kg testsúlyú felnőtt emberre 42,24 g, ez abba a tartományba esik (30–50 g/nap), amelyet CAMERON és PAULING [1] a megadózísú terápiában naponta javasolnak.

SPRINCE [19] a toxikus formaldehid adagolása előtt több napon keresztül 3 mM/kg napi aszkorbinsavval telítette az állatokat, ezután következett a 10,8 mM/kg (= 324 mg/kg = LD 90) exogén formaldehid adagolás.

Az eredmény meglepő volt, de megfelelt a várakozásnak. Az 55%-os túlélés, amelyet egyszeri adagolással kapott, felment 75%-ra. Az eredmény avval magyarázható, hogy a szövetekben magasabb lett a többszöri adagolás hatására az aszkorbinsav koncentráció, nagyobb hatásfokkal redukálta (eliminálta) a formaldehidet. Valószínű, hogy ha a 3 mM/kg napi dózist felemeli, el lehet érni a 100%-os túlélést.

Az elmondottakból egyértelműen következik, hogy normál körülmények között (nem kóros esetekben) az aszkorbinsav adagolása (szabályozó funkciója) mindig összhangban kell, hogy legyen az endogén formaldehid szinttel. Ugyanis túl magas dózís esetén (megadózís) 100%-osan is eliminálhatjuk az endogén formaldehid szintet, amely C₁-pool felborulásához vezethet és rendkívül veszélyes is lehet. Ezért egyértelműen, kísérletekkel kell eldönteni, hogy a magas L-aszkorbinsav szint nincs e káros hatással a normális formaldehid anyagszerére.

Ezeknek a törvényszerűségeknek az egzakt megismeréséhez még számos problémát kell (*in vivo*, *in vitro*) tisztázni. Különösen figyelembe kell venni a nyomelemeknek, mint a demetiláz enzimek koenzimjeinek szerepét. Meg kell vizsgálni az L-aszkorbinsav szerepét a C₁-pool-ban, itt is elsősorban a tetrahydrofolsav (THF) és a formaldehid közötti reakciókban, hogy az endogén formaldehid-szint L-aszkorbinsavas szabályozásának mechanizmusát minél jobban megismerjük.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki J. BÜHLER-nak (CIBA, Svájc) a rendelkezésünkre bocsátott N^ε-acetil-L-lizin-metilamid modellanyagért, Z. MACHOY-nak (Lengyelország, Szczecin) az általa szintetizált D-izoaszkorbinsav mintáért,

valamint KOLONITS PÁLnak (Budapesti Műszaki Egyetem) az NMR spektrumok felvételéért és értékeléséért és HORVAI GYÖRGYnek (Budapesti Műszaki Egyetem) redoxpotenciál mérésekben nyújtott segítségével.

Összefoglalás

L-lizin és formaldehid közti spontán N-metilézési és N-formilezési reakciók gátlására az L-aszkorbinsav bizonyult legalkalmasabbnak. Ez a vegyület feltételezhetően szerepet játszik mind az endogén, mind az exogén prekursorokból az anyagcserében keletkező formaldehid reakcióinak szabályozásában, ill. eliminálásában.

A reakció gátlása koncentráció függő és csak akkor teljes, ha az aszkorbinsav mólkoncentrációja nagyobb a formaldehidénál.

A reakció nyomon követésére vékonyréteg-kromatográfiai vizsgálatokat, potenciometrikus és redox titrálásokat, NMR-spektroszkópiát, jelzett formaldehidet (formaldehid- ^{14}C) és jelzett-L-lizint (L-lizin-6- ^3H) használtunk fel.

Gázkromatográfiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az L-aszkorbinsav nem metanollá, hanem etilenglikollá redukálja a formaldehidet.

IRODALOM

1. CAMERON, E., PAULING, L. and LEIBOVITZ, B. (1979) Ascorbic acid and cancer. *Cancer Research*, **39**, 663—681.
2. ESCHWEILER, W. (1905) Ersatz von am Stickstoff gebundenen Wasserstoffatomen durch die Methylgruppe mit Hilfe von Formaldehyde. *Berichte*, **38**, 880—882.
3. GRIFFIN, B. W. (1977) Free radical intermediate in the N-demethylation of aminopyrine by horseradish peroxidase-hydrogene peroxide. *FEBS Lett.*, **74**, 139—143.
4. GRIFFIN, B. W. and TING, P. L. (1978) Mechanism of N-demethylation of aminopyrine by hydrogen peroxide, catalysed by horseradish peroxidase metmyoglobin and protohemin. *Biochemistry*, **17**, 2206—2211.
5. GUTTENPLAN, J. B. (1977) Inhibition by L-ascorbate of bacterial mutagenesis induced by two N-nitroso compounds. *Nature*, **268**, 368—370.
6. JOHANSSON, E. B. and TJÄLVE, H. (1978) The distribution of ^{14}C -dimethylnitrosamine in mice. Autoradiographic studies in mice with inhibited and noninhibited dimethylnitrosamine metabolism and comparison with the distribution of ^{14}C formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **45**, 565—575.
7. KURATA, T. and FUJIMAKI, M. (1976) Formation of 3-keto-4-deoxypentose and 3-hydroxy-2-pyrone by the degradation of dehydro-L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1287—1291.
8. LEWIN, SH. (1976) *Vitamin C. Its molecular biology and medical potential*. Academic Press, London—New York—San Francisco, 125—127.
9. NISHIE, K. (1978) A comparison of ascorbic acid excretion with other indicators of nitrosamine hepatotoxicity. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, **20**, 549—557.
10. PAIK, W. K. and KIM, S. (1974) ϵ -Alkyllysine. New assay method, purification and biological significance. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 369—378.
11. PAIK, W. K. and KIM, S. (1980) *Protein methylation*. John Wiley and Sons, New York—Chichester—Brisbane—Toronto, 8—25.
12. PUSKÁS, J. and TYHÁK, E. (1969) Synthese des DL-2-amino-6-trimethylammonio-Kapronsäure Betains (ϵ -Trimethyl-Lysine). *Periodica Polytechnica*, **13**, 261—265.
13. REITHEL, F. J. and WEST, E. S. (1948) Studies on the reactions between formaldehyde and enediols. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 898—900.
14. REITHEL, F. J. and WITHER, R. P. (1949) On the nature of the reaction between ascorbic acid and formaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1879—1880.
15. SAWICKI, E. and SAWICKI, C. R. (1978) *Aldehydes-photometric analysis. Formaldehyde precursors*. Academic Press, London—New York—San Francisco.

16. SÖRENSEN, S. P. L. (1908) Enzymstudien. I. Über die quantitative Messung proteolytischer Spaltungen. Die Formoltitrierung. *Biochemische Zeitschrift*, **2**, 45–101.
17. SPRINCE, H., PARKER, C. M. and SMITH, G. G. (1977) L-ascorbic acid in alcoholism and smoking. Protect against acetaldehyde toxicity as an experimental model. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **16**, 185–217.
18. SPRINCE, H., PARKER, C. M. and SMITH, G. G. (1979) Comparison of protection by L-ascorbic acid, L-cysteine and adrenergic-blocking agents against acetaldehyde, acrolein and formaldehyde toxicity: Implication in smoking. *Agent and Actions*, **9**, 407–414.
19. SPRINCE, H. (1981) Személyes közlés.
20. STONE, I. (1976) Scurvy and the cancer problem. *International Laboratory*, 27–36.
21. SUBA, Zs., SZENDE, B., LAPIS, K., TAKÁCS, J. and ELEK, G. (1980) ϵ -N-Trimethyl-lysine: A natural cell component with mitogenic activity. *Neoplasma*, **27**, 11–23.
22. SZARVAS, T., SZATLO CZKY, E., VOLFO RD, J., TYIHÁK, E., TRÉZL, L. and RUSZNÁK, I. (1980) Determination of endogenous free formaldehyde in human blood and urine by dimedone-carbon-14-radiometric method. *Proc. 20th Hung. Ann. Meth. Biochem.*, Siófok, 299.
23. SZARVAS, T., SZATLO CZKY, E., VOLFO RD, J., TRÉZL, L., TYIHÁK, E. and RUSZNÁK, I. (1981) Determination of endogenous formaldehyde in human blood samples of normal and tumorous origin by dimedone ¹⁴C-radiometric method. *6th Meeting of the European Association for Cancer Research*, Budapest, No. 227.
24. SZARVAS, T., TRÉZL, L., TYIHÁK, E. and RUSZNÁK, I. előkészületben.
25. SZENT-GYÖRGYI, A. (1928) Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.*, **22**, 1387–1409.
26. SZENT-GYÖRGYI, A. (1980) The living state and cancer. *Phys. Chem. Phys.*, **12**, 99–110.
27. TRÉZL, L., RUSZNÁK, I., TYIHÁK, E. and KAPUY, E. (1978) The influence of ascorbic acid on the spontaneous methylation reaction of L-lysine by formaldehyde. *Proc. 12th FEBS Meeting*, Dresden, No. 360.
28. TRÉZL, L., RUSZNÁK, I., TYIHÁK, E., SZARVAS, T., MÁRKUS, I. and MÜLLER, T. (1979) Promotion and inhibition of the spontaneous N-methylation and formylation reactions between L-lysine and formaldehyde. *Proc. 19th Hung. Ann. Meet. Biochem.*, Budapest, 33.
29. TURBERVILLE, C. and CRADDOCK, V. M. (1971) Methylation of nuclear proteins by dimethyl-nitrosamine and methionine in the rat *in vivo*. *Biochem. J.*, **124**, 725–739.
30. TYIHÁK, E., SZENDE, B. and LAPIS, K. (1977) Biological significance of methylated derivatives of lysine and arginine. *Life Sciences*, **20**, 385–392.
31. TYIHÁK, E., SZARVAS, T. and TRÉZL, L. (1979) Analogies and differences between spontaneous methylation of L-lysine and some nucleic acid bases with formaldehyde. *Proc. 19th Hung. Ann. Meet. Biochem.*, Budapest, 29.
32. TYIHÁK, E., TRÉZL, L. and RUSZNÁK, I. (1980) Spontaneous N- ϵ -methylation of L-lysine by formaldehyde. *Pharmazie*, **35**, 18–20.

SPONTANEOUS N-METHYLATION AND N-FORMYLATION REACTIONS BETWEEN L-LYSINE AND FORMALDEHYDE INHIBITED BY L-ASCORBIC ACID AND THEIR BIOCHEMICAL ASPECTS

* Trézl, L., * Rusznák, I., ** Tyihák, E., and *** Szarvas, T.

* Technical University of Budapest, Department of Organic Chemical Technology,

** Research Institute for Medicinal Plants, Budakalász and *** Institute of Isotopes of the
Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

For the inhibition of spontaneous N-methylation and N-formylation reactions between L-lysine and formaldehyde, L-ascorbic acid proved to be the most suitable. Presumably this compound has a part in controlling or eliminating the reaction of formaldehyde formed of both the endogeneous and exogenous precursors during metabolism.

The inhibition is concentration dependent and is full only if the molconcentration of ascorbic acid is higher than that of formaldehyde.

For the detection of the reaction thin-layer chromatographic analyses, potentiometric and redox titrations, NMR-spectroscopy, labelled formaldehyde (formaldehyde-¹⁴C) and labelled L-lysine (L-lysine-6-³H) were applied.

It was justified by gas chromatographic analyses that formaldehyde was reduced by L-ascorbic acid not to methanol but to ethylene glycol.

A DEZOXIRIBONUKLEINSAV SZERKEZETÉT MÓDOSÍTÓ FEHÉRJEFAKTOROK

JUHÁSZ PÉTER*

Pécsi Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézete

Beérkezett: 1981. október 6-án

Kulcsszavak: DNS szerkezet, DNS-kötő fehérjék, helikázok, nukleoszóma, topoizomerázok

Bevezetés

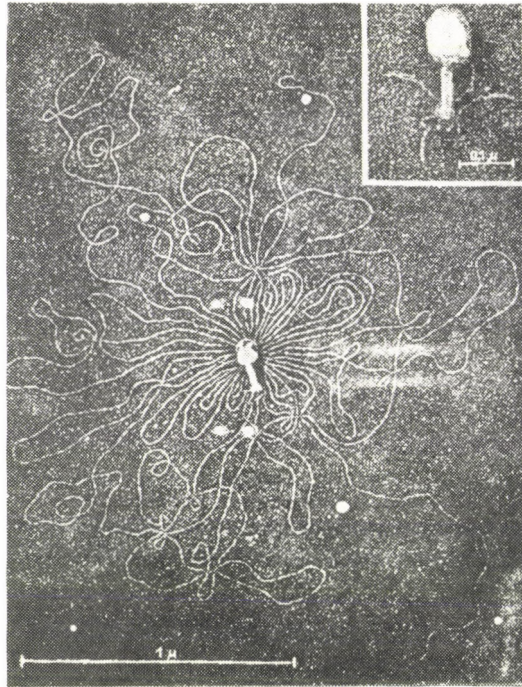
A DNS kettős spirálszerkezet modelljét olyan krisztallográfiai adatok alapján alkották meg, melyeket fehérjementes DNS oldatokon kaptak. A bázis-komplementaritás elve alapján nemcsak a DNS replikációját lehetett megérteni, hanem a biológiai információátvitel egész láncolatát is. Az alacsony ionerősség mellett, vizes oldatban levő DNS B-konformációja olyan tökéletes kristályszerkezetnek látszott, hogy fel sem merült, hogy az attól való eltérésnek biológiai jelentősége lehet.

A DNS alapformájának tekintett B-szerkezet és a kromoszómák DNS-e között három alapvető különbség van. Először is a DNS szabad formában nagyon ritkán és kis mennyiségben fordul csak elő, majdnem mindig fehérjéhez van kötve. Másodsorban a kettős spirálszerkezet elrejtí az, ami a DNS-molekulában az információt hordozza: a bázisokat, így a működő DNS-nek szükségszerűen ki kell nyílnia, egyfonalú DNS szakaszoknak kell megjelenni. Az eredeti másodlagos szerkezet átmeneti megbomlása feltétele a templát-funkciónak, de valószínűleg bármely más olyan reakciónak is, melyben jelentősége van a DNS bázissorrendjének. Harmadsorban, a kromoszómák DNS-ének szabályos harmadlagos szerkezete van. A harmadlagos szerkezet eredményeképpen élőben a DNS sokkal tömörebb felépítésű, mint alacsony ionerősségű sóoldatokban a fehérjementesített DNS.

A hetvenes évek közepéig úgy látszott, sem a DNS másodlagos, sem a harmadlagos szerkezetének nincs különösebb funkcionális jelentősége [156]. Az elsőként megismert nukleinsav szintetizáló enzimekkel lehetséges volt kétfonalú DNS templáton DNS-t vagy RNS-t szintetizálni *in vitro*, ebből arra lehetett következtetni, hogy a templátfüggő szintéziseknél a DNS nyitását-csukását maguk a nukleinsav polimerizáló enzimek végzik el. A kromatin harmadlagos szerkezetének jelentőségét általában a DNS tömörülésében keresték. Alighanem a legérdekesebb elektronmikroszkópos felvételek közé tartozik az, amely a parányi T2 fágból detergens hatására kibuggyanó rengeteg DNS-fonalat örökíti meg (*l. kép*) [78]. Bár a kép az árnyékolás miatt a DNS-t a valóságosnál jóval vastagabbnak, s ezért többnek mutatja, mégis fogalmat alkothatunk, mennyire szorosan feltekeredett állapotban van a DNS a fág-részecskében.

Régi megfigyelések alapján arra lehetett gondolni, hogy a DNS szoros tömörülése az inaktív DNS-re jellemző: magvas vörösvérsejtek, kis limfociták

* Jelenlegi cím: Fővárosi László Kórház Klinikai Kémiai Osztály, Budapest.



1. kép. A T_2 fágból felszabadított DNS elektronmikroszkópos képe [78]
 Pict. 1. Electron microscopical pattern of DNA released from T2 phage particle [78]

sejtmagjai, spórák, virionok DNS-e valóban igen kompakt felépítésű. Az elv igaznak látszott fordítva is, mert az embrionális sejtek, anaplasztikus daganatsejtek magállománya laza szokott lenni, a biokémiailag elkülöníthető aktív „eukromatin” lazább szerkezetű, mint az inaktív „heterokromatin”. Mind-ebből olyan szemlélet alakult ki, hogy a DNS harmadlagos szerkezete a tömörülést szolgálja, s templátműködéséhez a DNS-nek el kell lazulnia.

Az utóbbi években kiderült, hogy a DNS másodlagos és harmadlagos szerkezetét egy sor, többé-kevésbé autonóm jelentőségű struktúrféherje és enzim szabályozza, ezek nélkül gyakorlatilag egyetlen DNS-hez kötődő funkció sem tud zavartalanul lefolyni. A replikáció, transzkripció, DNS reparáció és a rekombinációs folyamatok egyaránt számos kofaktort igényelnek a nukleinsav polimerázok és ligázok működése mellett. A nukleinsav polimerázok felfedezése óta szinte áttekinthetetlenül sok faktort írtak le, melyek az egyes enzimek működését befolyásolják. Napjainkra kezd kialakulni egy olyan kép, hogy a faktorok egy része a DNS másodlagos vagy harmadlagos szerkezetét befolyásolja, s ezen keresztül van hatással a nukleinsav szintetizáló rendszerekre.

A DNS szerkezetét befolyásoló faktorok egy meglepően logikus rendszerbe foglalhatóak (1. ábra). Egyik fő csoportjuk a DNS másodlagos szerkezetére van hatással, a DNS kettősspirális szétcsavarodását, szétcsavart állapotban megtartását, kettősspirálissá újraegyesülését segítik, pontosabban többnyire egyet-egy a felsoroltak közül. E faktorok között vannak struktúrféher-

jék, melyeknek szerepe az, hogy a DNS-sel stabilis nem-kovalens komplexeket alkotnak, s vannak enzimek, melyek működéséhez legtöbbször az ATP szolgáltatja az energiát. A DNS másodlagos szerkezetét befolyásoló faktorok közös jellemvonása, hogy erősen és specifikusan kötődnek egyfonalú DNS-hez.

A másik fő csoportba tartozó faktorok a DNS harmadlagos szerkezetét befolyásolják, főleg kétfonalú DNS-hez kötődnek. A DNS harmadlagos szerkezetét befolyásoló struktúrfehérjék és enzimek esetében azt várnánk, hogy sokféle alakzat kialakításában vesznek részt. Lehet, hogy ez így is van, viszont amit ma ismerünk, az tulajdonképpen egyetlen strukturális jellemző: a DNS kettősspirális felcsavarodása szuperspirálissá.



1. ábra. DNS szerkezetére ható fehérjefaktorok
Fig. 1. Factors affecting the structure of DNA

Élőben a DNS majdnem mindig cirkuláris (vagy legalábbis zárt alakban) fordul elő, a lineáris duplex forma inkább DNS átviteli folyamatokra (fág-fertőzés, konjugáció stb.) jellemző. A cirkuláris duplex DNS-ben a másodlagos szerkezetet rögzíti a DNS-szálak kovalens kötésrendszere. Ha valamilyen okból (hőmérséklet, ionerősség változása, fehérjék kapcsolódása stb.) változik a DNS másodlagos szerkezete, a gyűrűvé rögzített DNS ezt csak úgy képes követni, ha maga a DNS-duplex vet hurkokat (l. később). Kiderült, hogy a DNS élőben csaknem mindig szuperspiralizált, tehát a kétfonalú DNS maga is spirálisan felcsavarodott, s ennek elsődleges szerepe *nem* a DNS tömörülésében keresendő. Ez a szuperspiralizáció mindig negatív, egy olyan helyzetnek felel meg, amikor a DNS kettősspirális az adott körülmények között legvalószínűbb helyzethez képest kissé szét van csavarva. Sok bizonyíték van arra, hogy a DNS-nek ez az „előfeszítése” megkönnyíti, hogy a nukleinsav polimerázok a DNS-t átmenetileg denaturálják. Valószínűleg ugyanez a mechanizmusa annak is, hogy a DNS pontszimmetrikus, palindroma-szakaszain stabilisan „fülek” keletkezhetnek, a palindromák strukturálisan is megkülönböztethetőkké válhatnak a DNS többi szakaszaitól. A DNS harmadlagos szerkezetét meghatározó faktorok végső fokon mindig erre a negatív szuperspirálisra vannak valamilyen hatással. Az egyfonalú DNS-kötő faktorokhoz hasonlóan, itt is találkozunk struktúrfehérjékkel és enzimekkel egyaránt.

Ismételten szeretném hangsúlyozni, hogy a vázolt szuperspiralizáció, s a kromoszomális DNS-t tömörítő szuperspiralizáció valószínűleg eltérő jelentőségűek. A kétfonalú DNS negatív szuperspirálissá csavarodása alighanem általános érvényű, egyaránt megvan az aktív és inaktív kromatinállományban. Ez a szuperspirális a kromoszómákban még többszörösen felcsavarodik, s ez is nyilván nagyon finoman szabályozott folyamat lehet. Gondoljunk például arra, hogy az első meiotikus oszlás alatt milyen magas fokban rendezett a kromoszómák kompaktizációjában bekövetkező változások sorozata! Ezeknek a magasabb szuperspiralizációknak a mechanizmusáról, élettani jelentőségéről ma még keveset tudunk, legalábbis molekuláris szinten, így ebben az összefoglalóban nem is térek ki rájuk.

Az összefoglalóban igyekeztem magam a szakirodalomban jelenleg elfogadott véleményekhez kötni, csak ott tükrözi saját állásfoglalásomat, ahol hiányzott vagy nyilvánvalóan elavult a megfelelő review-irodalom.

Egyfonalú DNS-hez kötődő fehérjék

Technikailag a „DNS-kötő” fehérjék elkülönítése az affinitás-kromatográfiai módszerek elterjedésével esik egybe. Az agarózon vagy cellulózon immobilizált natív vagy denaturált DNS-t többnyire DNS-templátfüggő enzimek elkülönítésére kívánták alkalmazni, hiszen ezek működése eleve magas DNS-affinitást tételez fel. Gyorsan kiderült, hogy a DNS-függő enzimeken kívül nagyszámú más fehérje is képes igen erősen DNS-hez kötődni, s e fehérjék között sok enzim is található. Az erősen savanyú DNS-sel a fehérjék nagy része képez valamilyen komplexet, így a specifikus DNS-fehérje kapcsolódás határa nehezen vonható meg. Mindenesetre a legtöbb, nagy DNS-affinitású fehérje a fiziológiásnál jóval magasabb ionerősség mellett is kötve marad a DNS-hez, így elválasztható a nem-specifikusan kötődő fehérjéktől.

Az egyfonalú DNS-hez preferenciálisan kötődő fehérjék hatására könnyebb lesz a DNS kettősspirális denaturációja, illetve a már kialakult denaturált DNS-szakaszok stabilizálódnak. E stabilizáció kettős értelmű. Jelenti azt, hogy a DNS megmarad denaturált állapotban, de azt is, hogy nem gombolyodik szabálytalan csomóvá, kiterített fonalat képeznek hosszabb DNS szakaszok is. Az egyfonalú DNS-kötő fehérjék legfontosabb közös jellemvonása az, hogy a DNS másodlagos szerkezetére vannak hatással, a kettősspirális nyitását—visszazárását segítik valamilyen formában.

Spiráldestabilizáló fehérjék (sdf-k)

A spiráldestabilizáló fehérjék nem rendelkeznek olyan *enzimaktivitással*, melynek szerepe lenne a DNS szerkezetének megváltoztatásában. A fehérjecsoportok elnevezése nem egységes. Legkorábban DNS-kötő fehérjének (DNA-binding protein) nevezték őket [7], majd kicsavaró, unwinding fehérjének [113], később spiráldestabilizáló fehérjének (sdf, Helix Destabilizing Protein, HDP). A KORNBERG csoportja újabban az egyfonalú DNS-kötő fehérje (Single-Strand Binding Protein, ssb) elnevezést használja [52].

CHAMPOUX a sdf-k közös jellemvonásaként az alábbiakat sorolja fel: a) hődenaturáció során csökkentik a duplex DNS olvadáspontját; b) esetleg csökkentik az adott DNS renaturációjához optimális hőmérsékletet; c) egy-

fonalú DNS-hez kötődve gátolják nukleázok hatását; *d*) optimális konformációt hoznak létre egyfonalú DNS-en bizonyos folyamatok során (pl. a replikációban); *e*) más fehérjékkel vagy enzimekkel kölcsönhatásban stimulálnak olyan folyamatokat, melyekben egyfonalú DNS szerepel [31].

A spiráldestabilizáló fehérjék felsorolt jellemzői nem egyformán érvényesek mindegyikükre, valószínűleg azért, mert funkcionálisan két fő csoportra oszlanak. Az első csoportba azok a sdf-k sorolhatók, melyek a templátfüggő szintéziseket segítik, a másodikba azok, melyek a genetikai rekombinációs folyamatokhoz szükségesek. FALASCHI és munkatársai eukarióta sdf-eket összehasonlítva két típusukat különítették el [45], melyet az *I. táblázatban* mutatunk be. Bizonyos megkötöttségekkel ugyanez áll prokarióták sdf-jeire is.

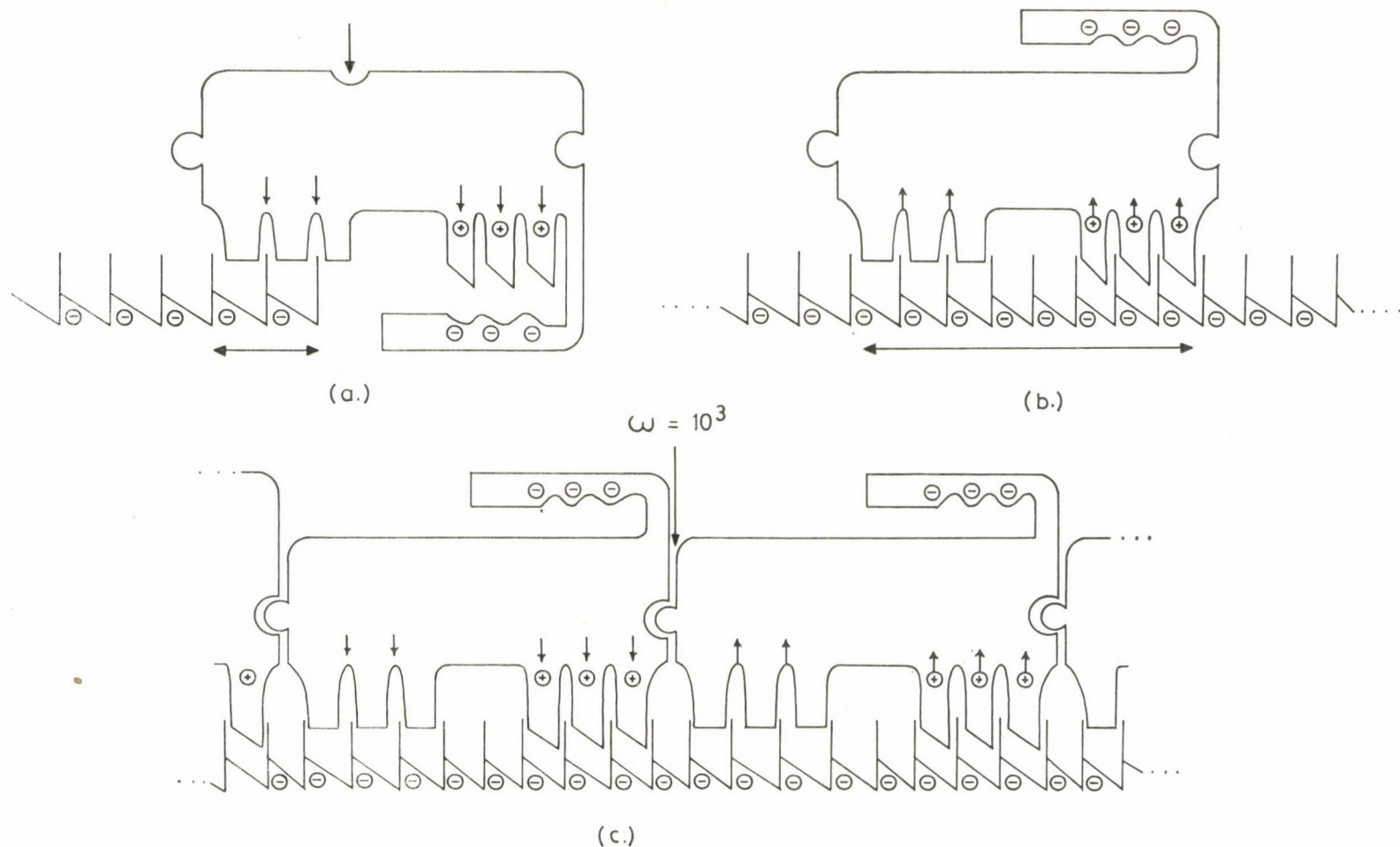
I. táblázat
A spiráldestabilizáló fehérjék tulajdonságai
 Table I. Properties of helix destabilizing proteins

	Replikációs sdf-k	Rekombinációs sdf-k
Meggyorsítják denaturált DNS renaturációját	—	+
Az egyfonalú DNS-t stabilizálják	+	—
A DNS-polimerázok valamelyikét stimulálják	+	—

1. Replikációs spiráldestabilizáló fehérjék

A T4 fág 32. gén terméke. Az első sdf-t T4 fággal fertőzött *E. coli* sejtekből izolálták [7], s mind ez ideig a fizikailag legjobban ismert ilyen fehérje. Relatív molekulatömege 35 000 dalton, erősen aszimmetrikus molekulájú fehérje, oldatából könnyen aggregálódik [24]. A fehérjelánc N-terminális része hidrofób, ez látszik felelősnek a fehérjék egymáshoz való kötődéséért, míg a C-terminális terület bázikus jellegű, ez kerül a DNS-sel közvetlen kölcsönhatásba [78, 82, 93]. A fehérje a DNS-sel kooperatív kötésbe kerül, ha hosszabb egyesláncú DNS-szakaszhoz több T4-32 fehérje kötődik. Ilyen esetben a kötődés egyensúlyi állapotja kb. ezerszer nagyobb, mint az egyes fehérjemolekulák egymástól független kötési pontokon való kapcsolódása esetén, vagyis az erős kötődésben a fehérje — fehérje kölcsönhatásoknak döntő szerepük van [82]. Telítési állapotban egy molekula T4-32 fehérje 7—10 nukleotidnyi egyfonalú DNS szakaszt fed be, mely ezáltal nukleázrezisztenssé válik [67]. A kapcsolódás eredményeképpen a DNS-lánc erősen megnyúlik, a bázisok közti távolság, ami denaturált DNS-ben átlagosan 0,29 nm, 0,46 nm-re növekszik [41]. A fehérjemolekula méretei olyanok, hogy telítési állapotban a szomszédos sdf-molekulák összeérnek, így érthető, miért válik a DNS nukleázrezisztenssé.

Szintetikus duplex, poli[dAT] denaturációja T4-32 fehérje jelenlétében már szobahőmérsékleten bekövetkezik 62 °C helyett, de hasonló olvadáspont csökkenés nem mutatható ki természetes DNS-en [7, 70]. Ezt azzal lehet magyarázni, hogy a fehérje csak akkor képes erős, kooperatív kötésre, ha néhány DNS-hez kötődött fehérjemolekula már egymással is összekapcsolódott. Ilyen csak akkor fordulhat elő, ha aránylag hosszú DNS szakasz spontán denaturálódik, ami természetesen DNS-ekben nem szokott előfordulni [65].



2. ábra. A T4 32-fehérje kapcsolódása egyfonalú DNS-hez

a) — kapcsolódás a DNS-lánc végén; *b)* — kapcsolódás a DNS-lánc mentén, alacsony fehérjekoncentráció esetén (egyenként); *c)* — kapcsolódás magasabb fehérjekoncentráció esetén, fehérje—fehérje kölcsönhatások alakulnak ki, a kötés erőssége kb. három nagyságrenddel megnő [82]

Fig. 2. Binding of T4 phage 32 protein with single-stranded DNA

a) — binding at the end of the DNA chain; *b)* — binding along the DNA strand in case of low protein concentration (separately); *c)* — binding in case of higher protein concentrations. Protein—protein interactions occur, the intensity of the bond is increased by about three orders of magnitude [82]

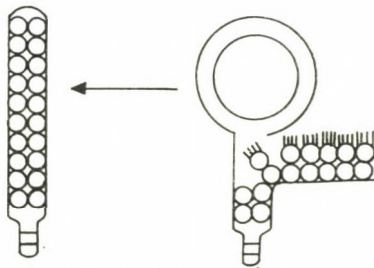
A fehérje kimotripszines, tripszines vagy pepszines korlátozott proteolízisével három stabil hasítási termék állítható elő: 34, 27 és 26 kilodalton molekulatömeggel. A mintegy 1000 dalton tömegű N-terminális B-peptid lehasítása következtében a fehérje—fehérje kapcsolatok kialakulása nem lesz teljesértékű, a 8000 daltonnyi C-terminális A-peptid elvesztésével a maradék affinis lesz kétfonalú DNS-hez [111]. Ha mind az A, mind a B régió hiányzik, a maradék molekula képes szuperspiralizált DNS AT-gazdag szakaszainak lokális denaturációjára [115], így felhasználható DNS morfológiai térképezésére. Legújabban kimutatták, hogy a T4 32-fehérje kétféle mechanizmus révén képes nem-kooperatív kötésre a DNS-sel: a nukleotidlánc végén és lánc közben. Az utóbbi kötési típus lesz stabilisabb, ha a DNS-hez kapcsolódott fehérjék egymással is kapcsolódnak (2. ábra).

A T4 32-fehérje ha magában nem is képes a természetes DNS denaturációjára, más fehérjékkel együtt igen. T7 fág DNS-en bemetszést („nicket”) képezve, a keletkező szabad 3'-OH-t primerként hasznosítva, a T4 DNS polimeráz akkor képes az ép szálat replikálni, ha a bemetszésnél a DNS denaturálódik, egyébként, az enzim egymagában hatástalan. A reakcióelegyhez T4 32-fehérjét adva a bemetszett T7 DNS replikálható T4 DNS polimerázzal, jelezve, hogy a sdf jelenlétében a DNS könnyebben denaturálódik [120].

A T4 fág 32-fehérje jelenléte szükségesnek látszik a vírus normális replikációjához [116, 181] és rekombinációjához [163, 170] egyaránt, vagyis ebben az esetben a két funkció nem válik el egymástól.

Egyéb víruseredetű sdf-k. A T7 fágból izolálható sdf egy 30 000 dalton relatív molekulatömegű, aszimmetrikus fehérje [131, 140], mely minden tulajdonságában emlékeztet a T4 32-fehérjéhez, oldatából aggregálódik, szobahőmérsékleten képes denaturálni a poli [dAT]-t, de a természetes DNS duplexeket nem. *In vitro* stimulálni képes a homológ DNS-polimeráz működését; de más, vírus- vagy baktérium-eredetű polimerázokat nem [61, 132].

A filamentózus fágokból (F1, Fd, M13) izolálható sdf tulajdonságait illetően replikációs kofaktor. A simplex DNS-gyűrűhöz kapcsolódva segíti annak kétfonalú replikációs formává alakulását, a duplex gyűrű replikációjára viszont gátló hatással van [102, 121, 139]. A filamentózus fágokból előállítható sdf jóval kisebb a T-fágokénál ($M_r = 10\ 000$), dimerizálódik, de ennél nagyobb aggregátumokat nem lehet kimutatni [26, 121], jelezve, hogy a DNS-fehérje



3. ábra. fd fág 5 gén fehérje dimérjének kapcsolódása a fág DNS-hez. A kapcsolódás eredményeképpen az egyfonalú DNS-gyűrű nem-komplementer lineáris duplexszé alakul [26]

Fig. 3. Binding of the dimer of gene 5 protein of the phage fd to the phage of DNA. The binding results in the transition of single-stranded circular DNA into a non-complementary linear duplex form [26]

kapcsolódásban a fehérje — fehérje komplexek kialakulása kevésbé fontos. A sdf dimérek képesek viszont az egyfonalú vírus DNS gyűrűt pálcáalakú nem-komplementer duplexszé alakítani (3. ábra) [26].

E. coli spiráldestabilizáló fehérje. A fehérjét biztosan nem fágfertőzött *E. coli*-ból állították elő [113, 155, 175], s templátfüggő szintetikus folyamatok, elsősorban a replikáció kofaktora [104]. Az aktív sdf relatív molekulatömege 88 000 dalton, négy egyforma fehérjelánc tetramerizációjával alakul ki [113, 155]. A tetramér alak a továbbiakban már nem hajlamos aggregációra [175], kb. 35 nukleotid hosszúságú egyfonalú DNS-t köt meg [136], mely ezután messzemenően elveszíti nukleázérzékenységét. A fehérjéhez kötött DNS megrövidül, a bázisok átlagos távolsága 0,18 nm-re csökken, valószínűleg azért, mert a fehérjekomplex állományában felgyűrődik [135]. *In vitro* az *E. coli* sdf gátolja a DNS polimeráz I és III működését, a stabilis DNS-sdf komplex kialakulása miatt. *In vivo* nyilván más a helyzet, hiszen a tulajdonképpeni replikáz nem a DNS polimeráz III, hanem a DNS polimeráz III*-ból és kopolimerázból álló holoenzim [176], ennek működéséhez az *E. coli* sdf éppenséggel szükséges [49]. A fehérje fokozza a DNS polimeráz II működését [112, 155]. Itt sem arról van szó, hogy az enzim · DNS komplex stabilisabb lenne, mint a sdf · DNS komplex, hanem arról, hogy az enzimefehérje először a sdf-vel képez komplexet, amely leválik a DNS-ről. A sdf hatására megnő a DNS polimeráz által kitölthető egyfonalú DNS-rések hossza; ne felejtjük el, hogy a polimeráz II fő funkciója az ilyen rések kitöltése [112].

Hosszú ideig nem sikerült megtalálni a fehérjét kódoló génszakaszt. 1979-ben sikerült találni egy sajátos hőérzékeny mutánst (*ssb-1*), mely ugyan tartalmaz sdf-t, de a vad típusnál hőstabilis fehérje a mutáns esetében 42 °C-on reverzibilisen inaktíválódik. 42 °C-on az *ssb-1* sejtek extraktumával sejtmentes rendszerben nem képződik G4 fág replikatív forma, s maga az *E. coli* replikatív DNS szintézise is leáll. Permisszív hőmérsékleten a sejtextraktummal létre lehet hozni a G4 fág replikációját, bár ez lassabb, mint a vad sejtekből származó extraktum esetében [52, 104, 105]. Az *E. coli* géntérképén az *ssb-1* gén 90,8 percnel van, ezt a lokuszt eredetileg *lexC* génként írták le, s az indukálható („SOS”) reparációban van jelentősége [71]. Ezek szerint, mint az *in vitro* adatok alapján az várható is volt, az *E. coli* sdf *in vivo* is replikációs kofaktor.

Antitesttitrálassal meghatározva kb. 300 sdf molekula található egy coli-sejtben, ez néhány replikációs villa „kitámasztására” lehet elegendő [175].

A sdf erős kötődésével magyarázható, hogy gátolja egyes olyan, templátfüggő enzimekhez kapcsolódó exonukleáz aktivitásokat, melyek *in vivo* nem elsődlegesen nukleázként működnek (DNS polimeráz I és III, *recBC* nukleáz) [112].

Eukarióták replikatív sdf-ei. Eukarióta sejtekből számos sdf-t sikerült előállítani, ezek többsége stimulálja az α -típusú DNS polimerázt. Bizonyos óvatosságra int, hogy mint azt az előbbi mikrobiális sdf-eknél láttuk, a DNS polimeráz *in vitro* stimulációjából nem feltétlenül lehet következtetni az élőben kifejtett hatásra. Eukarióta sejtekből kivont DNS-kötő fehérjék esetében ezt a kritériumot mégis valamivel komolyabbnak kell tekinteni. A DNS-fehérje kapcsolódás ezeknél nem kooperatív (egyetlen növényi eredetű sdf kivételével), s így lényegesen gyengébb, mint a mikrobiális spiráldestabilizáló fehérjéké. E gyengébb kötés elegendőnek látszik arra, hogy a DNS komplementer láncait szétválasztva tartsa, de nem akadályozza a replikációs enzimek elmozdulását a DNS mentén. Az eukarióta sdf-ek által kiváltott DNS polime-

ráz stimuláció mértéke nagyon eltérő, 3-tól 50-szeres aktivitásfokozódást sikerült megfigyelni [45].

A legbehatóbban tanulmányozott állati eredetű sdf a borjútimuszából izolálható 24 000 relatív molekulatömegű UP 1 fehérje (*unwindig protein*), mely izoelektromos fókuszálással 4–5, igaz, nagyon közeli, 7 körüli izoelektromos pontú szubfrakcióra választható szét [56]. Az UP 1 fehérjék a borjútimusz fehérjetartalmának kb. egy ezrelékét teszik ki, specifikusan kötődnek egyfonalú DNS-hez [56]. A poli[DAT]-n kívül a természetes natív DNS-ek olvadáspontját is leszállítják, viszont nem segítik a denaturált DNS renaturációját [58]. Egy fehérjemolekula hét nukleotid hosszban kötődik az egyfonalú DNS-hez [56]. Mivel a DNS renaturációját az UP 1 frakció nem fokozza, leíróik feltételezték, hogy *in vivo* a DNS denaturációjában játszik szerepet, s nem a már meglévő denaturált DNS-szakaszok stabilizációjában [58, 59]. Újabban az a vélemény, hogy a sdf-k az aktív denaturációs mechanizmusok (helikázok, polimerázok) segítő faktorai, s magukban nem képesek a DNS kettőspirális megbontására.

Az egér ascites-sejtekből kivonható sdf ($M_r \approx 30\,000$) figyelemreméltó tulajdonsága, hogy DNS-kötési tulajdonságai és α -polimeráz stimuláló hatása erősen függ a fehérje foszforilációjától [124]. Ha a fehérjét homológ, kromatin-eredetű fehérjekinázal foszforilálják, az α -típusú DNS polimerázra gyakorolt stimuláló hatás elvész. A defoszforilált fehérje preferenciálisan kötődik egyfonalú DNS-hez, foszforiláció után a DNS affinitás is csökken. A DNS-hez kötött fehérje az egyfonalú DNS-t extendált helyzetben tartja. Ezt úgy lehetett bizonyítani, hogy a φ X174 fág DNS-hez emelkedő mennyiségben adva sdf-t, a kapott DNS-fehérje komplex szedimentációs állandója egyre fokozódó mértékben marad el a nukleoproteid molekulásúlya alapján elvárhatótól, jelezve, hogy a DNS kiterített alakot vesz fel [124].

Mivel a magfehérjék tisztításuk során igen hajlamosak spontán defoszforilációra [143], a sdf-k kötési stabilitására vonatkozó adatokat némi kritikával kell fogadni. A legtöbb előállítási módszer erre a szempontra nem fordít figyelmet, s nehéz megállapítani, hogy a tisztított preparátum foszforiláltsága megfelel-e az *in vivo* állapotnak. Nagyon valószínű, hogy a fentebb említett UP 1-fehérjék, melyek pontosan azonos helyzetben mozognak SDS-poliakrilamid elektroforéziskor, de szétválnak izoelektromos fókuszálással, ugyancsak a fehérjefoszfatok mennyiségében különböznek egymástól.

A sörélesztőből előállítható C-fehérje ($M_r = 37\,000$) igen erősen stimulálja a homológ DNS polimerázt, preferenciálisan kötődik egyfonalú DNS-hez. Egy fehérjemolekula 12 nukleotid hosszúságú DNS-szakaszt köt meg [32]. A kukoricaüszög (*Ustilago maydis*) 20 000 dalton tömegű sdf-e hasonló tulajdonságokkal rendelkezik [13, 182].

Vírusfertőzött (HSV, SV, adenovírus 2) sejtekben újabb spiráldestabilizáló fehérjék jelennek meg [125, 130, 152]. Az adenovírus fertőzés esetében az új sdf-k biztosan a vírussal kerülnek a sejtbe [152], a másik két esetben nem világos, hogy azokat a vírusgenom kódolja-e, vagy a fertőzés hatására indukálódnak a gazdasejtben.

Egészséges felnőtt ember vérsavójából kimutatható egy 45 000 dalton tömegű fehérjekomponens, mely erősen kötődik mind natív, mind denaturált DNS-hez. Előrehaladott daganatbetegségben szenvedő betegek szérumából e fehérje eltűnik. Mivel ilyen esetben megnő a vérben keringő szabad DNS mennyisége, feltételezik, hogy ez a fehérje távolítja el a szabad DNS-t a

szérumból, s eltűnése előrehaladott daganatoknál kimerülési tünet lenne [89]. Nehéz lenne megállapítani, hogy az említett fehérje milyen kapcsolatban van a fibronektinnel, egy, a vérplazmában szabadon és a sejtmembránhoz kötve egyaránt előforduló fehérjével, melynek a sejt–sejt kölcsönhatásokban lehet szerepe, s mennyisége csökken metasztatizist képező daganatokban. E fehérje ugyancsak erős DNS-affinitást mutat (asszociációs konstansa $4,6 \cdot 10^{-6}$ M!), s jelentős mennyiségben található kromatinhoz kötve is [186].

2. Rekombinációs spiráldestabilizáló fehérjék

A spiráldestabilizáló fehérjéknek valószínűleg külön csoportját képezik azok, melyek nem a templátfüggő szintézisek kofaktorai, hanem a rekombinációs folyamatokban vesznek részt. Liliom mikrosporocitákból sikerült egy „R-fehérjének” nevezett fehérjét izolálni, melynek megjelenése időbelileg egybeesik a meiotikus rekombinációval. Az R-fehérje alaposabb vizsgálat során DNS-kötő fehérjének bizonyult, mely preferenciálisan egyfonalú DNS-hez mutat affinitást [64]. Az előbbiekből tárgyalat sdf-ekkel ellentétben nem stimulálja a DNS polimerázt, viszont a DNS denaturációját és renaturációját meggyorsítja [64]. A fehérjét alkalikus foszfatázzal kezelve, megszűnik a denaturációt—renaturációt fokozó hatás, ugyanígy a preferenciális kötődés egyfonalú DNS-hez: a defoszforilált fehérje egyaránt kötődik natív és denaturált DNS-hez. A refoszforiláció magában nem állítja vissza a fehérje natív tulajdonságait, ha azt heterológ fehérjekinázzal kísérelik meg. A mikrospermocitákból előállítható, cAMP-független fehérjekináz hatására a fehérje kissé foszforilálódik (kb. 2 foszfátmaradék fehérjemolekulánként), de ez nyilván specifikus, mert az R-fehérje denaturáció—renaturáció gyorsító hatását és egyfonalú DNS-affinitását nagyrészt visszaállítja [64].

A liliom R-fehérjéhez igen hasonló sdf preparálható patkány spermatoocitákból [62]. A liliomhoz hasonlóan a sejtmag lipoproteid frakciójából, tehát a maghártya destrukciója után, az annak törmelékét tartalmazó komplexből állítják elő, de a tisztított fehérje már nem tartalmaz lipidet. Érdekes módon, a fehérje DNS renaturáló hatása Mg^{++} -tartalmú, denaturáló hatása Mg^{++} -mentes közegben érvényesül [97].

A helikázok

A helikázok egyfonalú DNS-hez kötődő enzimek, melyek egy denaturált DNS-szakaszról elindulva a kétfonalú DNS-t denaturálni képesek ATP korszubsztrátum hidrolízise mellett. A helikázok jelölésére ugyancsak meglehetősen tarka terminológia alakult ki az évek során. Eleinte DNS szétesavaró enzimnek (DNA unwinding enzyme, DNA untwisting enzyme) nevezték, majd egyszerűen DNS-függő ATPáznak. Újabban a helikáz elnevezés terjedt el.

ABDEL-MONEM és HOFFMANN-BERLING szerint a helikázok legfontosabb közös jellemzői a következők: *a)* az enzim működése során ATP hidrolizálódik, s ez a DNS-fonalak szeparációjához szükséges, nem az enzimnek a DNS-komplexből való felszabadításához; *b)* működésükhöz szükség van egy, már előzetesen denaturált DNS-szakaszra, ahova kapcsolódni képesek, s a további denaturációt erről az iniciátor-régióból kiindulva végzik; *c)* az enzim-molekula ATP-től függetlenül is kötődik a DNS-hez; *d)* egy-egy adott enzim csak egy irányban képes a kettősspirálist denaturálni; *e)* az enzimatomikus lánc-

nyitás sebessége általában 1000 nukleotid/sec körül van, vagyis hasonló ahhoz, amellyel a replikációs villa mozog élő sejtben [5].

Mind prokariótákból, mind eukariótákból számos helikázt sikerült izolálni, s a spiráldestabilizáló fehérjékhez hasonlóan, a helikázok működési tulajdonságai különböznek aszerint, hogy templátfüggő nukleinsav szintézist, vagy rekombinációs folyamatot segítenek. A rekombinációs helikázok legfontosabb jellemzője az, hogy nem képesek stimulálni a homológ DNS-polimerázt.

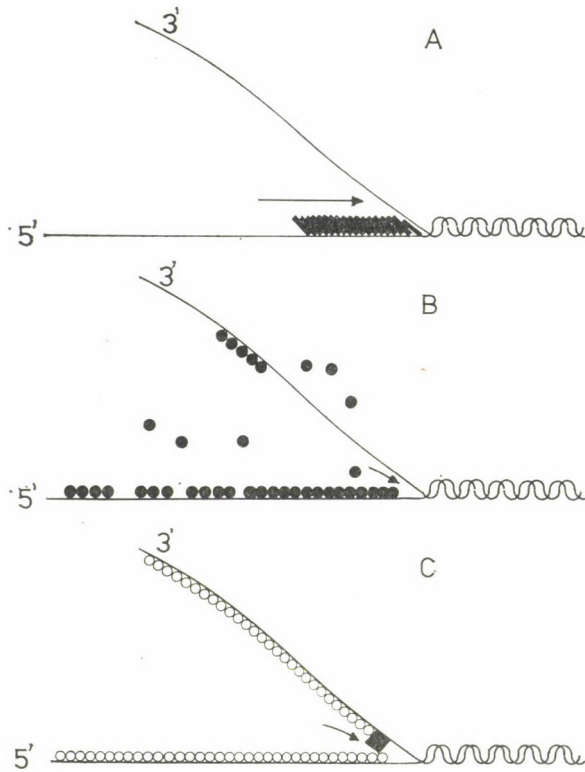
1. Replikációs helikázok

A replikációs helikázok mind baktériumsejtben, mind sejtmag állományában a DNS replikációt segítő faktorok. Hatásuk valószínűen nem korlátozódik a replikációra, hanem más, kétfonalú DNS templáttól függő reakciók is fokozódnak, ha a megfelelő helikáz, a polimeráz működésétől függetlenül, előre szétválasztja. Meg kell jegyezni, hogy a nukleinsav polimerázok működése közben a nukleozid-trifoszfát prekursorokról lehasadó pirofoszfát akkora energiát szabadít fel, hogy ez éppen elegendő a foszfodiészter kötés szintézise mellett a DNS kettőspirális denaturációjához és az enzimmolekula helyválttatásához is. Igaz viszont az is, hogy a csupán DNS-t, polimerázt nukleozid-trifoszfátokat és ionokat tartalmazó *in vitro* rendszerekben akár az RNS, akár a DNS szintézis sebessége két-három nagyságrenddel alacsonyabb, mint *in vivo*, s a keletkező polinukleotidok hossza is jóval elmarad a természetes termékétől.

A DNS-t szétesavaró, ATPáz aktivitású enzimek funkcionálisan további két csoportba sorolhatók. Egy sor ilyen enzim magában nem képes a DNS duplex denaturációjára, csupán más enzimek, pl. DNS polimerázok jelenlétében. A DNS helikáz elnevezést tulajdonképpen azoknak az enzimeknek a jelölésére javasolták, melyek magukban, más enzim működésétől függetlenül is képesek a DNS denaturációjára [5]. Összefoglalónkban ezt a megkülönböztetést nem tekintjük döntőnek azért, mert nyilván az „önálló” helikázok is valamilyen más folyamat (szintézis, rekombináció) kofaktorai, így a megkülönböztetésnek csak tisztán enzimológiai jelentősége van.

E. coli helikázok. Az első *E. coli* helikázt, a DNS helikáz I-et 1976-ban írták le, s hatásmechanizmusát tekintve egyedülálló a többi hasonló enzim között. Az enzim monomérje 180 000 dalton tömegű, erősen aszimmetrikus (1 : 11) fehérje, mely csak egy aránylag hosszú, 200 nukleotidnyi denaturált DNS-szakaszhoz kapcsolódva képes elkezdni működését [1, 2]. Ehhez, a már eredetileg is denaturált DNS-hez 70–80 enzimmonomér kapcsolódik, s ott fehérje–fehérje kölcsönhatások következtében egységes aggregátummá fűződik, melynek ATPáz aktivitása lesz. Az ATP hidrolízise következtében az aggregátum 5'→3' irányban elmozdul azon a DNS-szálon, amelyen megkötődött, s eközben a kétfonalú DNS-t processzív módon szétválasztja (4/A. ábra). A baktériumsejtben aránylag kevés DNS helikáz I van: 500–700 molekula sejtenként. *In vitro*, sejttmentes baktériumextraktumban a replikatív DNS szintézist a helikáz I ellen termelt antitest nem változtatja meg [5].

Egy évvel a DNS helikáz I felfedezése után találták meg a DNS helikáz II-t *E. coli*-ban, s azt is sikerült valószínűsíteni, hogy azonos a mások által már korábban leírt DNS-függő ATPáz aktivitású fehérjékkel. A DNS helikáz hatás módja alapvetően eltér a helikáz I-étől. Az iniciációhoz szükséges denaturált DNS szakasz jóval rövidebb, kb. 12 nukleotid hosszúságú, s az enzim sztöchio-



4. ábra. Különböző helikázok hatásmechanizmusa A — helikáz I (*E. coli*); B — helikáz II (*E. coli*); C — *rep* fehérje és a helikáz III (*E. coli*) [5]
 Fig. 4. Mechanism of different helicases. A — helicase I (*E. coli*); B — helicase II (*E. coli*); C — *rep* protein and helicase III (*E. coli*) [5]

metrikus arányban kötődik a DNS-hez [86]. Egy enzimmolekula 5 nukleotidnyi DNS szakaszt képes denaturálni, s ezután kötve marad a DNS-hez. Így a DNS teljes denaturációja akkor következik be, ha a DNS enzimmal telítődik. Az enzim relatív molekulatömege 75 000 dalton, nem aggregálódó, globuláris peptid, melynek ATPáz aktivitása DNS-függő. Nem világos viszont, milyen szerepe van az ATP hidrolízisnek a DNS denaturációjában [3, 4].

Sem a DNS helikáz I, sem a helikáz II genetikája nem tisztázott. Egy sor defektív replikációjú mutáns áttanulmányozása után sem sikerült megtalálni egyik enzim helyét sem az *E. coli* géntérképén. *In vitro* modellrendszerben a DNS helikáz elleni antitest gátolni képes *E. coliban* a zárt lambda-fág DNS-gyűrű replikációját [5], így élettani szerepe valószínűleg hasonló reakciókban van. A helikáz II kb. tízszer több példányban van jelen a baktériumsejtben, mint a helikáz I [3].

DNS helikáznak bizonyult a KORNBERG-munkacsoport által talált *rep* fehérje [145, 146]. Az *E. coli rep* mutáns DNS replikációja lassúbb a vadnál, de megtartott, nem képes viszont a replikatív formává alakult ϕ X 174 fág

további replikációjára. A *rep* gén terméke egy DNS-függő ATPáz aktivitású, 65 000 dalton tömegű globuláris peptid. Hatásmechanizmusa olyan, hogy a 3'→5' irányban elmozduló enzim denaturálja a DNS-t ATP hidrolízise mellett, de az csak akkor marad meg denaturált állapotban, ha *E. coli* spiráldestabilizáló fehérje kapcsolódik hozzá (4/C. ábra). Az enzim iniciációjához elegendő egyszerű bemetszés a templátszálon. Az enzimmolekula elmozdulása során a DNS-en nukleotidonként egy-egy molekula ATP hidrolizálódik [80, 183].

A *rep*-deficiens sejtekben nemcsak a baktériumkromoszóma replikációja megtartott, hanem a λ -fágé és a ColEI plazmidé is, vagyis azokban az esetekben, amikor a replikáció rifampicin-érzékeny, RNS-primérből indul ki [146]. A jelenség magyarázata az lehet, hogy az RNS-szintézis során denaturálódó DNS szakasz a DNS helikáz II iniciációját lehetővé teszi, s ez a parentális szálon 5'→3' irányban nyitná a DNS duplexet [183]. A normális replikációhoz szükség lehet mindemellett a *rep* fehérjére is, hiszen, mint említettem, a vad baktérium replikációja gyorsabb, mint a *rep* mutánsoké. *In vitro* is kimutatható, hogy a kétféle helikáz segíti egymás hatását [5].

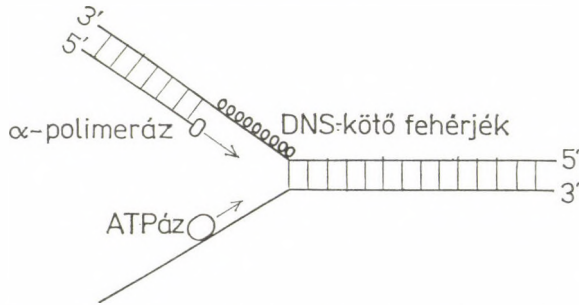
YARRANTON és munkatársai leírtak *E. coli*ből egy további helikázt, melyet DNS helikáz III-nak neveztek el [184, 185]. Az 56 000 dalton tömegű fehérje tulajdonságai a *rec* fehérjére emlékeztetnek: az enzim a templátszálon mozog (3'→5' irányban), működését fokozza az *E. coli* spiráldestabilizáló fehérje, sőt a T4 32-fehérje is [185].

T4 fágfertőzés után a fertőzött baktériumsejtben a DNS helikáz II-höz hasonló, új helikáz jelenik meg, mely a fág *dda* gén terméke [83]. A T4 helikáz molekulánként két nukleotidnyi DNS-hez kötődik, s szintén egy aránylag rövid iniciátor-régiót igényel, nem indul ki egyszerű láncszakadásból [83]. Az enzim tömege 63 000 dalton, de részleges proteolízissel keletkező töredékei közül van egy 22 000-es fragmentum, mely még mutatja az enzim összes tulajdonságait [127]. DEBRECENI és mtsai még 1970-ben leírtak egy T4 fágfertőzés után megjelenő DNS-függő ATPázt, mely hasonlóan alacsony molekulásúlyú (18 000) volt [40]. Valószínűleg a két enzim azonos: a korábban kimutatott DNS-függő ATPáz a T4 helikáz proteolízise során keletkezett, még aktív degradációs terméknek felelhet meg [127].

A T7 fág 4 gén terméke szintén DNS-t szétcsavaró ATPáz. A gén termékét, mint replikációs kofaktort azonosították, mely mind az OKAZAKI-fragmentumok iniciációjához, mind a T7 DNS polimeráz által katalizált DNS szintézis elongációjához szükséges [61, 79, 160]. A 66 000 dalton tömegű fehérjéhez (illetve annak 57 000 dalton tömegű, még aktív degradációs termékéhez) két enzimaktivitás kötődik [142]. Az egyik aktivitás egy denaturált DNS-templáttól függő oligoribonukleotid szintetáz-aktivitás, hasonló jelentőséggel, mint amilyen az *E. coli* *dnaG* fehérjének van [19]: az OKAZAKI-fragmentumok primerjét hozza létre. A másik aktivitás egy DNS-függő ATPáz, helikáz funkcionak felel meg. A két aktivitás élőben valószínűleg nem egyidejűleg, hanem egymást követően jut érvényre [142].

Eukarióta helikázok. COBIANCHI és munkatársai borjútímuszából vontak ki olyan enzimet, mely tulajdonságaiban az *E. coli* helikázokhoz hasonló [33]. Az enzim ATP jelenlétében a DNS processzív denaturációját hozza létre, miközben lényegesen stimulálja DNS-polimeráz- α működését [33]. A stimuláció mértéke poli[dAT]-n 8,4-szeres, RNS-polimerázzal előkezelt (tehát RNS primert tartalmazó) BK vírus szuperspiralizált DNS-en több, mint tízszeres [33]. A borjútímusz helikáz a DNS-en 5'→3' irányban mozdul el, s tulajdonságait

illetően jól megfelel az ALBERTS és STERNGLANZ által javasolt replikációs modellnek [8], melyet az 5. ábrán mutatunk be.



5. ábra. ALBERTS és STERNGLANZ replikációs modellje [8] az eukarióta sejtekre alkalmazva [45]
Fig. 5. Model of replication according to ALBERTS and STERNGLANZ [8] adapted for eucaryotic cells [45].

Valószínűleg helikáz funkciót tölt be a concanavalin-stimulált limfocitákból izolált DNS-függő ATPáz is [123].

2. Rekombinációs helikázok

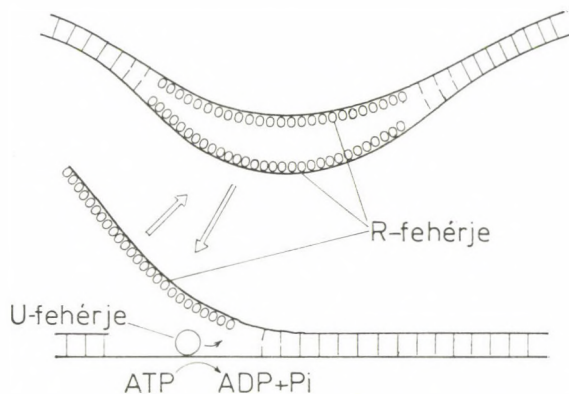
A prokariótákból kivonható helikázok egy része mind a replikációs, mind a rekombinációs folyamatok kofaktora lehet, így felmerül a kérdés, indokolt-e a replikációs és rekombinációs kofaktorok szétválasztása. A messzemenő átfedések ellenére sem szabad elfelejteni, hogy mind a spiráldestabilizáló fehérjék, mind a helikázok meglehetősen heterogén csoportot alkotnak, s e heterogenitásnak nyilván megvan az élettani jelentősége. Egy sor helikáz működése egyértelműen a rekombinációs folyamatokhoz kapcsolódik, így indokoltnak látszik ezek külön csoportba sorolása is.

E. coli recBC fehérje. A normális rekombinációért felelős *recB* és *recC* lokuszok terméke egy 270 000 dalton tömegű összetett fehérje, melyet kezdetben egy ATP-függő nukleázként azonosítottak [53, 72, 94]. Ennek, az „exonukleáz V”-nek a hatásmechanizmusát alaposabban megismerve kiderült, hogy az enzim élőben helikázként működik, s a nukleolitikus aktivitás inkább csak *in vitro* körülmények között mutatható ki, valószínűleg alárendelt jelentőségű kísérő aktivitás [162]. Mint exonukleáz, a *recBC* fehérje mind $5' \rightarrow 3'$, mind $3' \rightarrow 5'$ irányban bontja a lineáris duplex DNS-t, s a termék nem mononukleotid, hanem kisebb-nagyobb oligonukleotidok keveréke. Az oligonukleotid termék nagysága a reakcióelegy ATP-koncentrációjától függ: magasabb ATP koncentráció mellett hosszabbak lesznek a keletkező egyfonalú DNS-fragmentumok [44]. *E. coli* spiráldestabilizáló fehérje jelenlétében gátlódik az enzim nukleolitikus aktivitása, de megmarad a DNS-láncokat szétesavaró helikáz aktivitás [95, 162].

Hasonló természetű enzimet sikerült előállítani *Haemophilus influenzae*-ből, mely kifejezettebb nukleáz aktivitása ellenére is, elsősorban helikáznak tekinthető [177].

Meiotikus helikázok. Az eukarióta sejtekből előállított helikázok egy része olyan objektumból származik, mely sok meiotikus sejtet tartalmaz: liliom

spermatogoniumból vagy hereszövetből [45, 63]. E fehérjék közös jellemvonása, hogy aktív, ATP-függő folyamatban denaturálják a kétfonalú DNS-t, de nem stimulálják a homológ DNS polimeráz- α működését *in vitro* rendszerben. A rekombinációs helikázok feltételezett szerepe az, hogy működésük során denaturálják a meiotikus rekombinációban résztvevő DNS-szakaszokat. E szakaszokhoz a rekombinációs (esetleg egyéb?) spiráldestabilizáló fehérjék kapcsolódnak, s azt átmenetileg denaturált állapotban tartják anélkül, hogy a DNS-szál szabálytalan globulussá csavarodna össze [45]. A folyamat vázlatát mutatjuk be a 6. ábrán. A rekombinációs spiráldestabilizáló fehérjék reverzibilis foszforilációjának abban lehet jelentősége, hogy reverzibilisen megnő vagy lecsökken



6. ábra. A meiotikus rekombinációban résztvevő, a DNS szerkezetére ható faktorok működési modellje [45]

Fig. 6. Model of the mechanism of the factors which affect the DNA structure in meiotic recombination [45]

DNS-kötő képességük, így a denaturált DNS-hurok stabilitása is csak átmeneti. A foszforilációt a sejtmag fehérjekinázok és fehérjefoszfát foszfatázok szabályozni képesek. Minthogy ezek az enzimek részben a ciklikus nukleotidok szabályozása alatt állnak, végeredményben a rekombinációban részt vehető DNS-szakaszok kialakulása és eltűnése bekapcsolódik a sejt általános szabályozási rendszerébe.

Kétfonalú DNS-hez kötődő fehérjék

Az eddigiekben a DNS kettőspirális denaturációjára vagy renaturációjára ható enzimeket és struktúrfehérjéket tekintettük át, vagyis azokat, melyek a DNS másodlagos szerkezetét befolyásolják. A kétfonalú DNS-hez kötődő faktorok mindegyike a DNS magasabb spirálszerkezetének kialakításában játszik szerepet. Bevezetőül hasznosnak látszik röviden áttekinteni a DNS szuperspiralizációjával kapcsolatos alapfogalmakat.

A DNS magasabb spirálszerkezete

Az élő szervezetekben található DNS mindig többszörösen feltekeredve fordul elő, a kromoszómák több ezerszer rövidebbek, mint az őket felépítő DNS-láncok hossza lenne kiterítve. A bevezetőben említett kompaktizáció többszörös spiralizációt jelent, spirálszerkezetek ismételt felcsavarodását. CRICK metafázisos kromoszómára vonatkozó modellje szerint legalább négy spirálrendszer épül egymásra [11].

A DNS funkciója szempontjából a DNS kettősspirális által alkotott első magasabb spirálszerkezet látszik fontosnak, több okból is. Elsősorban, ez a magasabb spirális szerkezet nemcsak a DNS kettősspirális újabb feltekeredése, hanem egy meghatározott, állandó eltérés a DNS „ideális” B-konformációjától, s mint ilyen, az élővilágban univerzális. Másodsorban, ez a magasabb spirálszerkezet nemcsak nukleinsav — fehérje kölcsönhatások révén alakulhat ki és rögzülhet, hanem gyűrűalakú duplex DNS molekulában maga a kettősspirális kovalens kötésrendszere is rögzíti, megmarad a DNS fehérjementesítése után is [166]. Harmadszor, ha a DNS kettősspirális úgy tekeredik fel, hogy ez megfelel a hisztonok DNS-komplexei, a nukleoszómák szerkezetének, a DNS-en hasonló előjelű és sűrűségű szuperspirális menetek alakulnak ki, mint olyan organizmusokban, melyekben nincsenek hisztonok és nukleoszómák. Ez az elsődleges szuperspirális tehát majdnem ugyanolyan állandó szerkezeti jellemzője az élő szervezetek DNS-ének, mint maga a kettős spirális felépítése. Az ennél magasabb spirális szerkezetek, vagyis e szuperspirális további szuperspiralizációjából kialakuló képződmények még nem ismertek eléggé, s valószínűleg kevésbé általánosak.

Jelen összefoglalóban a DNS szuperspirálison csupán a kétfonalú DNS felcsavarodásával előálló, első szuperspirálisról értjük, mivel ennek funkcionális jelentősége kezd érthetővé válni: minden jel arra mutat, hogy ez jelenti a DNS „aktív” térszerkezetét.

A magasabb spirálszerkezet mibenlétét legjobban akkor érthetjük meg, ha gondolatban végigkísérjük WANG és munkatársai kísérletét, melynek segítségével meghatározták a DNS szuperspiralizációjával járó szabadenergia változást [171].

Tételezzük fel, van egy zárt, cirkuláris DNS-ünk, például valamilyen plazmidből, majd endonukleázzal vágjuk be egyik szálra egyetlen lánc törést, vagyis tegyük lehetővé, hogy a bemetszett DNS-szál szabadon elforduljon az ép szálhoz képest. Ezen a molekulán a DNS kettősspirális menetszáma a WATSON — CRICK modellnek megfelelően, eléggé pontosan:

$$\beta = \frac{\text{bázispárok száma}}{10}$$

A spirálisnak ez a β menetszáma a hőmérséklettől függ. Kissé alacsonyabb lesz magasabb hőmérsékleten, a hőmozgás a kettősspirálts kissé „széttengeri”; alacsonyabb hőmérsékleten — fordítva —, kissé magasabb. Ligáz enzimmal zárjuk most vissza a DNS-t gyűrűvé! A gyűrűben található DNS menetszáma nyilván ugyanolyan lesz, mint egy hasonló hosszúságú lineáris DNS molekuláé, hiszen a lánczárás előtt a DNS-en levő láncbevágás lehetővé tette, hogy a DNS az adott körülmények között legvalószínűbb menetszámot felvegye. Valóban, agarózgél-elektroforézissel vagy izokinetikussal centrífugálással a lineáris és a zárt

cirkuláris duplex DNS ilyenkor azonos helyen jelenik meg, feltéve, hogy a DNS hőmérséklete a lánczárás pillanatában és az elektroforézis (vagy centrifugálás) során azonos volt.

Vegyük most azt az esetet, hogy a DNS-t, mondjuk 10 fokkal magasabb hőmérsékleten zártuk gyűrűvé mint az elektroforézis történt. Az 5000 bázispárt tartalmazó DNS menetszáma a gyűrűzárási hőmérsékleten legyen 495. Ez a 495-ös menetszám marad zárt duplex gyűrűben egy olyan, alacsonyabb hőmérsékleten is, ahol a lineáris, vagy bevágott cirkuláris DNS menetszáma már 505 lenne. A menetszám azért marad változatlan, mert a két elemi DNS-szál egymáshoz képest nem tud elfordulni. Alacsonyabb hőmérsékleten tehát az a helyzet, mintha a kettős spirál kissé túl lenne csavarva, s ennek az erőnek a hatására a kettős spirál egészében megcsavarodik, s saját menetirányával ellentétes irányú tíz hurkot vet. Így kialakul a DNS adott hőmérsékletére jellemző menetszám (505) úgy is, hogy a két DNS-szál csak 495-ször csavarodott meg. A példában szereplő szuperspirálist *negatív*nak nevezzük azért, mert az alapspirál menetek száma kevesebb, mint a hasonló nagyságú, de lineáris, így rögzítetlen végű DNS menetszáma lenne hasonló körülmények között, s azért, mert a magasabb spirális menetiránya ellentétes az alapspiráliséval. Mivel a WATSON—CRICK modellben leírt DNS „jobbmenetes”, annak negatív szuperspirális hurkai „balmenetesek”. A gondolatmenetet ellenkező előjellel végigkísérve jutunk a pozitív szuperspirális szerkezethez. Végső fokon a negatív szuperspiralizáció értelme az, hogy ilyenkor a DNS kissé „szét van csavarva”, pozitív szuperspiralizáció esetén „túl van csavarva” a legvalószínűbb menetszámhoz képest.

A kis, néhány ezer bázispár nagyságú DNS-gyűrűk szuperspirális állapota meglepően pontosan mérhető, mert ugyanaz a DNS eltérő szuperspiralizáció esetén eltérő hidrodinamikai tulajdonságokat mutat. A szuperspiralizáció jellemzésekor az alábbi mutatókat használják:

α — *topológiai menetszám, kötési szám* (topological winding number, linkage number) a DNS-gyűrű összes spirálmeneteinek száma. A pontos meghatározás szerint az a menetszám, mely akkor állna elő, ha a DNS-gyűrűt egy síkba kényszerítenénk. Ilyenkor a szuperspirális menetek vagy „rácsavarodnak” az alapspirálra (pozitív szuperspirális menetek), vagy arról „lecsavarodnak” (negatív szuperspirális menetek). A kötési szám minden zárt, cirkuláris DNS molekulára nézve egy állandó érték, mely mindaddig nem változik, míg a DNS-szálak kovalens kötősszerkezete érintetlen marad.

β — *alapspirális menetszám* (helix winding number) az a menetszám, mely adott körülmények között a legvalószínűbb, a DNS gyűrűvel azonos nagyságú lineáris DNS szakasz menetszáma. Ez az érték a hőmérséklet, ionerősség, az oldatban levő kationok minősége szerint változik, de megváltoztatják polikationok (spermin, spermidin), interkaláns szerek (etidiumbromid, propidiumjodid stb.) is.

τ — *szuperspirális menetszám* a kettősspirális által képezett magasabb spirális menetszáma.

A három érték között egyszerű számtani összefüggés van [167]:

$$\tau = \alpha - \beta$$

Az előbbieken elmondott példában $\alpha = 495$, $\beta = 505$, $\tau = -10$ volt. Használatos még egy további mutató, a szuperspirál sűrűség (σ), mely azt fejezi

ki, hogy tíz bázispárra hány szuperspirális menet esik. Tíz bázispár körülbelül egy menetnek felel meg a DNS kettősspirálison, így ez a mutató azt fejezi ki, hogy az alapspirálist a szuperspiralizáció mennyire módosítja.

Az α -érték, a kötési szám, mint láttuk, egy intakt cirkuláris DNS-re nézve állandó, míg a β változó. Az alapspirális menetszám változását a zárt gyűrű nem tudja egyenlíteni, ezért a felesleges vagy hiányzó menetek szuperspirális menetek egyenlítik ki. A szuperspiralizált állapot szabadenergia növekedéssel jár, megszűnése szabadenergia csökkenéssel. Így tehát, ha a szuperspiralizált DNS-gyűrűben akár csak az egyik szál folytonossága megszakad, a DNS szálak elfordulnak az alapspirális menetszámnak megfelelő helyzetbe, a DNS relaxálódik.

Mint említettük, kis DNS-gyűrűk esetében, ahol a szuperspirális menetszám néhányszor tíznél nem nagyobb, agarózgél elektroforézissel elkülöníthetők ugyanannak a DNS-nek különböző szuperspirális menetszámú formái. A szuperspiralizált (+ vagy -) DNS elektroforetikus motilitása a tömörebb szerkezet miatt nagyobb, az alacsonyabb fokban szuperspiralizált DNS vagy relaxált DNS motilitása kisebb. Ugyanez áll a DNS izokinetikus grádiensekben mutatott mozgékonyaságára is.

Mint már említettük, az alapspirális menetszám megváltozik interkalátorok hatására [14, 15]: a bázispárok közé ékelődő interkalátor molekula kissé szétfeszíti egymástól a szomszédos bázispárokat, eközben a spirális is kifordul; egy etidiumbromid molekula interkalációja 26° szétcsavarodást okoz [173]. Negatív szuperspiralizáció esetén láttuk, a kötési szám kisebb, mint az alapspirális menetszám. Ha ilyen DNS-hez interkalátort adunk emelkedő koncentrációban, a spirális szétcsavarodása következtében az alapspirális menetszám csökkenni fog, a DNS-gyűrű relaxálódni kezd, majd ha eléri a kötési számot ($\alpha = \beta$), teljesen ellazul. Az interkaláns koncentráció további emelése, s az alapspirális menetszám további csökkenése következtében a DNS-en ismét szuperspirális menetek jelennek meg, de most már pozitív menetiránnyal. A szuperspirális relaxációja, majd ismételt megjelenése nyomon követhető mind elektroforézissel, mind centrifugálásos és viszkozimetriás módszerekkel.

A szuperspiralitás megítélésének közvetett, de egyszerű módja a DNS által megkötött etidiumbromid fluorimetriás mérése. A DNS által megköthető etidiumbromid mennyiségét telítési állapotban a szuperspiralizáció nem befolyásolja. Negatív szuperspiralizáció esetén, a DNS „előfeszítése” következtében alacsony etidiumbromid koncentráció mellett több színezék kötődik a DNS-hez, mint relaxált állapotban. Így az adott koncentráció mellett megkötött etidiumbromid mennyiségéből következtetni lehet a DNS harmadlagos szerkezetére.

A hatvanas évek közepén ismerték fel, hogy az élővilágban előforduló zárt, cirkuláris DNS-ek mindig szuperspiralizáltak. Tíz évbe került, amíg kiderült, hogy ez mindig egyforma polaritású, vagyis a természetes DNS-gyűrűk negatív szuperspiralizációt mutatnak, s ez feltétele a DNS templátként való működésének [129, 144].

A szuperspiralizáció másik fontos következménye, hogy szuperspiralizált DNS-en tartósan megjelenhetnek az energetikailag teljesen valószínűtlen palindroma-„fülek”. WANG számítása szerint a 7. ábrán látható palindromaszakasz PM2 fág DNS-en, a fiziológiásnál kb. kétszer magasabb negatív szuperspirális menetszám mellett stabilis lesz füles térszerkezetben [65]. Mivel a

1. Hisztonok és a nukleoszomális szerkezet

A nukleinsavak felfedezésével egy időben már MIESCHER felismerte, hogy azok mindig fehérjék kíséretében fordulnak elő. A rajnai lazac spermájában előforduló protamin, majd a libavér DNS kísérőfehérjéje voltak az első közelebbről megismert sejtmag fehérjék [23]. A hiszton elnevezés egy téves munkahipotézisből származik. A folyóban vándorló lazac íváskor nem táplálkozik, s az ivarszervek súlynövekedése az izomfehérjék rovására, az izmok súlycsökkenése mellett következik be. Mivel a spermiumok fő fehérjekomponense, a protamin peptonszerű tulajdonságokkal rendelkezik, azt hitték, hogy az izomfehérjék peptonszerű bomlástermékeiről van szó. Amikor KOSSEL 1884-ben hasonló fehérjét állított elő liba eritrocitákból, azokat szöveti (*hisztogén*) peptonoknak, hisztonoknak nevezte el (a hisztonok szerepéről, biokémiájáról még ma is tanulságos H. BUSCH, egyébként azóta elavult monográfiája [23]).

A hetvenes évek második feléig a hisztonok fő jelentőségét a génexpresszió szabályozásában látták. A hisztonhoz kapcsolódó DNS — legalábbis úgy látszott — a valódi sejtmag jellemvonása, ahol van szöveti differenciáció, vagy legalábbis bonyolult életsiklus, így a genom sokkal nagyobb, mint az adott sejttípusban az aktuálisan működő gének összessége. Logikusnak látszott tehát, hogy a hisztonok a gének aktivációjában — inaktivációjában játszanak szerepet. Miután tisztázódott a DNS jelentősége az öröklésben, nagy lendületet kapott a hisztonok kutatása is, s ma a legjobban ismert fehérjék közé tartoznak. E, könyvtárnyi irodalom akár vázlatos áttekintése is meghaladja a jelen összefoglaló kereteit, de nem is szükséges, mert a funkciót illető munkahipotézisek zöme napjainkra elavult. A hisztonok legfontosabb közös jellemvonásai a következők:

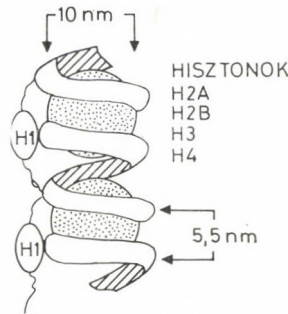
- viszonylag alacsony molekulatömegű (11 000–21 000 dalton), erősen bázikus fehérjék, melyek kiterjedt apoláros szakaszokat tartalmaznak. Többé-kevésbé mindegyikük hajlamos foszforilálódásra és acetilálódásra, csoportosan elhelyezkedő szerin- vagy treonin-csoportokon;
- a hisztonok génjei egymáshoz közel helyezkednek el, csoportokat alkotnak, s e csoportok mérsékelt ismétlődést mutatnak;
- a hisztonok poliA-messengereken, a DNS-sel egy időben szintetizálódnak [73];
- filogenetikailag rendkívül konzervatív fehérjék, az egymástól igen távoli fajok hisztonjai is hasonlóak egymáshoz;
- a DNS-sel *in vivo* komplexet képeznek olyan formában, hogy a DNS közel gömbalakú hiszton asszociátumokra (nukleoszómamagokra) tekeredik fel;
- csak eukariótákban fordulnak elő.

A legjobban ismert hisztonok a borjútimusz hisztonok, ezek teljes aminosav sorrendje is ismert [17]. A legtöbb állati és növényi sejtben ötféle hiszton van: H1, H2A, H2B, H3 és H4. Régebben más jelölésmódok voltak használatosak: H1 = f1, I, KAP; H2A = f2a2, IIb, LAK; H2B = f2b, IIb₂, KAS; H3 = f3, III, ARE; H4 = f2a1, IV, GRK (a hisztonok betűjelzése egyszerűen a három leggyakoribb aminosavra utalt, így pl. KAS = lizin(K), alanin(A) és szerin(S)). Az érett madár eritrocitákban található egy további speciális hisztonféleség is.

A hisztonok közül a H2A, H2B, H3 és a H4 („core” hisztonok) élően egy nyolc hisztonmolekulát tartalmazó komplexszé állnak össze úgy, hogy

azokban két-két azonos hiszton található. A fehérjekomplex közel gömbalakú, átmérője 10 nm, s ez a részecske hozzávetőleg 150 bázispárnyi DNSszakaszhoz kapcsolódik, a DNS nem egészen két csavarmenetnyire tekeredik hozzá. A H1 hisztonok nem vesznek részt e hiszton-asszociátumok kialakításában, ezek kívülről, a már meglévő DNS · hiszton komplexekhez kapcsolódnak [119].

A DNS · hiszton komplex felépítését szándékosan durva közelítésben a 8. ábra mutatja [17]. Bármennyire biztos néhány alapelv, a molekuláris struk-



8. ábra. A nukleosomális szerkezet modellje [17]

Fig. 8. Model of the nucleosomal structure [17]

túra ma még sok ponton erősen vitatott. A legfontosabb alapelv az, hogy az elemi kettősspirális a core-hisztonokhoz kötődve kb. egy hetedére rövidül [47, 50, 54], s a keletkező nukleoproteid szál kb. 10 nm átmérőjű. Már a hatvanas évek második felében ismeretes volt, hogy a kromatinpreparátumokat 0,6 M NaCl oldattal kezelve a H1 hiszton leválik, s az elektronmikroszkópos képen finom, 10 nm átmérőjű szálak jelennek meg [57]. Nagyobb felbontású képen a szálak 7 nm-es szemesék füzérének látszottak [122]. Nukleázemésztéssel a kromatin egy „alegység” és annak többszöröseinek megfelelő nukleoproteid darabokra lehetett felbontani [138]. Natív kromatin elektronmikroszkópos vizsgálatával 12,5 nm átmérőjű szemeséket lehetett kimutatni, amelyeket P. CHAMBON munkacsoportja nukleosómáknak nevezett el [126]. Tisztított hisztonokból és DNS-ből ezután sikerült olyan kromatin-szerű preparátumot rekonstruálni, amely a fenti kritériumoknak megfelelt, elektronmikroszkópos képe ugyanolyan volt, mint az élőből preparált kromatiné [179].

Ezek az adatok valószínűsítették, hogy az eukarióta kromatinra általában jellemző az ismétlődő, nukleoszóma-egységekből való felépítés. A nukleoszóma szerkezetéről ma már igen sok adat áll rendelkezésre, így a részleteket illetően a nagyszámú, kiváló összefoglalóra utalok* [46, 81], itt elsősorban a DNS térszerkezetét és annak biokémiai következményeit tárgyaló munkákra szeretnék hivatkozni.

A nukleoszóma és többszöröseik előállítása kromatinból, a kromatin kíméletes nukleázkezelésével történik [81], elsősorban a DNS-láncokat keresztben elhasítani képes *Staphylococcus* endonukleázzal. Különböző kromatinpre-

* A legrészletesebb áttekintést a 42. Cold Spring Harbor szimpózium anyaga adja (1977).

parátumokat vizsgálva kiderült, hogy fajonként, sőt azonos fajon belül, sejt-típusonként eltérő a nukleoszóma-egységnek megfelelő DNS ismétlődés lánc-hosszúsága: 140 és 240 bp között változik. A nukleoszómalis DNS nukleáz-érzékenysége eltérő. Az olyan preparátumokon, melyekből a H1 hisztont leválasztották, a DNS egy része gyorsan elhidrolizálódik, a maradék viszont meg-
lehetősen nukleázrezisztens [81]. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a core-hisztonek által alkotott oktámérra tapadó DNS-szakasz volt a viszonylag nukleázérzékeny, az ezeket összekötő pedig a nukleázérzékeny [81]. Emellett szól, hogy a nukleázrezisztens „core” DNS hosszúsága meglepően egységes, függetlenül a kromatin eredetétől, kb. 146 bp. A feltehetően ezek közé eső „spacer” DNS-szakasz hosszúsága néhánytól kb. 100 bp-ig változhat, vagyis a DNS-ismétlődések hosszúságának különbözősége a spacer-szakaszok különbözőségéből származik.

Az eukarióták kromatinállományában a DNS negatív szuperspiralizációt mutat, s ez bizonyosan a hisztonektamérekre való feltekeredés eredménye [50]. Nem világos viszont, hogy a teljes DNS ismétlődési egység egyenletesen szuperspiralizált-e, vagy relaxált és erősen szuperspiralizált szakaszok váltakoznak. Fiziko-kémiai módszerekkel e kérdést eddig nem sikerült eldönteni [180]. Az enzimológiai adatok inkább emellett szólnak, hogy egy folyamatosan szuperspiralizált DNS hurkai fekszenek fel a hisztonektamérek felületére. A negatív szuperspiralizáció ugyanis megkönnyíti a templátfüggő reakciók lefolyását, így egyenetlen szuperspiralizáció esetén akár a spacer, akár a core DNS transzkripciója vagy reparációja különböző lenne. Ilyen különbség azonban nem mutatható ki. Ugyancsak az egyenletes szuperspiralizáció mellett szól, hogy a főleg a spacer-DNS-hez kötődő H1 hisztonek preferenciálisan kötődik szuperspiralizált DNS-hez [168].

A nukleoszóma azonnal a DNS replikációja után kialakulnak [147], így valószínű, hogy a DNS negatív szuperspiralizációja a hisztonekhoz való kapcsolódás következtében alakul ki; nem arról van szó, hogy a DNS először szuperspiralizálódik, majd a szuperspiralizált DNS kapcsolódik a hisztonektamérekhöz. *In vitro* ugyanis rekonstruálható nukleoszóma relaxált DNS-ből és hisztonekből, s e folyamatot segíti, ha a reakcióelegyhez topoizomeráz I-et adnak. A topoizomeráz I (l. később) nem képes negatív szuperspiralizációt létrehozni, csupán a DNS-t „hozzáigazítani” az energetikailag mindenkor legvalószínűbb térszerkezethez [51].

A rekonstrukciós kísérletek tanúsága szerint a nukleoszóma kialakulásának kritikus pontja nem a DNS–hisztonek kapcsolódás, hanem a hisztonek oktámérra kialakulása. Az erősen bázikus hisztonek ugyanis neutrális pH-n erősen taszítják egymást, s ez megakadályozza a hisztonektamérra összetartó, a hisztonekmolekulák hidrofób felületei közötti kölcsönhatások kialakulását. A hisztonektamér létrejöttére két elképzelés van. Az egyik szerint először nem a teljes oktámér alakul ki, hanem a H2A és H2B hisztonek egymással dimérré, a H3 és H4 hisztonek tetramérré alkotnak, s a teljes oktámér két hibrid dimérré és egy H3-H4 tetramérré kapcsolódásával jön létre [137]. A másik magyarázat az lenne, hogy egy nukleoplazminnak nevezett savanyú magfehérje neutralizálja a hisztonekakat, melyek ilyen állapotban kapcsolódnak oktámérré, majd a DNS-hez való kapcsolódás következtében a nukleoplazmin leválik a hisztonekról [43, 88, 106, 158]. Nem szabad elfelejteni, hogy a nukleoszóma reverzibilis képződmények, így lehet, hogy a nukleoplazmin nem a nukleoszóma felépítésében, hanem éppen azok felbontásában játszik szerepet [85].

A nukleoszómák állományából felszabadított DNS, ha csak a szálak folytonossága nem szakad meg, szuperspiralizált állapotban marad [55, 75]. Nem ionos detergens jelenlétében, magas ionerősségű ($\mu > 1,0$) sóoldatokkal kezelt sejtmagokból a hisztonok teljesen, a nem-hiszton fehérjék túlnyomórészt kioldódnak, s egy, a sejtmag határait betartó DNS-tömeg marad vissza, melyet COOK és BRAZELL nukleoidnak neveztek [37]. Etidiumbromid kötéssel megállapítható, hogy a DNS — ebben, a már hisztonmentes készítményben — szuperspiralizált szerkezetű marad, vagyis a nukleoszóma-alkotó hisztonokon túlmenően más faktorok is rögzítik a DNS szuperspiralizált szerkezetét [37]. Alacsony röntgen-dózisokkal besugározva a nukleoidot a DNS állományában egyes lánctörések keletkeznek, ezek hatására a DNS relaxálódik, a nukleoid szétesik [35]. A nukleoid relaxációja előidézhető proteázkezeléssel vagy ribonukleáz emésztéssel is, jelezve, hogy a nukleoszómák felületén szuperspiralizálódott DNS-t ebben a helyzetben nem a DNS kovalens kötésrendszere rögzíti, hanem a DNS-hez szorosan kötött nem-hiszton fehérjék és a sejtmag RNS-ei [36, 69]. Különösen a fehérjék látszanak fontosnak, mivel maga a nukleoid preparátum is csak fenilmetil-szulfonilfluorid (PMSF) jelenlétében állítható elő, mely a sejtmag proteázokat az izolálás során hatástalanítja. A DNS szuperspirális szerkezetet kialakító nukleoszóma-szerkezet és a szuperspirális rögzítő tényezők különbözőségére mutat az a megfigyelés, hogy madár vörösvérsjtekben bár a nukleoszóma-struktúra megtartott, a nukleoid nem lesz szuperspiralizált, nyilván a rögzítő tényezők hiánya miatt [36].

A daganatkeltő SV40 vírus minikromoszómája szintén hiszton-nukleoszómákat tartalmaz [54]. Akár a természetes vírusnukleoproteidet, akár a hisztonokból és SV40 DNS-ből rekonstruált — a természeteshez hasonló — nukleoproteidet fehérjementesítik, a visszamaradó DNS szuperspiralizált lesz, feltéve, hogy megmarad a kétfonalú DNS-gyűrű folyamatossága [14, 75]. Ebben az esetben természetesen maga a DNS szerkezet rögzül szuperspiralizált alakban, fehérje- vagy RNS-komplexek nélkül. Az SV40 DNS szuperspiralizációja előben eléggé pontosan megfelel a nukleoszómális szerkezetnek. Egy nukleoszómában 1,25 „menethiány” áll elő, az SV40 DNS 24–25 nukleoszómába rendeződik, így összesen $\tau = -30$ körüli szuperspirális menetszám várható. Valóban, az élő sejtekből preparált SV40 DNS 30–35 „menethiányt” mutat, a DNS megrövidülése pedig pontosan megfelel a nukleoszómális szerkezetű kromatinének: 1/7 [50].

Az SV40 DNS-sel végzett kísérletek másik fontos eredménye az, hogy világossá vált a H1 hiszton kötődésének jellege. A H1 hiszton affinitása a szuperspiralizált DNS-hez jóval nagyobb, mint a relaxálthoz, így valószínű, hogy csak akkor kötődik a DNS-hez, amikor az már feltekeredett a hiszton-oktamérré. *In vitro* a H1 hiszton egyforma affinitással kötődik a pozitív vagy negatív szuperspiralizációjú DNS-hez, de ennek előben valószínűleg nincs jelentősége [168].

A kromatin nukleoszómális szerkezetének biológiai jelentősége valószínűleg a DNS negatív szuperspirális térszerkezetben tartása. A templátfüggő folyamatok bármelyike jóval intenzívebb szuperspiralizált DNS-en, így joggal tartható a DNS aktív konformációjának. E metastabil szerkezetet baktériumokban egy sok ATP-t fogyasztó mechanizmus, a girázműködés tartja fenn. Arról lehet szó, hogy a törzsfajlásban ahogyan megnőtt a genomot alkotó DNS mennyisége, energetikailag egyre nagyobb terhet jelentett a DNS negatív szuperspiralitásának fenntartása girázműködés segítségével. Hisztonszerű

fehérjék vannak baktériumokban is, s valószínűleg ott is ugyanolyan „ruhakasztó” szerepet töltenek be, mint az eukarióták hisztonjai. A természetes szelekció szűrhetette ki magasabbrendű szervezetekben a negatív szuperspiralizációnak ezt, az ugyan pótlólagos fehérjeszintézist igénylő, de a sejtek hosszabb élettartama miatt végső fokon mégiscsak gazdaságosabb mechanizmusát.

A nukleoszóma-szerkezet és a hisztonok biológiai jelentőségének ilyen irányú megfogalmazását sok negatívum is indokolja. Nem sikerült semmilyen adatot találni arra, hogy a DNS – hiszton kapcsolódás jellege más lenne aktív és inaktív kromatinban. A nukleoszómák DNS-e RNS polimerázzal teljes hosszban átírható, a DNS templátfunkciója a nukleoszómákban megmarad [154, 174]. Az aktívan RNS-t szintetizáló eukromatin ugyanúgy nukleoszómális szerkezetű, mint a teljesen inaktív madár eritrocita kromatin. A nukleoszómaképződés során semmiféle specificitás nem mutatható ki a DNS bázissorrendjét illetően [118]. Nem látszik valószínűnek, hogy az elmúlt évek igen beható kutatásai után lehetne várni olyan eredményt, mely a hiszton – DNS kapcsolódáson keresztüli génextpresszió szabályozásra utalna.

2. Prokarióták hisztonszerű fehérjéi

Mint már szó volt róla, nukleoszómákat alkotó hisztonok csak eukariótákban mutathatók ki, s hosszú ideig úgy tartották, hogy hiszton csak valódi sejtmagban fordulhat elő.

1975-ben *E. coli*ből egy 7000 dalton tömegű hőstabilis fehérjét állítottak elő, mely preferenciálisan kötődik kétfonalú DNS-hez [134]. A fehérje hatására a DNS-láncok erős rövidülése és megvastagodása mutatható ki elektronmikroszkópos felvételen. Aminosavösszetételét illetően ez a „HU-fehérje” emlékeztet a hisztonokra, így leíróik már felvetették, hogy filogenetikailag e kétfonalú DNS-kötő fehérjék a hisztonokkal lehetnek kapcsolatban [134]. Később statisztikai módszerekkel bizonyították, hogy az aminosavösszetétel egyezése még a véletlenszerű szórás határán belül van, így a HU-fehérje és a hisztonok esetleges rokonságának kérdése eldöntetlen maradt [87].

1980-ban két munkacsoport egymástól függetlenül bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a prokariótákban valóban hisztonszerű, azokkal minden szempontból rokonságot mutató fehérjék léteznek. A KORNBERG munkacsoportja majdnem teljesen (98%-ig) tiszta formában állított elő egy 28 000 dalton tömegű fehérjét *E. coli*ből, melynek nemesak aminosavösszetétele emlékeztet a H2A hisztonra, hanem az anti-H2A immunsavó neutralizálja. A fehérje spontán dimerizálódik, s e dimérek sztöchiometrikus arányban kötődnek a DNS-hez (75 bázispár dimérenként). A hőérzékenlen, savban oldódó fehérjét „H-fehérjének” nevezték. A DNS-hez kötődve gátolja a homológ RNS-polimeráz és a *rep* fehérje DNS-függő ATPáz aktivitását, ami ugyancsak a hisztonokra emlékeztet. Más hisztonszerű fehérjékkel komplexálódva a H-fehérje nukleoszómákhoz hasonló képződményeket alkot. A fehérje meglepően nagy mennyiségben fordul elő baktériumsejtben, sejtenként kb. 30 000 molekula, ez az *E. coli* kromoszóma egyötödének megfelelő mennyiségű DNS-sel képes komplexet képezni [68].

A másik hisztonszerű fehérjét egy szabadban élő, mikoplazma-szerű szervezetből: *Thermoplasma acidophilum*ból izolálták [148]. A mikroorganizmus rendszertani besorolása nem látszik egyszerűnek. Valószínűleg egy igen ősi fajról van szó, melynek közele rokonai nem ismeretesek. A sejtből kivon-

ható nukleoproteid *Staphylococcus* endonukleázzal emésztve ismétlődő egységekre emészthető, elektronmikroszkópos felvételen a nukleoszómákra emlékeztető, gyöngyfűzér-szerű kép látható. A nukleoproteidben a DNS és a hozzá kapcsolódó „HTa fehérje” aránya 1 : 0,6 [149]. A kb. 11 000 dalton tömegű (102 aminosavat tartalmazó) fehérje spontán tetramerizálódik, s kimutatható, hogy a kétfonalú DNS ezekre a tetramér partikulumokra nukleoszóma-szerűen feltekeredik. Az egy fehérjetetramérra eső DNS-szakasz sokkal kisebb, mint nukleoszómáknál, kb. 40 bp partikulumonként [149].

A HTa fehérje N-terminális szakaszának ismert az aminosavsorrendje, s ez messzemenő egyezéseket mutat a borjútímusz H2A hiszton, illetve az *E. coli* HU-fehérje N-terminális szakaszával [150]. Ezeket az aminosav-sorrendeket mutatja a 9. ábra. Az eukarióta eredetű hiszton és a HU-fehérje közötti rokon-

	(1)	(5)	(10)	(15)	(20)
H2A	-Thr-Ala-Glu-Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-Arg-Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg-Ile-Ile-Pro-Arg-His-				
HTa	Met-Val-Gly-Ile-Ser-Glu-Leu-Ser-Lys-Glu-Val-Ala-Lys-Lys-Ala-Asn-Thr-Thr-Gln-Lys-Val-Ala-Arg-Thr-				
HU	Met-Asn-Lys-Ser-Gln-Leu-Ile-Asp-Lys-Ile-Ala-Ala-Gly-Ala-Asp-Ile-Ser-Lys-Ala-Ala-Ala-Gly-Arg-				

● = azonos aminosav

○ = aminosavcsere egyetlen bázis mutációjával

9. ábra. ● = azonos aminosav; ○ = aminosavcsere egyetlen bázis mutációjával

Fig. 9. ● = identical amino acid; ○ = change of amino acid by the mutation of a single base

ságot a *Thermoplasma* HTa fehérje kétirányú rokonsága közvetíti. Ősi mikroorganizmusról lévén szó, nyilván nem arra kell gondolni, hogy a *Thermoplasma* átmenetet képezhet a bélbaktériumok és az eukarióták között, hanem arra, hogy a törzsféjlődés két ágán megőrződött valamilyen hasonlóság egy közös, korábbi rokonsághoz.

Nem egészen világos a hisztonszerű fehérjék élettani szerepe, bár mind-egyikük képes kétfonalú DNS-sel kapcsolódni. A HU fehérjét mint transzkripció kofaktort izolálták, a másik két hisztonszerű fehérje inkább gátolni látszik az *in vitro* RNS-szintetizáló rendszert. A nukleoszóma-szerű képződményekben eddig még nem sikerült közvetlenül megállapítani, változik-e a kötött DNS szuperspiralizációja. Mindezek ellenére ma már valószínű, hogy valóban a hisztonok filogenetikai előfutáiról lehet szó, ha eredeti funkciójuk nem is a szuperspirális szerkezet rögzítése volt.

A topozomerázok

A kétfonalú DNS térszerkezetét módosító enzimek jelölésére újabban a topozomeráz elnevezés vált általánossá. Közös jellemvonásuk, hogy a zárt, kétfonalú DNS-gyűrűk topológiai menetszámát képesek megváltoztatni úgy, hogy az enzim működése során nem keletkezik maradandó lánctörés a DNS-ben. Az természetesen nem lehetséges, hogy az enzimreakció során, átmenetileg, legalább az egyik DNS-szál ne szakadjon meg, de a topozomeráz működés során ez, az enzimkomplex állományában kialakuló lánccszakadás mindig újra bezárul. A topozomerázok elmondott működése mellett van még egy, eddig nem pontosan értett funkciójuk, ez a zárt DNS-gyűrűk egymásba öltése,

illetve az egymásba fűzött DNS-gyűrűk szétválasztása (katenáció és de-katenáció).

A topoizomerázok két csoportra oszthatók. Az egyik csoport (I típusú topoizomerázok) a topológiai menetszámot egyesével képes megváltoztatni; az érintett DNS-gyűrűknek csak egyik szálán keletkezik átmenetileg bevágás. Ezek az enzimek, ha igényelnek is ATP-t működésükhöz, relaxáló enzimek, hatásukra fehérjementes DNS-en a pozitív vagy negatív szuperspirális menetszám mindig csökken. Az I típusú topoizomerázok valószínűleg minden élőlényben előfordulnak.

A topoizomerázok másik csoportját a II típusú topoizomerázok képezik. Ezek hatására a topológiai menetszám kettesével változik, a reakció során az enzimkomplex állományában mindkét DNS-szál folytonossága megszakad. A II típusú topoizomerázok között van olyan, amely az ATP kosubsztrátum energiájával képes a DNS gyűrűt szabadenergia növekedéssel járó reakcióban negatív szuperspirális szerkezetűvé alakítani. Ezeket az enzimeket DNS-giráz-nak is nevezik, s a girázok valószínűleg csak prokariótákban fordulnak elő. A kétféle topoizomeráz tulajdonságait a II. táblázatban foglaltuk össze [39].

II. táblázat
A topoizomeráz hatás jellemzői

Table 2. Characteristics of the effect of topoizomerases

Reakció	I. típusú	II. típusú
	topoizomeráz	
Az átmeneti DNS láncszakadás	csak az egyik szálon	mindkét szálon
A kötési szám változása	egyesével	kettesével
Katenátképzés	egy bevágott és egy ép DNS gyűrű között	két ép DNS gyűrű között

1. I. típusú topoizomerázok

1971-ben WANG *E. coli*ből [172], majd röviddel ezután CHAMPOUX és DULBECCO embrionális egér sejtekből [27] vontak ki olyan enzimaktivitású fehérjét, mely képes volt a szuperspiralizált DNS relaxációjára anélkül, hogy ezután a DNS-en lánctörést lehetett volna kimutatni. Mindkét esetben rendkívüli kísérleti teljesítményről volt szó, hiszen bizonyítani kellett, hogy a preparátum mentes mindennemű nukleázzszennyezéstől, s a relaxálódott DNS valóban intakt. Ráadásul, abban az időben a szuperspiralizált DNS elektroforetikus analízise még nem terjedt el, s minden egyes DNS-mintát napokig kellett CsCl-propidiumjodid grádiensből centrifugálni. A nehézségek ellenére, pár éven belül a legkülönbözőbb sejtfeleségekből sikerült az enzimet előállítani, s közös jellemvonásuk volt, hogy működésükhöz energiadús kosubsztrátumra *nem* volt szükség [10, 16, 29, 74, 77, 91, 101, 151, 159]. A kosubsztrátum hiánya azért érthető nehezen, mert a DNS relaxációja csak úgy képzelhető el, hogy az enzim egy ponton bemetszi a DNS szálát, majd amikor a DNS ellazul — a törtvégek legalább egyszeri körbe fordulása következtében —

a felbomlott foszfodiészter kötésnek újra kell képződnie. A felbomló foszfodiészter kötés energiáján kívül a DNS-lánc szuperspiralizációjából származó konformációs energiának is tárolódnia kell az enzimfehérje konformációs energiája alakjában, hogy ugyanaz a kötés újra létrejöjjön, de még így is nehezen fogható fel, hogyan. Valószínűleg inkább az a helyzet, hogy egy korábbi, ATP-fogyasztó folyamatból kapott konformációs energia teszi lehetővé az enzim működését koszubsztrátum felhasználása nélkül. Ha ez az energia több átfordítási ciklusra elegendő, s ha az enzim nagy feleslegben van a — nehezen preparálható, így igen takarékosan használt — szuperspiralizált DNS-szubsztrátumhoz képest, a folyamat energiadús koszubsztrátumtól függetlennek tűnhet.

WANG javaslatára, az eredetileg DNS-relaxáló enzimnek nevezett csoportot swivelase-nek („tekeráz”) jelölték, de elterjedt a hatásmechanizmusára utaló nicking-closing enzime (bevágó – záró enzim) elnevezés is [16]. A jelenleg használt topoizomeráz I akkor terjedt el, amikor kiderült, hogy sem az egyirányú, relaxáló aktivitás, sem az ATP-függetlenség nem tartozik az enzimek biológiai szerepének lényegéhez [39].

E. coli ω -fehérje. Az enzim egyetlen, 110 000 dalton tömegű molekula [172]. Preparálható két alegységből (56 000 és 31 000 molekulatömeeggel) álló formában is [22], de nem világos, hogy az utóbbi alak, mely nyilván az előbbi részleges proteolízisével jön létre, felel meg a fiziológiás enzimnek, vagy a még bontatlan ω -fehérje.

Az ω -fehérje specifikusan, csakis a negatív szuperspiralizációjú DNS-t képes relaxálni, s a reakció függ a szuperspirális menetszámtól: a relaxált állapothoz közeli, alacsony szuperspiralitású DNS-re már nincsen hatással [172]. Ha etidiumbromid interkalációjával a szubsztrátumként használt DNS-en pozitív szuperspiralizációt hoznak létre, ezt az ω -fehérje nem képes relaxálni (a színezék magának az enzimnek a működését nem befolyásolja). Az enzim működése függ a reakcióelegy Mg^{++} -koncentrációjától, az egyértékű kationoktól viszont csak annyiban, hogy 0,3-nál magasabb ionerősség a reakciót gátolja [172].

Az enzim DNS-gyűrűket összekapcsoló hatását 1976-ban ismerték fel, amikor kiderült, hogy DNS relaxáló enzimmal kezelt kétfonalú, cirkuláris DNS egy részének megnő az *alkalikus* szaharózgrádiensben mért szedimentációs állandója [9]. Elektronmikroszkópban valóban, egymáshoz kapcsolódó gyűrűk voltak kimutathatók. Legújabban kiderült, hogy ez a kérdésnek csak az egyik oldala, mert az ω -fehérje nemcsak összekapcsolni képes, hanem egymásba is tud fűzni két DNS-gyűrűt [165]. A kétféle reakció vázlatát a 10. ábra mutatja. A gyűrűk egymásba fűzéséhez (katenáció) nincsen szükség szekvencia homológiára, mert két különböző DNS-gyűrű is összekapcsolódhat. TSE és WANG ilyeténképpen PM2 és pBR322 DNS-gyűrűket egyesítettek [165]. A katenációs reakció feltétele, hogy az egyik cirkuláris DNS-en legyen bevágás [39], s ez látszik a leglényegesebb különbségnek a II típusú topoizomerázok által katalizált katenációs reakcióval szemben. A katenációs aktivitás optimális feltételei eltérnek a DNS-relaxáló aktivitásaitól: Mg^{++} -on kívül K^+ és spermidin jelenléte is szükséges *in vitro* körülmények között [39].

A topoizomeráz I aktivitású ω -fehérje élőben betöltött szerepe nem tisztázott. A DNS replikációra nézve defektív *E. coli* mutánsok áttanulmányozása során nem sikerült olyanra találni, melyben az ω -fehérje változást mutatott volna.



gyűrűkapcsolódás



katenáció I típusú
topoizomerázzal



katenáció II típusú
topoizomerázzal

10. ábra. Zárt, kétfonalú DNS-gyűrűk lehetséges kapcsolódási formái

Fig. 10. Possible forms of the coupling of closed circular two-strand DNA molecules; linkage of DNA rings; catenation by topoisomerase I; catenation by topoisomerase II

DNS-relaxáló enzimnek bizonyult a λ -fág integratív rekombinációjához szükséges *int* gén terméke [76, 107, 108]. Ebben az esetben tehát nem kétséges, hogy az enzimnek rekombinációs folyamatban van szerepe.

DNS relaxáló aktivitást lehetett kimutatni SV40 nukleoproteidból [151] és vaccinia virionból is [16].

Eukarióták I típusú topoizomerázai. Valamivel az ω -fehérje felfedezése után, egér embrionális sejtekből sikerült DNS-relaxáló enzimet előállítani [27]. Az enzim egyetlen, 67 000 dalton tömegű polipeptid láncot tartalmaz, s a legfontosabb különbség az ω -fehérje hatásával szemben az, hogy képes mind a pozitív, mind a negatív szuperspiralizációjú DNS-gyűrűk ellazítására. A DNS relaxáló aktivitáshoz szükséges ionkörnyezet a bakteriális eredetű enziméhez hasonló [27].

Az egérsejt-topoizomerázon részletesen tanulmányozták az enzim működése során keletkező intermedier DNS-lánctörés természetét. Kiderült, hogy az enzim a láncbevágás helyén kovalens kapcsolatba kerül a felszabaduló 5'-véggel [28, 30]. A kötés hidroxilaminnal nem redukálható, így a foszfamid-típusú kapcsolat kizárható, de szerin- vagy treoninfoszfát sem lehet, mert alkálirezisztens [30]. A DNS-girázok működése során keletkező lánctörésben tirozinfoszfát alakjában kapcsolódnak a DNS 5'-végeihez, így elképzelhető, hogy I. típusú topoizomerázoknál is hasonló kötés alakul ki.

Az egérsejt-topoizomerázhoz minden szempontból hasonló enzimet állítottak elő *Xenopus laevis* oocitákból [101], *Drosophila melanogaster* petékből

1987
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖZLEMÉNYEI

[10] és KB-sejtekből [74]. A *X. laevis* germinális vezikulumból előállítható topoizomeráz I hasonló molekulatömegű, mint az előbbiek (68 000 dalton), viszont működéséhez ATP-re van szükség. Az enzim segítségével SV40 és HM456 DNS-gyűrűkből hibrid katenátot lehet előállítani, vagyis az ω -fehérjéhez hasonlóan nincs szükség szekvenciahomológiára a gyűrűk egymásba fűzéséhez [12].

2. II. típusú topoizomerázok

A bakteriális DNS girázok. A DNS negatív szuperspiralizációját kialakító és megszüntető mechanizmusok közül a legjobban ismert a bakteriális DNS girázok működése. Az enzimet *E. coliból* sikerült nagy tisztasággal kinyerni [60], de mivel *M. luteusban* igen hasonló enzim található [90], feltehető, hogy a legtöbb baktériumban hasonló mechanizmus működik. Van valószínűleg DNS giráz a mitokondriumokban [25], viszont olyan II típusú topoizomerázt nem sikerült eukarióták sejtmagjaiból előállítani, amely negatív szuperspiralizációt hozna létre enzimatikusan [38].

Az *E. coliból* kinyerhető DNS giráz kétszer két identikus alegységből felépülő, összesen 400 000 dalton tömegű enzim [60], melyhez hat, egymástól függetlenül mérhető részaktivitás kötődik [38]: *a)* a relaxált DNS gyűrű szuperspirálissá alakítása negatív polaritással (a DNS kötési száma csökken, negatív szuperspirális sűrűsége nő); *b)* stabilis DNS · giráz biner komplex kialakulása; *c)* szuperspiralizált DNS gyűrű relaxációja; *d)* a DNS · enzim biner komplex állományában kettős DNS lánctörés képzése; *e)* DNS-függő ATPáz aktivitás és *f)* DNS-gyűrűk egymásba fűzése és szétkapcsolása (katenáció és dekaténáció).

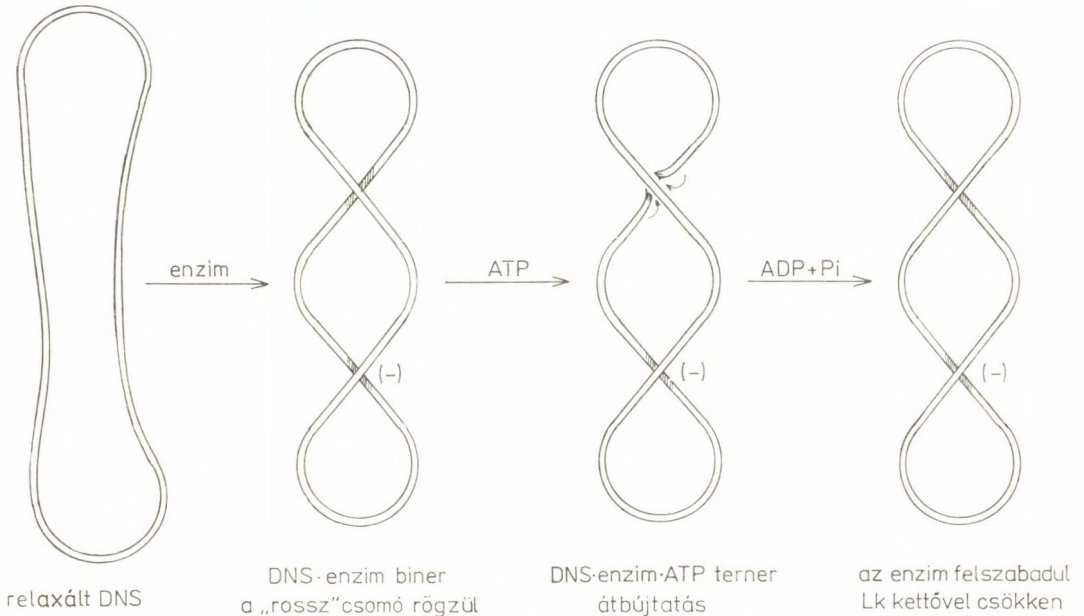
A 400 000 dalton tömegű holoenzimből denaturáló körülmények között kétféle: 95 000 és 105 000 dalton tömegű alegység különíthető el, a teljes molekula négy protomerből áll [60]. A nagyobbik protomér a *gyrA* gén terméke, a DNS reverzibilis felbontásáért—újraegyesítéséért felelős. A kisebbik fehérjelánc a *gyrB* gén termékének felel meg, és az enzinkomplex ATPáz aktivitását hordozza. A kétféle protomér mennyisége igen különböző, a nagyobbikból kb. tízszer több van, mint a kisebbikből. Lehet, hogy ebben szerepet játszik a *gyrB* fehérje nagyobb bomlékonysága, de leginkább arról lehet szó, hogy a *gyrA* fehérje nemcsak a DNS giráz felépítésében szerepel, hanem egy másik II típusú topoizomeráz felépítésében is (topoizomeráz II³, relaxáló aktivitással, aktív negatív szuperspiralizációt nem hoz létre) [20]. A kétféle felépítő fehérje két, gyógyszerként is használt gátlóanyag-párral inaktíválható. A *gyrA* fehérje a nalidixsav,* illetve a szerkezetileg hasonló, de hatékonyabb oxolinsav* támadáspontja. A *gyrA* gén mutációja egyidejűleg teszi a baktériumot nalidixsav-rezisztenssé és deficienssé az enzim működését illetően [42]. Hasonló a helyzet a *gyrB* fehérje esetében is, mely a novobiocin, illetve a coumermicin A₁ támadáspontja. A kétféle gátlóanyagnak megfelelően a *gyrA* gént korábban *nalA* génnek, a *gyrB*-t *cou*-nak nevezték. Figyelemre méltó, hogy a két gyógyszerpár toxicitása és terápiás szélessége meglehetősen eltérő. A nalidix- és oxolinsav aránylag alacsony toxicitása emlősökben valószínűen azzal áll összefüggésben, hogy a sejtmagokban nincsen a giráznak megfelelő enzim,

* A Chinoín Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára a nalidixsavat Nevigramon, az oxolinsavat Gramurin néven gyártja.

így ezek csak a mitokondriális girázra vannak hatással. A novobiocin és a coumermycin nagyobb toxicitása arra utal, hogy hatnak az emlős sejtek nem giráz természetű II. típusú topoizomerázaira [98, 100], de támadáspontjuk sem szorítkozik egyetlen enzimre [117].

A zárt DNS-gyűrűk enzimátikus negatív szuperspiralizációja valószínűleg csak a girázokra jellemző. A relaxált, vagy kismértékben szuperspiralizált DNS-t az enzim ATP jelenlétében egyre csökkenő topológiai menetszámú negatív szuperspirálissá alakítja. Mivel endergonikus reakcióról van szó, s ezt az ATP hidrolízisének energiája biztosítja, a giráz működése is függ a baktériumsejt energiatermelésétől.

A negatív szuperspiralizációt létrehozó enzimműködés több lépésből áll. A kísérleti eredményekkel jól összhangban van a BROWN és COZZARELLI által javasolt modell [21], melyet a 11. ábra szemléltet. Hasonló mechanizmust



11. ábra. A DNS-giráz működési modellje [21]. Részletes magyarázat a szövegben
Fig. 11. Model of the mechanism of the action of DNA gyrase [21]

tételeznek fel MIZUUCHI és mtsai is [109]. A modell szerint, ha a zárt DNS-gyűrű a hőmozgás következtében összehajlik, azonos számú „jó”, vagyis a negatív szuperspiralizáció irányának megfelelő, és „rossz”, azaz ellentétes helyzetű DNS-keresztződés keletkezik. Míg a „jó csomó” nem rendelkezik enzimkötő képességgel, a „rossz csomó” igen, kapcsolódik a DNS girázzal, létrejön az enzim · DNS biner komplex, majd ez ATP-t vesz fel. A modell szépséghibája, hogy azt gondolnánk, a biner komplex a DNS-en bárhol kialakulhat, de ez a valóságban nem így van. Aránylag kicsi azoknak a DNS-szekvenciáknak a száma, melyek képesek ilyen binert képezni. A biner komplex állományában az egyik DNS-kettősspirális mindkét szála megszakad, a keresztvező DNS-fonalak egymáshoz viszonyított helyzete felcserélődik, majd a DNS két szála újra-

egyesül: a „rossz” csomó „jóvá” alakul. Az átalakulás következtében megváltozik az enzimefehérje konformációja, s ATPáz aktivitás jelenik meg, mely a kötött ATP-t ADP-re és ortofoszfátra hasítja. A felszabaduló energia egy része, mint konformációs energia tárolódik a giráz molekulában, s ez az energiadús giráz disszociálódik a „jó” csomóról. Amint láttuk, tehát a tulajdonképpeni endergonikus lépések: a DNS-szálak átfordítása egy termodinamikailag kevésbé valószínű helyzetbe, majd a két DNS-szál ligációja a kötött ATP hidrolízise *előtt* történnek, nyilván, egy megelőző ATP-hidrolízis energiájának terhére. A mechanizmus jellegéből következik, hogy a tetramér holoenzim egészében kötődik a DNS-hez, s nem protomérenként. A másik jellemző, hogy az ATP-kötésnek nincsen jelentősége a DNS · enzim biner kialakulásában.

A modell alapján érthető, miért változik a DNS kötési száma kettesével az enzim működése során: egy negatív menet spontán alakul ki a DNS-gyűrű összehajlásával, a másikat a giráz képezi a DNS-szálak átbújtatásával.

A DNS giráz affinitása kétfonalú DNS-hez jóval nagyobb, mint egyfonalúhoz. Az enzim affinitása a DNS-hez ezen kívül annál nagyobb, „minél nagyobb szükség van rá”, vagyis a DNS minél inkább relaxált [38]. A természetes szuperspirális menetszám kialakulásában ez a tény is szabályozó tényezőként szerepelhet.

A biner komplex állományában a DNS molekula meggyűrődik, aránylag hosszú szakaszon nukleázrezisztenssé válik. Pankreász DNáz I-vel szemben 90 nukleotidnyi szakasz, *Staphylococcus*-nukleázzal szemben kb. 143 nukleotid hosszúságú DNS lesz nukleázzal szemben ellenálló [42]. A működő DNS · enzim komplex állományában, a lánctörések pillanatában a *gyrA* protomérek kovalens kapcsolatba kerülnek a megszakadt láncokon keletkező 5'-foszfátokkal, melyek a fehérjén egy tirozinmaradék fenolos OH-csoportját észtereszítik. Ez a fehérjefoszfát kémiaiilag sokkal stabilisabb, mint a szerin- vagy treoninfoszfátok [164].

Amint láttuk, a DNS negatív szuperspiralizációja endergonikus folyamat, melynek energiáját az ATP koszuksztrátum bomlása fedezi. ATP hiányában az enzim katalizálni képes a szuperspirál-képzés fordítottját, a DNS relaxációját, bár ez esetben is fennáll az a dilemma, amit az I. típusú topoizomerezoknál említettünk: kérdéses, hogy a reakció valóban ATP-független-e. Élőben a giráz relaxáló aktivitása alighanem alárendelt jelentőségű, két okból is. Először is, ha ezt a funkciót élőben a giráz látná el, az feltételeznék az ATP-szint szélsőséges ingadozását, ilyen pedig nem mutatható ki. Másodsorban, a girázhoz szerkezetiileg igen közelálló topoizomerez II' [20] kb. negyvenszer gyorsabban katalizálja a DNS-gyűrű relaxációját, mint a DNS giráz.

A giráz működése közben az enzimkomplex állományában keletkező ket-tős lánctörés nalidixsavval kezelt reakcióegyben kimutatható, ha az elegyből a DNS-t nátrium dodecilszulfát jelenlétében extrahálják. Ez a lánctörés nem a DNS haránttörése, hanem két, egymástól általában négy nukleotid távolságban levő egyszeres lánctörés összegeződése [114]. Az enzim, mint már szó volt róla, nem képes bárhol kapcsolódni a DNS-hez a lehetséges kötési pontok egymástól 80–90 bázispárnyi távolságban vannak [114]. A DNS bemetszése az enzimkomplex állományában mindig T és G között történik, de ezen túlmenően különösebb törvényszerűség nem ismerhető fel. Az így keletkező DNS-darabok sajátos átmenetet képeznek a valóban specifikus restrikciós fragmentumok és a véletlenszerű hasítási termékek között, ahogy a lépcsőszerű lánctörés is bizonyos értelemben ragadós végnek tekinthető.

Az enzim ATPáz aktivitása csak DNS jelenlétében mutatkozik. Az enzim működés egy ciklusában egy DNS-szál átfordításához, a kötési szám kettővel való csökkentéséhez egy(?) molekula ATP hidrolízise kapcsolódik, de ez nem az aktuális, hanem az elkövetkező csavarási ciklust szolgálja. Az ATP hidrolízis szerepe az aktuális ciklusban az enzimmolekula felszabadítása a már negatív szuperspiralitásnak megfelelő helyzetű DNS-keresztveződésből (a „jó” csomóból). Bizonyíték erre, hogy az ATP nem energiaszolgáltató analógja, az adenil-5'-il-imidodifoszfát is képes bizonyos szuperspiralizációt létrehozni *in vitro*, csupán a reakció gyorsan elakad [161]. A reakció elakadásának oka nyilván az, hogy amíg van energiadús konformációjú enzim, van működés is, de utána az enzim a DNS-hez kötve marad, a hatástalan ATP-analóg nem képes felszabadítani a DNS-komplex állományából.

Az ATP hidrolizáló képesség és az energiakötés a kisebbik, *gyrB* fehérjéhez kapcsolódik; novobiocinnal, illetve coumermycin A₁-gyel gátolható. Míg a *gyrA* protomérekre ható nalidix- és oxolinav teljesen fajlagosnak látszik a DNS girázokra, a novobiocin hatással van eukarióta topoizomerázokra is. Novobiocinnal inkubált sejtekből előállított nukleoidban a DNS kevésbé szuperspiralizált, mint a kontrollban [98, 99, 100]. Ezen eredményekkel szemben óvatosságra int, hogy a novobiocin igen sok magfehérjéhez képes kötődni, s nem biztos, hogy gátló hatása teljesen specifikus a topoizomerázokra [117].

A katenátképzés a girázok lényeges funkciója lehet, mert a DNS szuperspiralizáló és a katenátképző aktivitás pontosan párhuzamosan változik [39]. Nem lehet műtermékről szó, hiszen előben gyakran fordulnak elő összefűzött DNS-gyűrűk. A gyűrűkapcsolási reakciót annak révén ismerték fel, hogy a — főleg már eredetileg szuperspiralizált — zárt, cirkuláris DNS-t girázzal inkubálva, annak molekulásúlya váratlanul megnőtt, s a DNS egy része visszamaradt az agarózlemez-elektroforézis start-zónájában [21]. E DNS-frakció elektronmikroszkópban néhánytól-számtalanig összeöltött DNS-gyűrűk szövetvényének bizonyul. A folyamat közvetlenül is bizonyítja, hogy a giráz működése során valóban keletkezik kettős láncszakadás a DNS-en. Meg kell jegyezni, hogy a gyűrűkapcsolás enzimológiai optimumai mások, mint a szuperspirál képzési reakcióé, általában szűkebb pH-, ionerősség- és hőmérsékleti tartományban vannak. Az egyes gyűrűk szuperspiralizáltsága szintén befolyásolja a katenációt. Szuperspiralizált gyűrűk kettősével vagy legfeljebb néhányszorosán kapcsolódnak össze, míg a relaxált gyűrűkből hatalmas, kusza szövetvény keletkezik [84]. A jelenség a korábban elmondottak alapján könnyen megérthető: az enzim affinitása relaxált DNS-hez sokkal nagyobb, mint a szuperspiralizálthoz.

Annak a felismerése, hogy a kettős DNS-lánc-töréssel működő topoizomeráz nem feltétlenül jár együtt a DNS giráz funkcióval, a T4 fág topoizomeráz alaposabb vizsgálatából derült ki [92]. Az enzim a fág-DNS szintézis iniciációjához szükséges [103]. A T4 fág topoizomeráz nem képes girázként negatív szuperspirális menetek képzésére, de ATP-függő, s a katalizált relaxációs folyamat során kettős lánc-törések keletkeznek a DNS-en [92].

Hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek az eukariótákból izolált II. típusú topoizomerázok [66]. Mind a T4 topoizomeráz, mind az eukarióta topoizomerázok képesek katenátképzésre és dekatenciónra, s valószínűleg *in vivo* szerepük éppen ezzel függhet össze [66].

Néhány következtetés

Láttuk, hogy a DNS szerkezete jóval bonyolultabb annál, hogy az elemi kettősspirális DNS és néhány polimeráz kölcsönhatásával megmagyarázható lenne. Az eddigiekben többször utaltam arra, hogy a felsorolt DNS-kötő fehérjék és enzimek szerepe az, hogy a DNS-t hozzáigazítják a különböző enzim-funkciókhoz, de ennek bizonyítékait külön is érdemes áttekinteni.

A legmeggyőzőbb, ha a DNS giráz gátlóanyagai közül a nalidixsav és az oxolinsav egész sejtre gyakorolt hatását vizsgáljuk. A két szer képes minden templátfüggő szintézis gátlására baktériumokban anélkül, hogy bármelyik résztvevő polimerázra közvetlenül hatással lennének; hatásuk tehát minden esetben csupán a baktérium kromoszóma negatív szuperspiralizációját létrehozó giráz bénítása. Legalacsonyabb koncentrációban és leginkább a replikatív DNS-szintézis gátlódik, ennél kevésbé a transzkripció [157] és az UV-reparáció. Végül, legmagasabb dózisok esetén az ionizáló besugárzást követő reparáció is [48]. A sorrend értelme nyilvánvaló, minél hosszabb templátszakasz vesz részt a vizsgált folyamatban, annál kritikussabb a kétfonalú DNS-templát nyílása-zárulása.

Egymástól függetlenül többen bizonyították, hogy a DNS-függő RNS polimerázokkal történő *in vitro* RNS szintézis függ a templát szuperspiralitástól. Mind az iniciáció, mind az RNS-lánc növekedése intenzívebb negatív szuperspiralizációt mutató templáton, s fordítva, a DNS relaxációja az RNS szintézis csökkenéséhez vezet [18, 34, 133, 187]. E tekintetben nincsen különbség bakteriális és eukarióta RNS-polimerázok között [6].

Az utóbbi években A. KORNBERG iskolájának sikerült meggyőzően modelálni *in vitro*, milyen tényezők szükségesek ahhoz, hogy az élőnek megfelelő replikációs DNS-szintézis jöjjön létre az igen egyszerű ϕ X174 DNS-en [141]. Az eredmény egy tíz faktorból álló multienzim-rendszer, melyből csak hat nukleinsav polimeráz vagy ligáz (ha ide számítjuk a kopolimeráz III-at is), a többi négy a DNS szerkezetét meghatározó tényező. Feltehetőleg magasabbrendű szervezetekben még inkább így van, hiszen a nagyobb DNS-tömeg, több replikon strukturális szerveződése még bonyolultabb. Sejtmagokban a replikációs komplex a magmátrixhoz kapcsolódó multienzim-rendszer [128, 169], s mint ilyen, immobilis, a replikálódó DNS mozdul el a replikációs komplexhez képest. Ez természetesen ismét a DNS szerkezetszabályozás jelentőségére enged következtetni.

Amint láttuk, a DNS szerkezetét befolyásoló faktorok egy része a rekombinációs folyamatokkal áll kapcsolatban. A homológ DNS-szakaszok közti rekombináció mechanizmusa valószínűleg megfelel a HOLLIDAY által megjósolt szerkezeti változásoknak. A HOLLIDAY-struktúra viszont aránylag hosszú, reverzibilisen denaturált DNS-szakaszok keletkezését tételezi fel. A rekombinációs helikázok és spiráldestabilizáló fehérjék működése ilyen struktúrák kialakulására megnyugtató magyarázatot kínál (6. ábra). Mindamellet azt sem szabad elfelejteni, hogy a rekombinációs folyamatokhoz szükségesnek látszik a résztvevő DNS-szakaszok negatív szuperspiralizációja is [110].

Izgalmas kérdést vet fel, hogy mi a jelentősége a katenátoknak. Élőben néha óriási, epedarugóra emlékeztető DNS-szövevények mutathatók ki DNS-gyűrűk kapcsolódásából [96]. A legegyszerűbb magyarázat, hogy rögzítési mechanizmusról lehet szó [96].

A topoizomeráz II enzimek működése során keletkező kettős DNS-lánc-

szakadás nem harántirányú, hanem négy nukleotidnyi lépeső. E kohezív végek nem olyan specifikusak, mint restriktációs enzimek esetében, de nem is véletlenszerűek. Felvetődött a gondolat, hogy a nem-homológ rekombinációk (ugráló génszegmensek, transzpozibilis elemek) keletkezésében éppen ezek a topoizomerizációs intermedierek szerepelnek [153].

IRODALOM

1. ABDEL-MONEM, M. and HOFFMANN-BERLING, H. (1976) Enzymic unwinding of DNA. I. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **65**, 431–440.
2. ABDEL-MONEM, M., DÜRWARD, H. and HOFFMANN-BERLING, H. (1976) Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **65**, 441–449.
3. ABDEL-MONEM, M., CHANAL, M.-C. and HOFFMANN-BERLING, H. (1977) DNA unwinding enzyme II of *Escherichia coli*. 1. Purification and characterization of the ATPase activity. *Eur. J. Biochem.*, **79**, 33–38.
4. ABDEL-MONEM, M., DÜRWARD, H. and HOFFMANN-BERLING, H. (1977) DNA unwinding enzyme II of *Escherichia coli*. 2. Characterization of the DNA unwinding activity. *Eur. J. Biochem.*, **79**, 39–45.
5. ABDEL-MONEM, M. and HOFFMANN-BERLING, H. (1980) DNA unwinding enzymes. *TIBS*, **5**, 128–130.
6. AKRIGG, A. and COOK, P. R. (1980) DNA gyrase stimulates transcription. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 845–854.
7. ALBERTS, B. M. and FREY, L. (1970) T4 bacteriophage gene 32: A structural protein in the replication and recombination of DNA. *Nature*, **227**, 1313–1318.
8. ALBERTS, B. M. and STERNGLANZ, R. (1977) Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature*, **269**, 655–661.
9. ATTARDI, D. G., MARTINI, G., MATTOCCIA, E. and TOCCHINI-VALENTINI, G. P. (1976) Effect of *Xenopus laevis* oocyte extract on supercoiled simian virus 40 DNA: Formation of complex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 554–558.
10. BAASE, W. A. and WANG, J. C. (1974) An protein from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry*, **13**, 4299–4303.
11. BAK, A. L., ZEUTHEN, J. and CRICK, F. H. C. (1977) Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 1595–1599.
12. BALDI, M. I., BENEDETTI, P., MATTOCCIA, E. and TOCCHINI-VALENTINI, G. P. (1980) *In vitro* catenation and decatenation of DNA and a novel eucaryotic ATP-dependent topoisomerase. *Cell*, **20**, 461–467.
13. BANKS, G. R. and SPANOS, A. (1975) The isolation and properties of a DNA unwinding protein from *Ustilago maydis*. *J. Mol. Biol.*, **93**, 63–67.
14. BAUER, W. and VINOGRAD, J. (1968) The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV 40 DNA in the presence and absence of dye. *J. Mol. Biol.*, **33**, 141–171.
15. BAUER, W. and VINOGRAD, J. (1970) Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. II. The free energy of superhelix formation in SV 40 DNA. *J. Mol. Biol.*, **47**, 419–435.
16. BAUER, W. R., RESSNER, E. C., KATES, J. and PATZKE, J. V. (1977) A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: Partial purification and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 1841–1845.
17. BOSTOCK, C. J. and SUMNER, A. T. (1978) *The eukaryotic chromosome*. North-Holland, Amsterdam—New York—Oxford.
18. BOTCHAN, P., WANG, J. C. and ECHOLS, H. (1973) Effect of circularity and superhelicity on transcription from bacteriophage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 3077–3081.
19. BOUCHÉ, J.-P., ZECHEL, K. and KORNBERG, A. (1975) *dna G* gene product, a rifampicin-resistant RNA polymerase initiates the conversion of a single-stranded coliphage DNA to its duplex replicative form. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5995–6001.
20. BROWN, P. O., PEEBLES, C. L. and COZZARELLI, N. R. (1979) A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 6110–6114.

21. BROWN, P. O. and COZZARELLI, N. R. (1979) A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science*, **206**, 1081—1083.
22. BURREINGTON, M. G. and MORGAN, A. R. (1976) The purification from *Escherichia coli* of a protein relaxing superhelical DNA. *Can. J. Biochem.*, **54**, 301—306.
23. BUSCH, H. (1965) *Histones and other nuclear proteins*. Academic Press, New York—London.
24. CARROLL, R. B., NEET, K. E. and GOLDTHWAIT, D. A. (1972) Self-association of gene 32-protein of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 2741—2744.
25. CASTORA, F. J. and SIMPSON, M. V. (1979) Search for a DNA gyrase in mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11193—11195.
26. CAVALIERI, S. J., NEET, K. E. and GOLDTHWAIT, D. A. (1976) Gene 5 protein of bacteriophage fd: A dimer which interacts co-operatively with DNA. *J. Mol. Biol.*, **102**, 697—711.
27. CHAMPOUX, J. J. and DULBECCO, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA. A possible swivel for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 143—146.
28. CHAMPOUX, J. J. (1976) Evidence for an intermediate with a single-strand break in the reaction catalyzed by the DNA untwisting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 3488—3491.
29. CHAMPOUX, J. J. and MCCONAUGHY, B. L. (1976) Purification and characterization of the DNA untwisting enzyme from rat liver. *Biochemistry*, **15**, 4638—4642.
30. CHAMPOUX, J. J. (1977) Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 3800—3804.
31. CHAMPOUX, J. J. (1978) Proteins that affect DNA conformation. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 449—479.
32. CHANG, L. M. S., LURIE, K. and PLEVANI, P. (1979) A stimulatory factor for yeast DNA polymerase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 587—595.
33. COBIANCHI, F., RIVA, S., MASTROMEI, G., SPADARI, S., PEDRALINOY, G. and FALASCHI, A. (1979) Enhancement of the rate of DNA polymerase- α activity on duplex DNA by a DNA-binding protein and a DNA-dependent ATPase of mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 639—647.
34. COLMAN, A. and COOK, P. R. (1977) Transcription of superhelical DNA from cell nuclei. *Eur. J. Biochem.*, **76**, 63—78.
35. COOK, P. R. and BRAZELL, I. A. (1976) Detection and repair of single strand breaks in nuclear DNA. *Nature*, **263**, 679—682.
36. COOK, P. R. and BRAZELL, I. A. (1976) Conformational constraints in nuclear DNA. *J. Cell Sci.*, **22**, 287—302.
37. COOK, P. R. and BRAZELL, I. A. (1978) Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. *Eur. J. Biochem.*, **84**, 465—477.
38. COZZARELLI, N. R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, **207**, 953—960.
39. COZZARELLI, N. R. (1980) DNA topoisomerases. *Cell*, **22**, 327—328.
40. DEBRECENI, N., BEHMA, M. T. and EBISUZAKI, K. (1970) A DNA-dependent ATPase from *E. coli* infected with bacteriophage T4. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **41**, 115—121.
41. DELIUS, H., MANTELL, N. J. and ALBERTS, B. (1972) Characterization by electron microscopy of the complex formed between T4 bacteriophage gene 32-protein and DNA. *J. Mol. Biol.*, **67**, 341—350.
42. DENHARDT, D. T. (1979) DNA gyrase and DNA unwinding. *Nature*, **280**, 196—198.
43. EARNSHAW, W. C., HOUDA, B. M., LASKEY, R. A. and THOMAS, J. O. (1980) Assembly of nucleosomes: The reaction involving *X. laevis* nucleoplasm. *Cell*, **21**, 373—383.
44. EICHLER, D. C. and LEHMANN, I. R. (1977) On the role of ATP in phosphodiester bond hydrolysis catalyzed by the *recBC* deoxyribonuclease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 499—503.
45. FALASCHI, A., COBIANCHI, F. and RIVA, S. (1980) DNA-binding proteins and DNA-unwinding enzymes in eukaryotes, *TIBS*, **5**, 154—157.
46. FELSINFELD, G. (1978) Chromatin. *Nature*, **271**, 115—122.
47. FINCH, J. T., NOLL, M. and KORNBERG, R. D. (1975) Electron microscopy of defined lengths of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 3320—3322.
48. FRANCIA, I., OKOS, A. and HERNÁDI, F. J. (1978) Effect of nalidixic acid on repair of single-strand breaks in DNA induced by ionizing irradiation in *Escherichia coli*. *Stud. biophys.*, **71**, 143—149.
49. GEIDER, K. and KORNBERG, A. (1974) Conversion of the M13 viral single strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3999—4005.
50. GERMOND, J. E., HIRT, B., OUDET, P., GROSS-BELARD, M. and CHAMBON, P. (1975)

- Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from Simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 1843—1847.
51. GERMOND, J. E., ROUVIÈRE-YANIV, M. and BRUTLAG, D. (1979) Nicking-closing enzyme assembles nucleosome-like structures *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 3779—3783.
 52. GLASSBERG, J., MEYER, R. R. and KORNBERG, A. (1979) Mutant single-strand binding protein of *Escherichia coli*: Genetic and physiological characterization. *J. Bacteriol.*, **140**, 14—19.
 53. GOLDMARK, P. J. and LINN, S. (1972) Purification and properties of the *recBC* DNase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1849—1860.
 54. GRIFFITH, J. D. (1975) Chromatin structure: Deduced from a minichromosome. *Science*, **187**, 1202—1203.
 55. HARTWIG, M. (1978) Organization of mammalian chromosomal DNA: Supercoiled and folded circular DNA subunits from interphase nuclei. *Acta biol. med. germ.*, **37**, 421—432.
 56. HERRICK, G. and ALBERTS, B. (1976) Purification and physical characterization of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2124—2132.
 57. GEORGIEV, G. P., ILYIN, J. V., TIKHONENKO, A. S., DOBBERT, N. N. and ANANYEVA, L. N. (1967) Isolation and properties of chromosomal deoxyribonucleoproteins. *Mol. Biol. USSR*, **1**, 815—827.
 58. HERRICK, G. and ALBERTS, B. (1976) Nucleic acid helix-coil transitions mediated by helix-unwinding proteins from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2133—2141.
 59. HERRICK, G., DELIUS, H. and ALBERTS, B. (1976) Single-stranded DNA structure and DNA polymerase activity in the presence of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2142—2146.
 60. HIGGINS, N. P., PEEBLES, C. L., SUGINO, A. and COZZARELLI, N. R. (1978) Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1773—1777.
 61. HINKLE, D. C. and RICHARDSON, C. C. (1975) Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication *in vitro*. Purification and properties of the gene 4 protein of bacteriophage 7. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5523—5529.
 62. HOTTA, Y. and STERN, H. (1971) Meiotic protein in spermatocytes of mammals. *Nature*, **234**, 83—86.
 63. HOTTA, Y. and STERN, H. (1978) DNA unwinding protein from meiotic cells of *Lilium*. *Biochemistry*, **17**, 1872—1880.
 64. HOTTA, Y. and STERN, H. (1979) The effect of dephosphorylation on the properties of a helix-destabilizing protein from meiotic cells and its partial reversal by a protein kinase. *Eur. J. Biochem.*, **95**, 31—38.
 65. HSIEH, T.-S. and WANG, J. C. (1975) Thermodynamic properties of superhelical DNAs. *Biochemistry*, **14**, 527—535.
 66. HSIEH, T.-S. and BRUTLAG, D. (1980) ATP-dependent DNA topoisomerase from *D. melanogaster* reversibly catenates duplex DNA rings. *Cell*, **21**, 115—125.
 67. HUANG, W.-M. and LEHMAN, I. R. (1972) On the exonuclease activity of phage T4 deoxyribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3139—3146.
 68. HÜBSCHER, U., LUTZ, H. and KORNBERG, A. (1980) Novel histone H2A-like protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 5097—5101.
 69. IDE, T., NAKANE, M., ANZAI, K. and ANDOH, T. (1975) Supercoiled DNA folded by non-histone proteins in cultured mammalian cells. *Nature*, **258**, 445—447.
 70. JENSEN, D. E., KELLY, R. C. and VON HIPPEL, P. H. (1976) DNA „melting” proteins. II. Effects of bacteriophage T4 gene 32-protein binding on the conformation and stability of nucleic acid structures. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7215—7228.
 71. JOHNSON, B. F. (1977) Genetic mapping of the *lexC*-113 mutation, *Mol. Gen. Genet.*, **157**, 91—97.
 72. KARN, A. E., MCKAY, V., GOLDMARK, P. J. and LINN, S. (1973) The *recBC* deoxyribonuclease of *Escherichia coli* K-12. Substrate specificity and reaction intermediates. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4874—4884.
 73. KEDES, L. H. (1979) Histone genes and histone messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 837—870.
 74. KELLER, W. (1975) Characterization of purified DNA-relaxing enzyme from human tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 2550—2554.
 75. KELLER, W. (1975) Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 4876—4880.
 76. KIKUCHI, Y. and NASH, H. A. (1978) The bacteriophage λ *int* gene product. A filter assay for genetic recombination, purification of *int*, and specific binding to DNA. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7149—7157.

77. KIKUCHI, Y. and NASH, H. A. (1979) Nicking-closing activity associated with bacteriophage λ *int* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 3760–3764.
78. KLEINSCHMIDT, A. K., LANG, D., JACHERTS, D. and ZAHN, R. (1962) Darstellung und Längenmessungen des gesamten Desoxyribonukleinsäure-Inhaltes von T2 Bakteriophagen. *Biochim. biophys. acta*, **61**, 857–864.
79. KOLODNER, R. and RICHARDSON, C. C. (1977) Replication of duplex DNA by bacteriophage T7 DNA polymerase and gene 4 protein is accompanied by hydrolysis of nucleoside 5'-triphosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 1525–1529.
80. KORNBERG, A., SCOTT, J. F. and BERTSCH, L. L. (1978) ATP utilization by *rep* protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3298–3304.
81. KORNBERG, R. D. (1977) Structure of chromatin. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 931–954.
82. KOWALCZYKOWSKI, S. C., LOUBERG, N., NEWPORT, J. W. and VON HIPPEL, P. H. (1981) Interactions of bacteriophage T4-coded gene 32 protein with nucleic acids. I. Characterization of the binding interactions. *J. Mol. Biol.*, **145**, 75–104.
83. KRELL, H., DÜRWARD, H. and HOFFMANN-BERLING, H. (1978) A DNA-unwinding enzyme induced in bacteriophage T4-infected *Escherichia coli* cells. *Eur. J. Biochem.*, **93**, 387–395.
84. KREUZER, K. N. and COZZARELLI, N. R. (1980) Formation and resolution of DNA catenates by DNA gyrase. *Cell*, **20**, 245–254.
85. KROHNE, G. and FRANKE, W. W. (1980) Immunological identification and localization of the predominant nuclear protein of the amphibian oocyte nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 1034–1038.
86. KUHN, B., ABDEL-MONEM, M., KRELL, H. and HOFFMANN-BERLING, H. (1979) Evidence for two mechanisms for DNA unwinding catalyzed by DNA helicases. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11343–11350.
87. LAINE, B., KMIECIK, D., SANTIÉRE, P., BISERTE, G. and COHEN-SOLAL, M. (1980) Complete amino-acid sequences of DNA-binding proteins HU-1 and HU-2 from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **103**, 447–461.
88. LASKEY, R. A., HONDA, B. M., MILLS, A. D. and FINCH, J. T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, **275**, 416–420.
89. LEWIS, J. G. and ANDRÉ, C. M. (1978) A serum DNA-binding protein absent in malignant disease. *FEBS Letters*, **92**, 211–213.
90. LIU, L. F. and WANG, J. C. (1978) *Micrococcus luteus* DNA gyrase: Active components and a model for its supercoiling of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 2098–2102.
91. LIU, L. F., LIU, C.-C. and ALBERTS, B. M. (1979) T4 DNA topoisomerase: A new ATP-dependent enzyme essential for initiation of T4 bacteriophage replication. *Nature*, **281**, 456–461.
92. LIU, L. F., LIU, C.-C. and ALBERTS, B. M. (1980) Type II DNA topoisomerases: Enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule *via* a reversible double-strand break. *Cell*, **19**, 697–707.
93. LONBERG, N., KOWALCZYKOWSKI, S. C., PAUL, L. S. and VON HIPPEL, P. H. (1981) Interactions of bacteriophage T4-coded gene 32 protein with nucleic acids. III. Binding properties of two specific proteolytic digestion products of the protein (G 32 P* I and G 32 P* III). *J. Mol. Biol.*, **145**, 123–138.
94. MAC KAY, V. and LINN, S. (1974) The mechanism of degradation of duplex deoxyribonucleic acid by the *recBC* enzyme of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4286–4294.
95. MAC KAY, V. and LINN, S. (1976) Selective inhibition of the DNase activity of the *recBC* enzyme by the DNA binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3716–3719.
96. MARINI, J. C., MILLER, K. G. and ENGLUND, P. T. (1980) Decatenation of kinetoplast DNA by topoisomerases. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4976–4979.
97. MATHER, J. and HOTTA, Y. (1977) A phosphorylatable DNA-binding protein associated with a lipoprotein fraction from rat spermatocyte nuclei. *Exp. Cell Res.*, **109**, 181–189.
98. MATTERN, M. R. and PAINTER, R. B. (1978) Inhibition of mammalian DNA replication by novobiocin. *J. Cell. Biol.*, **79**, 136a.
99. MATTERN, M. R. and PAINTER, R. B. (1979) Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. I. Effects of ethidium bromide on DNA synthesis in permeable *Chinese hamster* ovary cells. *Biochim. biophys. acta*, **563**, 293–305.
100. MATTERN, M. R. and PAINTER, R. B. (1979) Dependence of mammalian DNA replication

- on DNA supercoiling. II. Effects of novobiocin on DNA synthesis in *Chinese hamster* ovary cells. *Biochim. biophys. acta*, **563**, 306–312.
101. MATTOCCIA, E., GANDINI ATTARDI, D. and TOCCHINI-VALENTINI, G. P. (1976) DNA-relaxing activity and endonuclease activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 4551–4554
 102. MAZUR, B. J. and MODEL, P. (1973) Regulation of coliphage ϕ 1 single-stranded DNA synthesis by a DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.*, **78**, 285–300.
 103. MCCARTHY, D. (1979) Gyrase-dependent initiation of bacteriophage T4 DNA replication: Interactions of *Escherichia coli* gyrase with novobiocin, coumermycin and phage DNA-delay gene products. *J. Mol. Biol.*, **127**, 265–283.
 104. MEYER, R. R., GLASSBERG, J. and KORNBERG, A. (1979) An *Escherichia coli* mutant defective in single-strand binding protein is defective in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1702–1705.
 105. MEYER, R. R., GLASSBERG, J., SCOTT, J. V. and KORNBERG, A. (1980) A temperature-sensitive single-stranded DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2897–2901.
 106. MILLS, A. D., LASKEY, R. A., BLACK, P. and DE ROBERTIS, E. M. (1980) An acidic protein which assembles nucleosomes *in vitro* is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Mol. Biol.*, **139**, 561–568.
 107. MIZUUCHI, K. and NASH, H. A. (1976) Restriction assay for integrative recombination of bacteriophage λ DNA *in vitro*: Requirement for closed circular DNA substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 3524–3528.
 108. MIZUUCHI, K., GELLERT, M. and NASH, H. A. (1978) Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, **121**, 375–392.
 109. MIZUUCHI, K., FISCHER, L. M., O'DEA, M. H. and GELLERT, M. (1980) DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 1847–1851.
 110. MIZUUCHI, K., GELLERT, M., WEISBERG, R. A. and NASH, H. A. (1980) Catenation and supercoiling in the products of bacteriophage λ integrative recombination *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **141**, 485–494.
 111. MOISE, H. and HOSODA, J. (1976) T4 gene 32 protein model for control of activity at replication fork. *Nature*, **259**, 455–458.
 112. MOLINEUX, I. J. and GEFTER, L. (1974) Properties of the *Escherichia coli* DNA binding (unwinding) protein: Interaction with DNA polymerase and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 3858–3862.
 113. MOLINEUX, I. J., FRIEDMAN, S. and GEFTER, M. L. (1974) Purification and properties of the *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid-unwinding protein. Effects on deoxyribonucleic acid synthesis *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6090–6098.
 114. MORRISON, A., HIGGINS, N. P. and COZZARELLI, N. R. (1980) Interaction between DNA gyrase and its cleavage site on DNA. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2211–2219.
 115. MORROW, J. F. and BERG, P. (1973) Location of the T4 gene 32 protein binding site on simian virus 40 DNA. *J. Virol.*, **12**, 1631–1632.
 116. MOSIG, G. and BRESCHKIN, A. M. (1975) Genetic evidence for an additional function of phage T4 gene 32 protein: Interaction with ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 1226–1230.
 117. NAKAYAMA, K. and SUGINO, A. (1980) Novobiocin and nalidixic acid target proteins in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 306–312.
 118. NELSON, P. P., ALBRIGHT, S. C. and GARRARD, W. T. (1979) Nucleosome arrangement with regard to DNA base composition. *J. Biol. Chem.*, **254**, 9194–9199.
 119. NELSON, P. P., ALBRIGHT, S. C., WISEMAN, J. M. and GARRARD, W. T. (1979) Reassociation of histone H1 with nucleosomes. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11751–11760.
 120. NOSSAL, N. G. (1974) DNA synthesis on a double-stranded DNA template by the T4 bacteriophage DNA polymerase and the T4 gene 32 DNA unwinding protein. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5668–5676.
 121. OEY, J. L. and KNIPPERS, R. (1972) Properties of the isolated gene 5 protein of bacteriophage ϕ d. *J. Mol. Biol.*, **68**, 125–138.
 122. OLINS, A. and OLINS, D. (1974) Spheroid chromatin units (μ -bodies). *Science*, **183**, 330–332.
 123. OTTO, B. (1977) DNA-dependent ATPases in concavalin stimulated lymphocytes. *FEBS Letters*, **79**, 175–179.
 124. OTTO, B., BAYNES, M. and KNIPPERS, R. (1977) A single-strand specific DNA-binding protein from mouse cells that stimulates DNA polymerase. Its modification by phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, **73**, 17–24.

125. OTTO, B., FANNING, E. and RICHTER, A. (1979) DNA polymerases and a single-strand specific DNA-binding protein associated with simian virus 40 nucleoprotein complexes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 705—708.
126. OUDET, P., GROSS-BELARD, M. and CHAMON, P. (1975) Electron microscopic evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, **4**, 281—300.
127. PANUSHKA, I. R. and GLODTHWAIT, D. A. (1980) A DNA-dependent ATPase from T4-infected *Escherichia coli*. Purification and properties of a 63000-dalton enzyme and its conversion to a 22000-dalton form. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5208—5214.
128. PARDOLL, D. M., VOGELSTEIN, B. and COFFEY, D. S. (1980) A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*, **19**, 527—536.
129. PULLEYBLANK, D. E. and MORGAN, A. R. (1975) The sense of naturally occurring superhelices and the unwinding angle of intercalated ethidium. *J. Mol. Biol.*, **91**, 1—13.
130. PURIFOY, D. J. and POWELL, K. L. (1976) DNA-binding proteins induced by herpes simplex virus type 2 in HEp-2 cells. *J. Virol.*, **19**, 717—731.
131. REUBEN, R. C. and GEFTER, M. L. (1973) A DNA-binding protein induced by bacteriophage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 1846—1850.
132. REUBEN, R. C. and GEFTER, M. L. (1974) A deoxyribonucleic acid-binding protein induced by bacteriophage T7. Purification and properties of the protein. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3843—3850.
133. RICHARDSON, J. P. (1974) Effects of supercoiling on transcription from bacteriophage PM2 deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **13**, 3164—3169.
134. ROUVIERE-YANIV, J. and GROS, F. (1975) Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 3428—3432.
135. RUYECHAN, W. T. and WETMUR, J. G. (1975) Studies on the cooperative binding of the *Escherichia coli* DNA unwinding protein to single-stranded DNA. *Biochemistry*, **14**, 5529—5534.
136. RUYECHAN, W. T. and WETMUR, J. G. (1976) Studies on the noncooperative binding of the *Escherichia coli* unwinding protein to single-stranded nucleic acids. *Biochemistry*, **15**, 5057—5064.
137. RUZ-CARRILLO, A., JORCANO, J. L., EDER, G. and LURZ, R. (1979) *In vitro* core particle and nucleosome assembly at physiological ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 3284—3288.
138. SAHASRABUDDHE, C. G. and VAN HOLDE, K. E. (1974) The effect of tripsin on nuclease-resistant chromatin fragments. *J. Biol. Chem.*, **349**, 152—156.
139. SALSTROM, J. S. and PRATT, D. (1971) Role of coliphage M13 gene 5 in single-stranded DNA production. *J. Mol. Biol.*, **61**, 489—501.
140. SCHERZINGER, E., LITFIN, F. and JOST, E. (1973) Stimulation of T7 DNA polymerase by a new phage-coded protein. *Mol. Gen. Genet.*, **123**, 247—262.
141. SCHEKMAN, R., WEINER, J. H., WEINER, A. and KORNBERG, A. (1975) Ten proteins required for conversion of ϕ X174 single-stranded DNA to duplex form *in vitro*: Resolution and reconstitution. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5859—5865.
142. SCHERZINGER, E., LANKA, E., MORELLI, G., SEIFERT, D. and YUKI, A. (1977) Bacteriophage-T7-induced DNA-priming protein. A novel enzyme involved in DNA replication. *Eur. J. Biochem.*, **72**, 543—558.
143. SCHMIDT, G. and LINDIGKEIT, R. (1977) Degradation of phosphorylated chromosomal nonhistone proteins. *Acta biol. med. germ.*, **36**, 1951—1954.
144. SCHMIR, M., RÉVET, B. M. J. and VINOGRAD, J. (1974) Dependence of the sedimentation coefficient of denatured closed circular DNA in alkali on the degree of strand interwinding. The absolute sense of supercoils. *J. Mol. Biol.*, **83**, 35—45.
145. SCOTT, J. F., EISENBERG, S., BERTSCH, L. L. and KORNBERG, A. (1977) A mechanism of duplex DNA replication revealed by enzymatic studies of phage ϕ X174: Catalytic strand separation in advance of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 193—197.
146. SCOTT, J. F. and KORNBERG, A. (1978) Purification of the *rep* protein of *Escherichia coli*. An ATPase which separates duplex DNA strands in advance of replication. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3292—3297.
147. SEALE, R. L. (1978) Persistence of nucleosomes on DNA during chromatin replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 433—438.
148. SEARCY, D. G. (1975) Histone-like protein in the prokaryote *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. biophys. acta*, **395**, 535—547.
149. SEARCY, D. G. and STEIN, D. B. (1980) Nucleoprotein subunit structure in an unusual prokaryotic organism: *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. biophys. acta*, **609**, 180—195.

150. SEARCY, D. G. and DELANGE, R. J. (1980) *Thermoplasma acidophilum* histone-like protein. Partial amino acid sequence suggestive of homology to eukaryotic histones. *Biochim. biophys. Acta*, **609**, 197–200.
151. SEN, A. and LEVINE, A. J. (1974) SV 40 nucleoprotein complex activity unwinds superhelical turns in SV 40 DNA. *Nature*, **249**, 343–344.
152. SHANMUGAM, G., BHADURI, S., ARENS, M. and GREEN, M. (1975) DNA binding proteins in the cytoplasm and in a nuclear membrane complex isolated from uninfected and adenovirus 2 infected cells. *Biochemistry*, **14**, 332–337.
153. SHAPIRO, J. A. (1979) Molecular model for the transcription and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1933–1937.
154. SHAW, P. A., SAHASRABUDDHE, C. G., HODO, H. G. and SAUNDERS, G. F. (1978) Transcription of nucleosomes from human chromatin. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 2999–3012.
155. SIGAL, N., DELIUS, H., KORNBERG, T., GEFTER, M. L. and ALBERTS, B. (1972) A DNA-unwinding protein isolated from *Escherichia coli*: Its interaction with DNA and with DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 3537–3541.
156. SIRLIN, J. L. (1972) *Biology of RNA*. Academic Press, New York–London, 14.
157. SMITH, C. L. KUBO, M. and IMAMOTO, F. (1978) Promoter-specific inhibition of transcription by antibiotics which act on DNA gyrase. *Nature*, **275**, 420.
158. STEIN, A., WHITLOCK, J. P. JR. and BINA, M. (1979) Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin *in vitro* at physiological ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 5000–5004.
159. STETLER, G. L., KING, G. J. and HUANG, W.-M. (1979) T4 DNA-delay proteins, required for specific DNA replication, form a complex that has ATP-dependent DNA topoisomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 3737–3741.
160. STRÄTLING, W. and KNIPPERS, R. (1973) Function and purification of gene 4 protein of phage T7. *Nature*, **245**, 195–197.
161. SUGINO, A., HIGGINS, N. P., BROWN, P. O., PEEBLES, C. E. and COZZARELLI, N. R. (1978) Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 4838–4842.
162. TAYLOR, A. and SMITH, G. R. (1980) Unwinding and rewinding of DNA by the *recBC* enzyme. *Cell*, **22**, 447–457.
163. TOMIZAWA, J.-J., ANRAKU, N. and IWAMA, Y. (1966) Molecular mechanisms of genetic recombination in bacteriophage. VI. A mutant defective in the joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.*, **21**, 247–253.
164. TSE, Y.-C., KIRKEGAARD, K. and WANG, J. C. (1980) Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5560–5565.
165. TSE, Y.-C. and WANG, J. C. (1980) *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation or decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell*, **22**, 269–276.
166. VINOGRAD, J., LEBOWITZ, J., RADLOFF, R., WATSON, R. and LAIPIS, P. (1965) The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **53**, 1104–1111.
167. VINOGRAD, J., LEBOWITZ, J. and WATSON, R. (1968) Early and late helix-coil transitions in closed circular DNA. The number of superhelical turns in polyoma DNA. *J. Mol. Biol.*, **33**, 173–197.
168. VOGEL, T. and SINGER, M. F. (1975) Interaction of fl histone with superhelical DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 2597–2600.
169. VOGELSTEIN, B., PARDOLL, D. M. and COFFEY, D. S. (1980) Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell*, **22**, 79–85.
170. WACKERNAGEL, W. and RADDING, C. M. (1974) Formation *in vitro* of ineffective joint molecules of λ DNA by T4 gene 32-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 431–435.
171. WANG, J. C. (1969) Variation of the average rotation angle of the DNA helix and the superhelical turns of covalently closed cyclic λ DNA. *J. Mol. Biol.*, **43**, 25–39.
172. WANG, J. C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω . *J. Mol. Biol.*, **55**, 523–533.
173. WANG, J. C. (1974) The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. *J. Mol. Biol.*, **89**, 783–801.
174. WASYLYK, B. and CHAMBON, P. (1979) Transcription by eukaryotic RNA polymerases A and B of chromatin assembled *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **98**, 317–327.
175. WEINER, J. H., BERTSCH, L. L. and KORNBERG, A. (1975) The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. Properties and functions in replication. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1972–1980.

176. WICKNER, W. and KORNBERG, A. (1974) A holoenzyme form of deoxyribonucleic acid polymerase. III. Isolation and properties. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6244—6249.
177. WILCOX, K. W. and SMITH, H. O. (1976) Mechanism of DNA degradation by the ATP-dependent DNase from *Haemophilus influenzae* Rd. *J. Biol. Chem.*, **251**, 6127—6134.
178. WILLIAMS, K. R., SILLERUD, L. O., SCHAFFER, D. E. and W. H. KONIGSBERG (1979) DNA binding properties of the T4 DNA helix-destabilizing protein. A calorimetric study. *J. Biol. Chem.* **254**, 6416—6432
179. WOODCOCK, C. L. F. (1977) Reconstruction of chromatin subunits. *Science*, **195**, 1350—1352.
180. WORCEL, A. and BENYAJATI, C. (1977) Higher order coiling of DNA in chromatin. *Cell*, **12**, 83—100.
181. WU, J.-R. and YEH, Y.-C. (1973) Requirement of a functional gene 32 product of bacteriophage T4 in UV repair. *J. Virol.*, **12**, 758—765.
182. YARRANTON, G. T., MOORE, P. D. and SPANOS, A. (1976) The influence of DNA binding protein on the substrate affinities of DNA polymerase from *Ustilago maydis*: One polymerase implicated in both DNA replication and repair. *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 215—218.
183. YARRANTON, G. T. and GEFTER, M. L. (1979) Enzyme-catalyzed DNA unwinding: Studies on *Escherichia coli* rep protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1658—1662.
184. YARRANTON, G. T., DAS, R. H. and GEFTER, M. L. (1979) Enzyme-catalyzed DNA unwinding. A DNA-dependent ATPase from *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11997—12001.
185. YARRANTON, G. T., DAS, R. H. and GEFTER, M. L. (1979) Enzyme-catalyzed DNA unwinding. Mechanism of action of helicase III. *J. Biol. Chem.*, **254** 12002—12006.
186. ZARDI, A., SIRI, B., CARNEMOLLA, L., SANTI, W. D., GARDNER, 99 and HOCH, S. O. (1979) Fibronectin: A chromatin-associated protein? *Cell*, **18**, 649—657.
187. ZIMMER, S. G. and MILLETTE, R. L. (1975) DNA-dependent RNA polymerase from *Pseudomonas* BAL-31. II. Transcription of the allomorphic forms of bacteriophage PM2 DNA. *Biochemistry*, **14**, 300—307.

PROTEIN FACTORS THAT MODIFY THE CONFORMATION OF DNA

P. Juhász

Department of Biology, University Medical School, Pécs, Hungary

Proteins which cause conformation changes of DNA have been reviewed. A new taxonomical system of these proteins is proposed (Fig. 1). Proteins that react with single-stranded DNA seem to be factors stimulating transitions of the secondary structure of DNA. The main importance of double-stranded DNA binding proteins may be the generation of negative superhelical turns of DNA or their relaxation. It is very likely, that the nucleosomal structure of DNA is not a tool of the genetic regulation but that of the maintenance of an active conformation of DNA in template-dependent processes.

KÖNYVISMERTETÉS

Theoretische Ökologie (Szerk.: ROBERT M. MAY) Verlag Chemie, Weinheim—New York, 1980.

Az utóbbi évtizedekben — hazánkban és világszerte — kétségtelenül ugrásszerűen megnőtt az ökológia főbb témakörei iránti érdeklődés. Ebben kétségtelenül döntő szerepet játszik az emberi tevékenység környezetromboló hatása, s a következmények egyre világosabb felismerése. Környezetünk preventív védelme és a megrontott környezet „gyógyítása” alapos ökológiai vizsgáldást és az ennek nyomán leszűrhető elméleti megalapozást kíván. Ezt a tényt tekintette kiindulópontnak a neves szerkesztő, ROBERT M. MAY amerikai professzor akkor, amikor az alapképzésben már túljutott egyetemi hallgatók, diplomás biológusok és gyakorlati feladatokkal megbízott ökológusok, természet- és környezetvédő szakemberek részére, 10 neves amerikai, ill. angol teoretikus ökológus szerzőt maga köré tömörítve, az ökológia elméleti alapjait képező főbb témakörök összefoglaló áttekintéséből egy közös angolnyelvű kiadványt állított össze (1976-ban). És külön elismerést érdemel a nálunk alig ismert Verlag Chemie törekvése, amely e kiadványt a német nyelvet használó európai ökológusok számára is hozzáférhetővé tette.

Az elvont, elméleti munkák a szakirodalmat tanulmányozók széles tábora számára rendszerint szürke, színtelen olvasmánynak tűnnek. Ezt a veszélyt a szerző-kollektíva sikerrel el tudta kerülni, mert a könyv 13 fejezete témakört illetően is színes, változatos kínálatot nyújt az olvasónak.

A kiadvány nagyobb része (9 önálló fejezet) a növény-, ill. állatpopulációkat állítja az érdeklődés középpontjába. Ennek során az egyes populációk, ill. az együttélő különböző fajú populációk struktúráját és dinamikáját vizsgálják a szerzők teoretikus és empirikus nézőpontból egyaránt. A könyv kisebb része (az utolsó 4 fejezet) olyan különböző témaköröket ölel fel, amelyeknek gyümölcsöző kapcsolata van az elméleti ökológiával. Így szó esik a szocio-biológia alapproblémáiról, a paleontológia és az ökológia kapcsolatáról (a paleobiológiáról), a schistosomiazisról, mint az emberben élő egyik laposféreg-parazita okozta kórról azért esik szó az utolsó előtti fejezetben, mert ez jó modellként szolgálhat a parazita és gazdaszervezet közötti kölcsönhatásrendszer ökológiai vonatkozásainak elemzéséhez. Az utolsó témakör a kártevők és az ember kapcsolatát elemezve a korszerű növényvédelem stratégiájának ökológiai és ökonómiai vonatkozásait foglalja össze.

A populációkra vonatkoztatott témakörök is igen változatosak. A kiadvány szerkesztője, R. M. MAY több fejezetet is írt; bevezetésként egy faj populációs modelljét rajzolta fel előbb elvonatkoztatva, majd szabadföldi és laboratóriumi viszonyokra alkalmazva, s külön fejezetben taglalta 2, egymással a ragadozó és zsákmányállata közötti kölcsönhatás miatt integráldó populáció modelljét, de elemzi egy fejezetben a közösségbe tömörült több faj együttesének kölcsönhatásait, sőt egy szigetszerű védett terület populációdinamikai jellegzetességeit is. Az angol T. R. E. SOXTHWOOD a populáció néhány fontos paramétere (élőhely, populáció-nagyság, fertilitás), és a különböző (K-, r-) stratégiák elemzése iránt kelt különös érdeklődést. Az ugyancsak angol M. P. HASSELL az ízeltlábúak törzsén belül elemzi a ragadozó és zsákmánya közötti viszonyt, az ausztráliai G. CAUGHLEY pedig a növény és a herbivora állat (primer komzumens) közötti kölcsönkapcsolat elméleti vonatkozásait vizsgálja. Szó esik még a konkurenciáról és az ökológiai niche-teóriáról (E. R. PLANKA, USA), valamint a szukcesszióról (H. S. HORN, USA) is.

Már a témakörök ilyen nagyvonalú áttekintése is arra utal, hogy a 284 oldalas, grafikonokkal ízlésesen illusztrált és minden témakör terjedelmes irodalmát külön-külön is felölelő kiadvány nem könnyed olvasmány ugyan, de az ökológia elméleti alapkérdései iránt is érdek-

lődők szélesebb szakember-tábora számára sok-sok hasznos ismeretet nyújt anélkül, hogy az olvasót a definíciók és a matematikai levezetések útvesztőjébe sodorná.

A már említett érneyei, különösen gazdag témaválasztéka miatt az ökológia iránt érdeklődőknek feltétlenül figyelembe ajánlható a nemrég német nyelven is megjelent fenti című többszerzős cikkgyűjtemény.

Széky Pál

Progress in Botany: Morphology, Physiology, Genetics, Taxonomy, Geobotany. ELLENBERG, H., ESSER, K., KUBITSKI, K., SCHNEFF, E. and ZIEGLER, H. (eds.). 42., Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1980., 418 oldal DM 129.—

A kötet, a hagyományoknak megfelelően, összefoglalja és ismerteti a címben szereplő területek eredményeit, kiemelve és részletezve a jelentősebb új felfedezéseket.

Morfológia. A citológiáról szóló fejezetben először az általános és molekuláris sejttanban elért újabb eredményeket mutatja be. Így pl. a sejtfal poliszaharid és protein anyagaira vonatkozókat, a sejtfal primér vastagodásáról ROLAND és munkatársai (1979) új: „rendezett alegységek” hipotézisét, a sejtfal bevonat- és impregnáló vegyületeit. A plazmalemma, a mikro-tubulusok, mikrofonálzat és a plazmodezmák ultrastruktúrája és funkciója vizsgálatában is sok érdekes adatot ismertet. Külön fejezet foglalja össze a prokarióta sejt és az eukarióta algasejt citológiai és morfogenetikai kutatásában elért eredményeket. Így pl. bemutatják a fonalas kékalgák heterocisztái nitrogénkötő szerepét, felépítését. Az eukarióta algák közül pl. a Rhodophyceae plasztiszok fényhiány következtében történő degradálódását (SHEATH 1979), az ostoros alakok flagellumának finomszerkezetét, a Golgi-készülék a mikrotubulusok, mikrofilamentumok és a szekretáló sejtek ultrastruktúráját és működését ismerteti. Felvilantja a sejtmag működés és sejtosztódás számos érdekes részletét, majd az algasejt borítójára (sejtfal stb.), azok ultrastruktúrájára, citokémiájára vonatkozó közleményeket összegezi. A fejezet végén a különböző természetes vizekben élő algákban előforduló új, vírus-szerű (VLP) részecskékről tudósít. A virágos növények morfológiájával és anatómiájával önálló (második) fejezet foglalkozik. TROLL kézikönyve szellemében írt rövid kompendiumot GUÉDÉS (1979), kiegészítve az újabb eredményekkel. Mások a szerv-funkció orientált tipológiai elképzeléseket kétségbevonják, szerintük a jelenkori botanika nem ad eredményt ígérő filogenetikai koncepciót, sőt MEEUSE (1977) kétli a zárwatermők filogéniája rekonstruálása lehetőségét. További részletes fejtegetések a merisztémák, a levélmorfológia, a gyökérzet kutatásáról tájékoztatnak. Elágazástípus és növekedési forma egységét, különböző típusait mutatja be a harasztoknál, zárwatermőkénél. A virág és a virágzat kutatása is sok új eredményt hozott. GUÉDÉS (l. c.) az auantihális virágkeletkezés-teória helyességét támasztja alá. ENDRESS (1978) alapos tanulmányában a Hamamelidaceae virág euanthium jellegét meggyőzően bizonyítja. MACDONALD (1979) számos eredménye közül a Fagaceae-ra vonatkozó emelhető ki. E szerint a Fagus női virágzata csúcsvirágból és egy oldalvirágból áll, amelyeknek két murvája, ill. egy előlevélpárja van. A kupula négy kopácsa a murvák, ill. az előlevelek tengelyéből keletkezett, ezért az oldalhajttal homológ. A Quercus virágzatában csak az oldalvirág alakult ki, és az előlevelek tengelyéből keletkezik két, serleggő összenövő kupula kezdemény. Az egy-székűek virágának eredetét (pseudanthium alapon) több szerző érdekesen taglalja (BURGER 1977, BOGLE 1970, SATTLER—SINGH 1978 stb.).

Fiziológia. Részletesen tárgyalja a fotoszintézis egyes részterületeit (szénmetabolizmus: ezen belül érdekes a Crassulaceae-típusú savas metabolizmus, amelynél a PEP karboxiláz katalizálta éjszakai CO₂ fixálást tárgyalja; szénhidrátok metabolizmusa, másodlagos növényi anyagok, az alkaloida bioszintézis speciális esetei, növekedés és fejlődés élettan, mozgások).

Genetika. A kötet e harmadik része a növénygenetika területét öleli fel. Fejezetei: a replikáció, a rekombináció, a mutáció, a genetikai anyag működése, a sejtmagon kívüli átöröklés. Utóbbi a mitokondriális gének és más extrakromoszomális elemek szerepét foglalkozik.

Taxonómia. A kötet negyedik része a virágtalan növények rendszertani kutatása helyzetéről tájékoztat. Először a baktériumok rendszerezésével (nomenklatúra, faj feletti, faj- és fajalatti rendszertani kategóriák), az osztályozás technikájával és kritériumaival foglalkozik (numerikus taxonómia, szerológia, bakteriofág-tipizálás, sejtkötők kémiai összetétele, genetikai jellegek) igen gazdag irodalom alapján. A „nagy osztályozásban” változatlanul vitatott a prokarióta kékes-zöld algák elhelyezése, többen Cyanobaktériumok néven a baktériumokhoz csatolnák. Részletekre itt nem térhetünk ki, csupán utalunk az utóbbi álláspontot igazolni kívánó (a riboszóma RNS sequencia és egyéb kémiai jegyek alapján) szemléletes prokarióta törzsfá ábrára. A következő fejezet az algák rendszertanát és filogéniáját öleli fel. Új eredmények elsősorban az ultrastruktúra és kemotaxonómiai vizsgálatoknak köszönhetőek. Néhány általános kiemelés után, algacsoportok szerint történik az ismertetés.

Helyenként kitérnek a szerveződés ökológiai feltételeire, az algák indikátor szerepére. Mindezek az algológiai kutatás fellendüléséről tanúskodnak. A gombák rendszertana és filogéniája fejezet a rendszerezés problémáival kezdődik. Érdekes megállapítása, hogy a gombák teljes körére vonatkozó biokémiai adatok összegzése meglepően igazolta azok morfológiailag alapozott rendszerét (RAGAN—CHAPMAN 1978). Számos tanulmány foglalkozik az egyes gombaosztályok képviselőivel. Pl. újabb meggyőző bizonyítékok vannak (sejtfal összetétel tekintetében) az Endomycetes és Ascomycetes osztályok különbözőségére, előbbi és a Basidiomycetes bizonyos jegyei hasonlóságára. A Basidiomycetes „nagygombák” is az érdeklődés előterében voltak, amit számos monográfia bizonyít. A közismert gyűrűs tölcsergombáról (Armillariella mellea) kimutatták, hogy — mint „gyűjtőfajt” — legalább 10, reprodukcióban izolált „kis faj” alkotja. (ANDERSSON—ULRIECH 1978, 1979.) A negyedik, viszonylag kiterjedelmű fejezet nemcsak a zuzmók rendszertanáról, hanem a teljes zuzmókutatás helyzetéről nyújt képet, igen gazdag és változatos irodalom alapján. Kitér a morfológia és egyedfejlődés eredményeire. Legfeltűnőbb morfológiai eredmény egy teljesen újszerű vegetatív diaspora típus, a pseudoisidium felfedezése (VÉZDA 1979). JAHNS (1979) a telepalkulás 8 éves szukcesszióját részletezi igen érdekesen. Filogenetikai újság RIEDL (1979) közlése, amelyben a *Verrucaria mucosa*-t egy vörös alga (*Hildebrandia rubra*) és egy Ascomyceta szimbiózisának tartja! Nagyszámú rendszertani monográfia, florisztikai, areálgeográfiai és cönológiai közlemény, valamint kemo-taxonómiai cikk a zuzmókutatás élénkségét mutatja.

Az ötödik fejezet a mohakutatás helyzetét tárgyalja. Először felsorolja a megjelent összefoglaló bibliográfiákat, majd a morfológia, rendszertan és evolúció újdonságait ismerteti. Utóbbiaknál minden újabb adat a Bryophyta és Pteridophyta közös ősrre visszavezethető párhuzamos fejlődésére utal (HÉBANT 1978). Az Anthoceroophyta, Hepaticae s. str., Bryidae és Sphagnidae a korai devontól önállóan fejlődtek. Igazolódtak morfológiai, anatómiai és citológiai jegyek alapján, az Anthoceroophyta önállósága, s feltételezett a Psilophyta elődjéitől (Propsilophytatae) való leszármaztatása (FREY 1977). Összegezve: a Bryophyta egyáltalán nem reliktum jellegű, hanem nagy evolúciós potenciállal rendelkező törzs. Ezen belül a lombos moha rendek filogenetikai megítélése egyértelműbb, legősibb a Polytrichales, a Pleurocarpi pedig levezetett (SMITH—FREY 1977, 1978). Az egész törzssel kapcsolatban egyre inkább a progresszív redukciót tételezik fel, amely jelentős ökológiai szerepkörbe való erőteljes réccens evolúcióval, sajátos alkalmazkodási struktúrák kifejlesztésével jár együtt. Számos területi flóra, génusz és család monográfia jelent meg. SMITH (1978) citogenetikailag alapozott mohaevolúció tanulmánya az osztályok kromoszóma alapszámait figyelembevéve, különösen a lombos moháknál mutat rá értékes rokonsági összefüggésekre (szemléletes törzsfával!). Kémiai anyagokról még keveset tudunk. KOPONEN (1978) szerint a kémiai adatok magasabb egységekre vonatkozóan kevéssé használhatók, fajelválasztásoknál inkább. A zárvatermőknél ismert flavonoidok májmoháknál gyakoriak (MARKHAM 1978). Igen érdekes, hogy a Takakia, a lombos mohák és a harasztok egyformán triterpéneket tartalmaznak (ASAKAVA et al. 1979). Az ökológiai-cönológiai terület kiemelhető tanulmánya a mohák élet-stratégiai (Life strategy) csoportosításával foglalkozik (DURING 1979). Az ökológiailag, populációs jelenségek figyelembevételével alapozott élet-stratégia típust szorosan korreláltak tekintik az életformával (csoportjai: szökevények, telepesek, egyéves ingázók, rövidéletű (efemér) ingázók, évelő ingázók, évelők; ezekből az első négy csoport képviselői a pionir jellegűek). LEE és LEROY (1979) mohák szűk vízigény intervallumát és viszonylag tág hőtűrését közlik. FLOCK (1978) szerint a legnagyobb moha fitomassza produktivitás a nedves, sokáig hótakarta helyeken tapasztalható. Az Acrocarpi viszonylag szárazabb, a Pleurocarpi viszonylag nedvesebb termőhelyeken települnek. A hatodik — a harasztok rendszertanával foglalkozó fejezet — bibliográfiák bemutatásával kezdődik, majd a törzs rendszertani, filogenetikai áttekintésére (PICI—SERMOLLI 1977) hívja fel a figyelmet. A Lycopsida osztályt IVATSUKI (1977) rendszerezi. Számos további osztály, de főleg nemzetség monográfia és Kína harasztjai (CHING 1978) értékes feldolgozások. Citológiai áttekintést LOVIS (1979) ad a törzsről, több mint 500 bioszisztematikai tanulmány alapján. Érdekes a közép-amerikai *Pleuroderris*, amely intergenerikus hibrid. Az európai Cheilanthes 7 faja közül (WAGNER 1978) 3 faj hibridizáció és kromoszómakettőződés eredménye (NARDI et al. 1978). BOUHARMONT (1977) és BROWNSEY (1977) Asplenium citotaxonómiai vizsgálatai, a nemzetség evolúció-mechanizmusát világítják meg. Kézikönyvek, dolgozatok jelentek meg a harasztok morfológiája, anatómiája és biológiája témakörökben. RASHID (1976) és SPORNE (1975) ezek közül kiemelhető Fénymikroszkópos harasztspóra képek jelentek meg Kremp és KAVASAKI (1977) könyvében. A spóratípusok földi elterjedéséről ITO (1978) közöl térképet. SAHASHI (1979) a Botrichium nemzetség spórákat összehasonlítólag tanulmányozta. A harasztok természetéről PERL (1979) írt kézikönyvet. Ezek mellett nagyszámú florisztikai közlemény jelent meg.

Geobotanika. Az areálgeográfiai, florisztikai fejezetben mérsékelt Eurázsia új flóraműveit ismerteti. Kiemelkedő a Flóra Europaea sorozat 5., zárókötetének megjelenése, amellyel értékes modern színvonalú flóramű mutatja be kontinensünk flóráját (11 557 faj). Francia (GUINOCHE—VILMORIN 1978), német (OBERDORFER 1979), román (BELDIE 1977—79) stb. országflórák jelentek meg, a bolgár a 7. köteténél tart. Tovább haladt Európa flóra atlasza, megjelent a raszter-térképek 4. kötete (JALAS—SUOMINEN 1979). Hasonló flóratérképezés részterületeken is folyt, s megjelent több részterkép-bibliográfia. Több tanulmány foglalkozott az area határok ökológiai okaival, új javaslatok születtek a Föld flórabesorolására. A negyedkori flóra- és vegetáció-történeti fejezet gazdag irodalom alapján foglalja össze a pliocén—pleisztocén átmeneti időszak, a pleisztocén klíma és növénytakaró történetre vonatkozó újabb eredményeket. Foglalkozik a holocén hasonló kérdéseivel, az ökológiai viszonyok alakulásával. A cönológiai (szociológiai) fejezet kézikönyvek (pl. BORMANN—LIKENS 1979, WALTER 1979, TÜXEN 1979, GOODALL—PERRY 1978), bibliográfiák ismertetésével kezdődik, majd kvantitatív mintázatvizsgálatokkal (pl. GREIG—SMITH 1979, BRAUN—BLANQUET 1979, MALMGREN 1979), a mintázat természetes változásaival, vegetáció térképek ismertetésével foglalkozik. Ezután a nagy vegetációövek szerint mutatja be a fontosabb új közléseket. A geobotanika utolsó fejezete a kísérleti ökológia témakörében közölt eredményeket összegzi. Növényéletteni-ökológiai (ETHERINGTON 1978), alkalmazott ökológiai (Santos 1978) kötetekről, elméleti ökológiai (MAY 1976) — matematikailag alapozott — könyvről, statisztikai közelítésű ökológia művekről (PIELOU 1977, SMITH 1979) tudósít. Számos interdiszciplináris, ökoszisztéma struktúrával és funkcióval foglalkozó szintézis kötet jelent meg az IBP eredményeiről (LAMOTTE—BOURLIERE 1978, DYKJJOVÁ—KVET 1978, GOODALL—PERRY 1979, COUPLAND 1979 stb.). A környezeti faktorok, a klíma, a fény, a víz, a talaj tényezői és más kémiai tényezők (nehéz fémek, kén és kéndioxid, olaj, radioaktív izotópok) hatásairól gazdag irodalom alapján nyújt tájékoztatást. Végül a kötet utolsó fejezetében a *mykorrhiza* kérdés frisebb irodalmáról ad részletes képet.

Összefoglalva megállapítható, hogy a Fortschritt d. Botanik 42. kötete az érintett diszciplínának gazdag, a fejlődést valóban tükröző eredményeiről nyújt sokoldalú, gondosan szelektált, kritikailag is értékelt tájékoztatást. A kötet felhasználhatóságát szemléletes illusztrációk, részletes tárgymutató és gondos kiállítás növelik.

Simon Tibor

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója
Műszaki szerkesztő: Sándor István
A kézirat nyomdába érkezett: 1982. II. 20 — Terjedelem: 10.50 (A/5) ív
83.10608 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

TARTALOMJEGYZÉK

KORÁNYI PÁL: A transzfer RNS és lehetséges enzimfunkciójának értelmezése általános térszerkezete alapján	3
SZABAD JÁNOS és CZEIZEL ENDRE: Az anyai hatás biológiai jelentősége	11
S.-RÓZSA KATALIN, HIRIPI LÁSZLÓ és STEFANO, G. B.: Opiát receptorok előfordulása és farmakológiai jellemzése Molluskák központi idegrendszerében	37
TRÉZL LAJOS, RUSZNÁK ISTVÁN, TYIHÁK ERNŐ és SZARVAS TIBOR: L-aszcorbinsavval gátolt spontán N-metilezési és N-formilezési reakciók L-lizin és formaldehid között és ennek biokémiai vonatkozásai	55
JUHÁSZ PÉTER: A dezoxiribonukleinsav szerkezetét módosító fehérjefaktorok	73

Könyvismertetések

ROBERT M. MAY: Theoretische Ökologie (<i>Széky Pál</i>)	115
H. ELLENBERG et al.: Progress in Botany. Vol. 42 (<i>Simon Tibor</i>)	116

Terjeszti a Magyar Posta

Előfizethető a hírlapkézbesítő postahivataloknál és a Posta Központi Hírlap Irodánál (PKHI 1900 Budapest, József nádor tér 1.) közvetlenül vagy postautalványon, valamint átutalással a PKHI 215-96162 pénzforgalmi jelzőszámra. Előfizetés bejelenthető az Akadémiai Kiadónál (1363 Budapest, Alkotmány utca 21. Telefon: 111-010).

Példányonként beszerezhető: az Akadémiai Könyvesboltban (1368 Budapest, Váci utca 22. Telefon: 185-881), a PKHI Hírlapboltjában (1055 Budapest, Bajcsy Zsilinszky út 76. Telefon: 116-269) és minden nagyobb árusítóhelyen.

Előfizetési díj egy évre: 52 Ft

1 szám ára: 26 Ft

Index szám: 26 073

Külföldön terjeszti a KULTÚRA Külkereskedelmi Vállalat.
H-1389 Budapest, Pf. 149.

Ára: 26 Ft

Előfizetés egy évre: 52 Ft

INDEX: 26.073
ISSN: 0133-3844

INDEX

BIOLÓGIA (Budapest)
30/1 (1982)

KORÁNYI, P.: Interpretation of Possible Enzymatic Function of tRNA-s on the Basis of Their General Three-Dimensional Structure	3
SZABAD, J. and CZEIZEL, E.: The Biological Significance of the Maternal Effect	11
S.-RÓZSA, KATALIN, HIRIPI, L. and STEFANO, G. B.: Distribution and Pharmacological Properties of Opiate Receptors in the Central Nervous System of Molluscs	37
TRÉZL, L., RUSZNÁK, I., TYIHÁK, E. and SZARVAS, T.: Spontaneous N-Methylation and N-Formylation Reactions Between L-Lysine and Formaldehyde Inhibited by L-Ascorbic Acid and Their Biochemical Aspects	55
JUHÁSZ, P.: Protein Factors that Modify the Conformation of DNA	73

30441



biologica

30, 1982/2

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

SZERZŐINK SZÍVES FIGYELMÉBE!

A BIOLÓGIA (korábban *Biológiai Közlemények*) évente két füzetet tartalmaz. Elsősorban az elméleti és molekuláris biológia, a sejttan, örökléstan és a kísérletes onto- és filogenetika tárgyköréből közöl cikkeket. A dolgozatok következő típusait részesítjük előnyben:

- teoretikus cikkek;
- valamely munkacsoport kísérletekre alapozott elméletének ismertetése, elsősorban a koncepció bővebb kifejtése;
- a biológia valamely részterületének legújabb irodalmát összefoglaló (review) munkák;
- az adott formában másutt nem publikált kísérleti beszámolók.

A lap ezenkívül vitákat indító vagy azokhoz hozzászóló cikkeket, valamint könyvismertetéseket és kongresszusi beszámolókat is közöl.

A kéziratokat — az intézmény vezetőjének jóváhagyása után — két példányban, a mellékleteket (rajzokat, fényképeket) egy példányban a következő címre kérjük beküldeni: **BIOLÓGIA Szerkesztősége**, Dobozy Ottó technikai szerkesztő, **1445 Budapest, Nagyvárad tér 4.** A cikkek elfogadásáról a Szerkesztő bizottság — a beérkezett szakértői vélemények alapján — évente két alkalommal dönt. Az elutasított dolgozatokat visszaküldjük, ill. javasoljuk más profilú laphoz való beküldését.

A dolgozatok **fejléce** tartalmazza a címet, a szerző(k) teljes nevét, az intézet és a város megnevezését, valamint a **kulcsszavakat**.

A teoretikus cikkek és az irodalmi feldolgozások **tagolása** tetszőleges. A bonyolultabb tagolású cikkekhez „**fejezettrangsor**” kell mellékelni, amelyből világosan kiténik az egyes fejezetek egymáshoz való viszonya. A decimális fejezetszámozást lehetőleg kerüljük. Az eredeti kutatómunkát ismertető cikkeket a következőképpen kell tagolni: Bevezetés — Anyag és módszer — Eredmények — Megvitatás — Összefoglalás — Irodalom.

A szövegben **dőlt betűvel** (amit folyamatos vonallal való aláhúzás jelöl) kell kiemelni:

- a tudományos genus- és fajneveket;
- az in vivo, in vitro és a de novo kifejezéseket;
- valamint az ábrákra, ill. a táblázatokra való hivatkozáskor azok sorszámát.

A szerzők neveit **NAGYBETŰVEL**, a ritkított szöveget **ritkán** kell írni.

A szövegben az irodalomra a cikkek sorszámával vagy pedig a szerző(k) nevével és a cikk sorszámával kell hivatkozni. A cikkek sorszámát szögletes zárójelbe kell tenni.

Az **irodalomjegyzéket** sorszámozva, ABC sorrendben kell összeállítani a következő példák szerint:

A) folyóiratcikk esetén:

1. BROWN, J. (1973) Heredity and ontogeny. *Nature*, **238**, 19—27.

B) könyv idézések:

1. MOURANT, A. E., KOBECA, C. and DOMANIEVSZKA-SZOBSCZAK, K. (1976) *The distribution of the human blood groups and other polymorphisms*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford

C) gyűjteményes mű felhasználásakor:

1. MILLER, O. L. and LEATTI, B. L. (1969) Nucleolar structure and function. In: LIMA DE FARIA, A. (ed.): *Handbook of molecular cytology*. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 605—619.

Az irodalomjegyzékben csak azokat a szerzőket lehet feltüntetni, akikre szöveg közben hivatkozás történik.

A lapban megjelenő dolgozatokat külföldi **referáló folyóiratok** angol nyelvű összefoglalóik, ill. címük alapján ismertetik. Ezért célszerű az **angol összefoglalás** informatív, szabatos megfogalmazása.

Az **ábramagyarázatokat** — magyar és angol nyelven — külön lapra kell gépelni, ábránként új bekezdésben. A grafikonokat és rajzokat ábra, a fényképeket kép megjelöléssel kell sorszámozni, arab számokkal. A cikkhez mellékelt ábrák hátoldalán szerepeljen azok sorszáma és a szerző neve. Színes ábrát a Szerkesztőség nem fogad el. Külön lapon kell mellékelni a **táblázatok** magyar és angol nyelvű címét római számokkal. Az ábrák és táblázatok magyar és angol sorszámát, valamint a magyar címét folyamatos vonallal való aláhúzással kell kiemelni.

A dolgozat végén jelöljék meg a szerző nevét és munkahelyének **pontos címét** (irányítószámmal).

A megfogalmazásnál ügyeljenek a világos, magyar stílus használatára, a helyesírási kérdések eldöntésénél az MTA legújabb kiadású „A magyar helyesírás szabályai”-ban foglaltak tekintendők irányadónak.

A közlemény elfogadása esetén a szerzők megkapják a **hasáb-** és a **tördelt lenyomatot**. Ezen a nyomda hibájából eredő javításokat kék, a szerzői korrektúrát piros színnel kell bejelölni. A kézirattól eltérő javításokat vagy kiegészítéseket csak kivételes esetekben lehet elfogadni.

Szerzőinket a kiadott cikkekért az Akadémiai Kiadó által szabályozott **ívhonorárium** illeti meg, és amennyiben előzetesen nem rendelkeznek másként, térítés ellenében 100—100 **különlenyomatot** bocsátunk rendelkezésükre.

BIOLÓGIA

ELMÉLETI ÉS KÍSÉRLETI BIOLÓGIAI
FOLYÓIRAT

A szerkesztő bizottság elnöke:
CSABA GYÖRGY

Szerkesztő bizottság:
CSÁNYI VILMOS
DOBOZY OTTÓ
(technikai szerkesztő)
FARAGÓ ANNA
GÁNTI TIBOR
HEGYI GYÖRGY
KISZELY GYÖRGY
KOMÁROMY LÁSZLÓ
VIDA GÁBOR



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

NEUROKÉMIAI GENETIKA

CSÁNYI VILMOS

Eötvös Loránd Tudományegyetem Magatartásgenetikai Laboratórium, Göd

Beérkezett: 1982. január 12-én.

Kulcsszavak: magatartásgenetika, neurokémia, genetika, rekombináns törzsek

Bevezetés

Genetikai módszerekkel bármiféle fenotípus vizsgálata elősegíthető. Különösen alkalmas ilyen megközelítésre a jól identifikálható és egzaktan mérhető neurokémiai fenotípus. Mégis úgy tűnik, hogy a neurokémikusok kevésbé használták ki a genetika által adott lehetőségeket, és a neurokémiai genetika speciális problémái elvegyülnek a magatartás-genetika [45], a farmakogenetika [17] és az idegrendszer valamennyi strukturális aspektusát felölelő neurogenetika [15, 140] problémái között.

A jelen megközelítés az elért eredmények rövid reprezentatív összefoglalása mellett elsősorban a lehetőségeket kívánja bemutatni. Ezért a fejezet szerkezetét az alkalmazott genetikai technikák logikus egymásra épülése szabja meg, háttérbe szorítván a használt fajok milyenségét vagy a genetikai megközelítéssel megcélzott neurokémiai problémát magát. Nem törekszünk arra sem, hogy az egyes részeredmények kimerítő „up-to-date” elemzését adjuk.

A genetikai elemzés lehetőségei és korlátai

Az élőlények különböző tulajdonságai visszavezethetők az organizmusokban található kémiai struktúrákra és kémiai reakciókra; ezekért pedig végső soron a genetikai anyag, a DNS a felelős. A legkülönbözőbb kategóriába sorolható, látható, megnyilvánuló, mérhető tulajdonság a *fenotípus*. A fenotípus kialakulását befolyásoló genetikai anyag egységeit géneknek, az adott egyed vagy törzs szóban forgó fenotípusát meghatározó gént vagy géncsoportot pedig *genotípus*nak nevezzük. A genetikai vizsgálat célja a fenotípus és a genotípus közötti oksági láncolat felderítése. Az idegrendszerrel kapcsolatos fenotípusok rendkívül sokfélék lehetnek. Hiszen ide tartoznak a különböző magatartási fenotípusok, az idegrendszer saját struktúrájának paraméterei, és ide tartozik az idegsejtekben zajló valamennyi biokémiai reakció. Éppen ezért az egyes fenotípus csoportok vizsgálata részben szeparálódott. A magatartás-genetika általában megelégszik a viselkedési fenotípus genetikai vizsgálatával, és átugorja a neurális szubsztrátumot. A neurológiai vagy neurogenetika pedig úgy igyekszik leegyszerűsíteni feladatát, hogy főként a neuronhálózatok struktúrája és a gének között keresi az összefüggést, mellőzve a végső fenotípust, a viselkedést. A neurokémiai genetikának az idegrendszerben zajló kémiai reakciók és

a gének kapcsolatával kellene foglalkoznia, de ez az elhatárolás csak nagyon hozzávetőleges. A neuronok, neuronhálózatok struktúrája is kémiai reakciók eredménye, vagyis tulajdonképpen ide tartozik; ugyanez mondható el a magatartásról is. A neurokémiai genetika kijelölése nem csak a szerveződés vertikális szintjén okoz problémákat. A neurokémiai reakciók csak részét képezik az egész szervezetet fenntartó biokémiai reakció komplexumnak. A neurokémiai fenotípus kialakulásában a szervezet egyéb szabályozó tényezői is tevékenyen részt vehetnek.

A fenotípus és genotípus kapcsolatára alkalmazva az elmondottakat nyilvánvaló, hogy egy-egy fenotípus csak kivételesen feleltethető meg egyetlen fő (major) gén hatásának. Az esetek többségében a fenotípust komplex folyamatok hozzák létre, amelyben számos apró (minor) gén hatása mutatható ki, vagyis a fenotípusok általában poligénesek [120]. Ha viszont egy adott gént veszünk szemügyre, szinte minden esetben kimutatható, hogy hatását nemcsak egy tulajdonságra, egy fenotípusra fejti ki, hanem sokféle: pleiotrop hatású. Tovább bonyolítja a fenotípus és a genotípus közötti kapcsolatot az, hogy a gének más-más hatást fejtenek ki az adott fenotípusra attól függően, hogy milyen adott genotípus részei, mert a gének egymás hatását is képesek befolyásolni dominancia, episztázis révén. Aránylag kevés olyan fenotípust ismerünk, amelynek kialakulásában a génektől a tulajdonság megnyilvánulásáig terjedő oksági láncolatot teljesen felderítették volna, de tudjuk, hogy maguk a génhatások is sokféle lehetnek [110]. Egy gén irányíthatja egy fehérje szerkezetének kialakulását (struktúr gén), lehet a génnek szabályozó funkciója, serkenteti vagy gátolhatja a struktúr gén működését (regulátor gén). Lehet a génhatás olyan, hogy egy adott fehérje módosítását eredményezi (processzáló gén). Végül befolyásolhatja egy gén az adott struktúr gén aktivitásának időbeli megjelenését (temporális gén).

A génhatások eredményeként megjelenő fehérjestruktúrák is különféle szerepet játszhatnak a fenotípus kialakulásában. A neurokémikus számára a legfontosabb ezek közül az enzimfunkció, amely maga is bonyolult szabályozás objektuma. A szabályozó folyamatok természetüknél fogva rendkívül érzékenyek a környezetre. Ha a fenotípus kvantitatív paraméterekkel jellemezhető, a paraméterek széles tartományban mozoghatnak, amikor a fenotípusért felelős genotípus különböző környezetben nyilvánul meg.

Az organizmus ezernyi szállal kapcsolódik környezetéhez: a hőmérséklet, a táplálék, a környezet kémiai befolyása, magasabb rendűeknél a legkülönbözőbb szociális hatások stb. mind befolyásolják a különböző génaktivitások lefolyását, és ezáltal a fenotípust. A környezet változásaira bekövetkező fenotípusos válasz ezért sokszor meghaladja és elfedheti a genotípusban levő különbségek fenotípusos megnyilvánulását. A genetikai metodológia legfontosabb törekvése éppen ezért a genotípus szigorú kontrollálásával a környezet-hatások felderítése és kísérleti célra történő felhasználása. Végül a legutolsó, bár az előbbiekével azonos fontosságú tényező az idő. Minden organizmus saját idődimenziójában él, amely a zigóta kialakulásától az egyed haláláig terjed. A fenotípus ebben az időtartományban folyamatosan és irreverzibilisen változik, legfeljebb bizonyos periódusokban a változás sebessége kicsi. Egy korai szakaszban lezajló kémiai folyamat olyan jelentős kémiai változást eredményezhet, amely csak az organizmus egyedfejlődésének jóval későbbi stádiumában figyelhető meg.

Az egyedi szervezet genetikai szervezethez eddig elmondottakat ki kell egészítenünk azzal, hogy az organizmus fölötti szerveződési szintek is genetikai történések helyei. Az azonos fajú élőlények együttélő, szaporodó csoportja a *populáció*, amelyre jellemző a magas fokú genetikai *variabilitás*, amely a gének *polimorfijára* vezethető vissza. A genetikai variabilitás, valamint a fenotípust kialakító szabályozórendszereknek a környezeti tényezőkkel való kölcsönhatása hozza létre a fenotípus variabilitását, amely a kísérleti munka kiindulási pontja.

A genetikus legelső és legegyszerűbb kérdései éppen a genetikai variabilitásnak a fenotípusra gyakorolt hatására vonatkoznak. A végső cél az adott fenotípust létrehozó folyamatok teljes felderítése a közreműködő kémiai reakciókon keresztül egészen az adott gének molekuláris szerkezetéig. A legtöbb esetben azonban ez csak távoli ideál, a praktikus célkitűzés sokkal szerényebb: olyan fix pontot találni a gének → fehérjék → kémiai reakciók → ideghálózati struktúra → magatartás hierarchiában, amelyből kiindulva a mechanizmuskutatás megkezdhető. Ez minden esetben valamilyen egyértelmű genotípus — fenotípus összefüggés felderítését jelenti. Ehhez a feladathoz a genetikus két változót alkalmaz; változtatja a genotípust és a környezetet. Azonos, változatlan genotípusok fenotípusát *különböző környezeti* feltételek között vizsgálva elkülönítheti a környezeti hatások jó részét. Azonos környezeti — kísérleti — feltételek mellett *különböző genotípusokat* alkalmazva megállapíthatja a genetikai *különbségek* hatását a fenotípusra. A két változó alkalmazásával a genotípus—fenotípus összefüggés — ha van, és a kísérletek egyéb szempontból is korrektek — megállapítható. Egyszerűbb esetben a fenotípusban jelentkező különbségek egy részét valamilyen fő gén(ek) hatására vezethetjük vissza. Bonyolultabb esetben, főként ha az adott fenotípusban az apró gének hatása jelentős, csak statisztikai paraméterekkel jellemezhetjük a közreműködő genetikai tényezőket, amelyek a fenotípus fiziológiai mechanizmusáról semmit sem mondanak. A genetikai analízis részletproblémáiról számos kitűnő régebbi és újabb összefoglaló jelent meg [29, 30, 44, 51, 120].

A következő fejezetekben főként a genetikus rendelkezésére álló genetikai változóval, a kísérleti állatok lehetséges genotípusaival és ezek alkalmazásával fogunk foglalkozni.

Természetes és kísérleti populációk

A különböző állatpopulációk és az egyes populációk egyedeinek genetikai jellemzésére különféle¹ paramétereket használunk, ezek részletes analízise megtalálható megfelelő kézikönyvekben [12, 51, 64, 79, 145]. A neurokémiai kísérletek tervezését legközvetlenebbül érintő paraméterek *egyedek* esetében a genetikai homogenitás jellemzői. Egy-egy gén általában több változatban fordul elő a természetes körülmények között élő populációkban, így a diploid szerkezetű állati genom génjeinek jó része heterozigóta állapotban van. Az individum esetében tehát jellemző lehet egy-egy vizsgálni kívánt gén homozigóta, illetve heterozigóta volta, másrészt jellemzi az egyedeket a *teljes genom* homogenitásának mértéke.

A természetes populációkban, különböző módszerekkel, leggyakrabban fehérje gélelektroforézissel mért heterogenitás 20—30% [19, 77, 78, 98, 99,

116, 117]. Miután ez a módszer körülbelül egyharmadát mutatja ki a valódi heterogenitásnak, valószínű, hogy a természetes populációkban a heterogenitás a 60–90%-ot is eléri. Ha a genom nagyobb része heterozigóta állapotú génekből áll, az egyfajta kiegyenlített reakciókészséget biztosít az egyed számára. A különleges környezethatásokat a genetikai buffer-kapacitás tompítja [72]. Ezért a természetes populációk egyedei általában erősebbek, ellenállóbbak és kevésbé hajlamosak a szélsőséges reakciókra, mint a homogén genommal rendelkező egyedek. Egyes egyedekben nem tudjuk megállapítani a teljes genom heterogenitásának mértékét, de természetes populációkban nagyobb számú egyed megfelelő vizsgálatával és statisztikai módszerekkel erre következtethetünk. Mesterséges populációkat pedig igyekszünk olyan módon előállítani, hogy a heterogenitás mértéke pontosan számítható legyen. Így az egyedre vonatkozó paramétereket a *populációt* jellemző statisztikai paraméterekkel pótoljuk [40]. A teljes genom homogenitásának statisztikai mérőszáma a beltenyészési koeficiens (F), amelynek értéke 0 és 1 között változhat, és megadja, hogy a populáció egy tetszőleges egyedében milyen valószínűséggel találhatunk tetszőleges génben homozigóta állapotot. Ismeretlen eredetű populációnál vagy természetes populációnál az F értéket 0-nak vesszük, tekintet nélkül a homogenitás valódi, de igen nehezen meghatározható értékére. Az ellenőrzött generációk során pedig a tenyésztési típustól függően [40, 51] *számíthatjuk* a beltenyészési együtthatót.

A populációk genetikai jellemzésének másik fontos paramétere a genomok *közötti* homogenitás mértéke. Erre a genotípusos egyezés 0–1 közé eső mérőszámát használhatjuk (I), amely megadja, hogy egy populáció tetszőleges két egyedének tetszőleges génjeiben milyen valószínűséggel fordul elő megegyező genotípus [95]. A természetes populáció két-két egyede számtalan lokuszban hordozhat egymástól különböző allélokat, így két azonos genotípus együttes előfordulásának valószínűsége gyakorlatilag zérus. Genetikailag homogén egyedek vagy homogén szülőktől eredő F_1 hibridek populációiban az egyedek genetikailag azonosak, a genotípusos egyezés értéke megközelítheti az egységet. A megegyező genotípusokat tartalmazó populációkat *izogén* populációknak nevezzük. Ezek természetesen hordozhatnak heterozigóta állapotú géneket is, F értékük lehet egészen alacsony.

A genetikai paraméterek alapján a természetes és kísérleti populációkat többféleképpen rendszerezhetjük. Az általunk itt használt rendszer a populációkat eredetük alapján osztályozza, figyelembe véve a lehetséges polimorfíát, a homogenitás és a genotípusos egyezés mértékét.

Azokat a populációkat, amelyek polimorfíát mutatnak, és egy-egy génnek kettőnél is több változata fordulhat elő, *polilineális* eredetűnek tekintjük. Ide tartoznak a természetes populációk és a random, valamint a kitenyésztett populációk. A genetikai homogenizálás során a beltenyészítés különböző módszereivel homogén törzseket hoznak létre, ezek legfeljebb négy különböző genom kombinációjaként foghatók fel, tehát quatrilinéálisak. Két genom kombinációjával kaphatjuk a bilineális törzseket; ide tartoznak a rekombináció és gynogenetikus eredetű törzsek. Egy-egy beltenyésztett törzsből különböző módszerekkel leszármaztatott, rendszerint csak egy vagy néhány génben különböző törzseket unilineálisnak tekintjük. Az osztályozást az *I. táblázat* mutatja be. Amint a táblázatból látható, a különböző populációk genetikai paraméterei még azonos eredet esetében is jelentősen eltérhetnek. Nagyon fontos tehát, hogy a neurokémiai kísérletek tervezésénél a felhasznált populáció

a kísérleti célra a legalkalmasabb legyen. Miután általában nem egyedeket, hanem csoportokat használunk a kísérletekhez, legfőképpen arra kell figyelemmel lenni, hogy a felhasznált állatok genetikai homogenitása milyen.

I. táblázat

Természetes és kísérleti populációk genetikai rendszere
Table 1. Genetical system of natural and experimental populations

Eredet	Típus	F	I	Homozigóta gének %-a
Polilineális	vad, outbred, random-bred	0	0	10–40
Quatrilineális	inbred törzsek, klónok	1 0–1	1 1	100 10–100
Bilineális*	rekombináns és gynogenetikus törzsek, kongenikus törzsek	1	1	100
Unilineális	koizogén törzsek	1	1	100***
Hibridek	F ₁ , F ₂ hibridek és visszakeresztezett populációk	0	0–1	10–40**

* A bilineális eredet jelölést a rekombináns törzsekre BAILEY alkalmazta először.

** Egymástól távoli törzseket keresztezve.

*** Ezek a törzsek egy-egy adott gént heterozigóta állapotban is tartalmazhatnak, de ez a teljes genom homogenitását csak igen kis mértékben változtatja.

A homogenitást két értelemben vizsgáljuk a genomon *belül*, azaz az individuális genomok homogenitását és a genomok *közötti* homogenitást, vagyis a genetikai identitás mértékét a választott csoporton belül. Egy kültenyésztett populáció homogenitása mindkét paraméter alapján alacsony. Az egyedi genomok nagy arányban tartalmaznak heterozigóta állapotú lokuszokat, és az egyes egyedek egymástól jelentős mértékben különböznek, a genetikai identitás értéke alacsony. Beltenyésztett törzsből vett csoport a homogenitás maximumát mutatja. Az egyedi genomok homogének, és minden egyed genetikailag teljesen azonos. Két nem rokon beltenyésztett törzs keresztezésével kapott F₁ hibrid csoportban az egyedek individuális homogenitása alacsony, a heterozigóta lokuszok aránya nagy, de a genetikai identitás maximális, minden egyed genotípusa azonos.

Heterogén polilineális populációk

A természetes populációk kevés kivétellel igen nagy mértékben heterogének. Mind a genomon belüli, mind a genomok közötti homogenitás paramétere alacsony, és tovább növeli a heterogenitást a polimorfia: bizonyos gének akár 4–5 allélváltozatban is előfordulhatnak. Ez utóbbi az oka a polilineális jellegnek. A különböző fenotípusok, közöttük a neurokémiai fenotípus, nagy egyedi variabilitást mutatnak, amelynek jó része genetikai variabilitás, és reprodukálható értékeket csak egészen nagyszámú egyed felhasználásával kap-

hatunk, de sokszor még így sem, mert a genetikai variabilitás a földrajzi helyzetnek is függvénye lehet, lokális populációk jelentősen különbözhetnek egy-egy allél előfordulási gyakoriságában. Természetes populációkat ezért ritkán használnak fel genetikai kísérletekhez, ha mégis, többnyire csak az adott fenotípus variabilitási tartományának kimérésére, összehasonlítására [14, 116].

Számos olyan kísérleti feladat is van, amely éppen a nagymértékű genetikai heterogenitást kívánja kiaknázni. Az emberi populációk maguk is természetes populációknak tekinthetők, toxikológiai, farmakológiai, neurokémiai fenotípusok mérésében az emberi populációk csak genetikailag heterogén állatpopulációkkal modellezhetők [22, 116].

Ugyancsak genetikailag heterogén populációra van szükség a szelekciós kísérleteknél, amelyeket még később tárgyalunk.

Ilyen célokra alakították ki a „random tenyésztésű” és „kül-tenyésztésű” kísérleti populációkat. Ezek tenyésztési sémája olyan, hogy a populáció genetikai heterogenitását, polimorfiaját lehetőleg sok generáción keresztül megőrizze, és lehetővé tegye a reprodukálható méréseket. A random-tenyésztésű populációknál a tenyésztés során random párosítást használtak, modernebb sémákat alkalmaznak a kül-tenyésztésnél, amelyek biztosítják, hogy minden generáció létrehozásánál a legkevésbé rokon egyedek párosodjanak. A tenyésztési sémák és értékelésük, valamint az alkalmazott nomenklátúra [38] a genetikai szakirodalomban megtalálható [51, 64, 73, 145].

Ha elegendő számú tenyészpár alkotja a populációt, akkor genetikai tulajdonságait hosszú ideig megőrzi [73, 116, 145].

Ügyelni kell arra, hogy kültenyésztésű populációk használata esetén azok genetikailag kontrollált szakszerű tenyészetekből származzanak, mert néhány egyeddel alapított kis létszámú tenyészet genetikai homogenitása gyorsan növekedhet, és ez szinte lehetetlenné teszi a kísérletek reprodukálását.

A reprodukálhatóság biztosítására gyakran nem kül-tenyésztésű populációt, hanem „szintetikus” vagy „mozaik” populációkat használnak, amelyeket beltenyésztett törzsekből vagy ezek hibridjeiből állítanak össze [22, 34, 35]. Az ilyen populációk megfelelő genetikai variabilitást tartalmaznak, de mégis reprodukálhatóan előállíthatók azonos minőségben. A felhasználás szempontjait megtalálhatjuk egy, az agy neuroanatómiai fenotípusainak genetikai vizsgálatára végzett kitűnő munkában [122].

Számos olyan fenotípus van, amelynek tanulmányozására nem megfelelőek az állati modellek, vagy a humán fenotípus közvetlen tanulmányozása elengedhetetlen; ilyen esetekre is kidolgoztak értékes genetikai technikákat. Tanulmányozásra ajánlunk egy pszichiátriai-genetikai vizsgálatot [109], és a katekolaminok biokémiai genetikai vizsgálatát [142].

Homogén populációk

Quatrilinéális törzsek

I. Random homogenizálás

Ha egy természetes vagy kültenyésztésű populációból kiemelünk egy tenyészpárt, és valamilyen beltenyésztési séma szerint [51, 73] szaporítjuk, néhány tíz generáció során a kiindulási pár négy génsorozatából véletlensze-

rően kiszelektálódik és fixálódik egy adott kombináció, és így egy genetikailag nagymértékben homogén törzshöz jutunk. Általában húsz generációnyi beltenyésztes után — amikor az F értéke 0,986 — beszélünk beltenyésztes törzsről, legalábbis egér és patkány esetében.

A beltenyésztes törzsek a genetikus legtisztább analitikai eszközei. Egyedei korlátlan számban szaporíthatók, biztosítják az azonos genetikai konstitúciót, lehetővé teszik a kísérleti eredmények pontos reprodukcióját és a környezeti, kísérleti különbségekre visszavezethető variabilitás kimérését [36]. Használatuk során néhány tényezőt szem előtt kell tartanunk. A beltenyésztes törzsek homogenitása sohasem tökéletes, különösen nem, ha csak néhány tíz generáción keresztül folyt a beltenyésztes [5]. Ez több okra vezethető vissza. Az egyik lényeges ok a heterozigóták pozitív szelekciója. Az F érték a generációváltásból számított ideális állapotot tükröz. A valóságban az életképesség, termékenység szempontjai miatt állandó szelekció történik, és a fenti tulajdonságokban szerepet játszó gének egy része heterozigóta állapotban maradhat, tehát az F a valóságban sohasem éri el az 1-et. A másik lényeges ok a mutáció, ami állandóan új és új allélváltozatokat és ezáltal heterozigóciát is hoz létre. A heterozigócia kialakulása a mutációnak csak az egyik lehetséges hatása, sokkal fontosabb, hogy a mutáció miatt a beltenyésztes törzsek lassan megváltozhatnak, új és új allélek fixálódnak, amiktől a törzs genotípusa megváltozik. Különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatoknál ha azonos, de néhány tíz generáció óta külön tenyésztett törzseket használnak, gyakran reprodukálhatatlanok az eredmények. Nagy a kontamináció veszélye is, ezért a beltenyésztes törzs fenntartása állandó ellenőrzést kíván [37, 69, 70].

Végül néhány szót a beltenyésztes törzsekkel végzett kísérletek értékeléséről. Nem igaz az a gyakori állítás, hogy a beltenyésztes törzs tulajdonképpen a vad populáció egyetlen egyedét képviseli sok példányban. Erről szó sincs. A magas fokban homogenizált genomot hordozó állat különleges, mesterséges képződmény. Számos reakciója szélsőséges, kevéssé hasonlít a vad típusú heterozigótákhoz. Előnye, hogy korlátlan számban biztosít azonos genotípusokat, és lehetővé teszi a kísérletek megbízható reprodukcióját, valamint a környezeti és genetikai variancia kimérését. Az eredmények értékelésénél azonban a fentiekre figyelemmel kell lenni.

A leggyakoribb neurokémiai kísérlet típus a törzsek közötti különbség mérése. Ha statisztikailag értékelhető különbségeket kapunk egy adott fenotípusban két vagy néhány homogén törzs között, bizonyítva látjuk, hogy a szóban forgó fenotípusos különbség genetikai okokra vezethető vissza. Ez kétségtelenül igaz, de az értékelésnél több tényezőre is figyelemmel kell lennünk. Ha például nincs különbség az adott fenotípus esetén két törzs között, ez még nem jelenti azt, hogy a két törzs genetikailag akár csak az adott fenotípus szempontjából azonos. Ilyen fajta azonosságot csak keresztezési kísérletek alapján lehet kimondani.

Megbízható különbség esetén viszont nem feltétlenül bizonyos, hogy a bennünket érdeklő fenotípus kémiai mechanizmusának szempontjából releváns a különbséget létrehozó genetikai háttér. Két beltenyésztes törzs sok ezer génben is különbözhet, az organizmust szabályozó rendkívül komplex anyagcsere-mechanizmusba egészen távol eső pontokon beavatkozva is létre lehet hozni változásokat egy adott fenotípusban. E fajta aspecifikus különbségeknek kicsi az értéke, ha egy újabb közlemény megírásán kívül más szempontunk is van. Különösen nem jelenti egy ilyen aspecifikus génhatás, hogy „ki-

mutattuk az X vagy Y fenotípus génjét". Azok a törzsek közötti különbségek fontosak, amelyek a tanulmányozott fenotípus kémiai mechanizmusának felderítéséhez visznek közelebb. A genetikus mindig egy-egy adott gén allélváltozatainak hatását figyelheti meg, és nem tudja követni azokat a géneket, amelyekben a két törzs megegyezik, mert ezek genetikai módszerekkel nem mérhetők.

Mindezen problémák ellenére a törzsek közötti különbségek kimutatása igen elterjedt módszer a neurokémiaiban, és feltétlenül az első lépés a további genetikai vizsgálatokban. A vizsgált fenotípusok igen sokfélék: agyi enzimek [113], illetve specifikus fehérjék [82], agyi gangliozidok [127], a ciklikus AMP koncentrációja [106], a katekolamin anyagcsere [8, 10, 24, 48, 52, 81], különböző agyi receptorok [13, 28, 119, 120, 137], farmakológiai fenotípusok [2, 42, 62] stb.

Szerencsés esetben a törzsek közötti különbségek vizsgálata fontos genetikai szabályozó-mechanizmusok felderítéséhez vezethet [43], ennek többnyire az a feltétele, hogy a talált fenotipikus különbségek mögött egyszerű egy génes különbségek álljanak. Ilyen esetben van csak komoly remény a hatásmechanizmus tisztázására. A követendő kísérleti tervet CIARANELLO és munkatársainak a katekolaminok bioszintézisében szerepet játszó enzimek szabályozását felderítő munkáján mutatjuk be [8, 23–25].

Az egértörzsek közötti különbséget először a mellékvesekéregben mért feniletanolamin-N-metiltransferáz [24], majd a tirozin hidroxiláz és a dopamin- β -hidroxiláz szintjében mérték [25], a BALB/c törzsből származó két altörzsből a BALB/cJ és a BALB/cN-ben. A BALB/cJ-ben mindhárom enzim szintje kb. kétszerese a másik törzsből mért értékeknek. A törzsi különbségek megállapítása után reciprok keresztezést végeztek, az F_1 generációban a három enzim szintje nagyjából a két szülői érték között helyezkedett el, és a reciprok keresztezések nem különböztek egymástól (vagyis az anyai hatás és a nemhez kötött öröklődés kizárható volt). Az F_1 generáció egyedjeinek keresztezésével létrehozták az F_2 generációt, amely nagyobb populáción mérve az F_1 -gyel megegyező fenotípusos átlagértékeket mutatott mindhárom enzim esetében, jelentősen különbözött viszont az F_2 -ben mért értékek szórása a többi populációban mért értékek viszonylag alacsony és megegyező szórásától. Az eddigi adatok viszonylag egyszerű öröklésmentű genetikai háttérre utalnak. Különböző genetikai modelleket lehet a kapott adatokra illeszteni [25]. Az adatokkal legjobban egyező modell egy gén két allélváltozatának a három enzim lebomlását befolyásoló hatását tartalmazza. A BALB/cJ hordozza azt az allélt, amely az alacsony bomlási sebességért, így a magas enzimszintekért, a BALB/cN hordozza a fokozottabb bomlásért, így az alacsonyabb enzimszintekért felelős változatot. Az F_1 -ben a fenotípus köztes, tehát egyik gén sem domináns. A feltételezett modell alapján ellenőrző kísérleteket lehetett végezni, az F_2 generációban meg lehetett vizsgálni, hogy az egyetlen lokusz alapján feltételezett mechanizmusból következő a magas, a köztes és az alacsony fenotípus értéknek 1 : 2 : 1 aránya kimutatható-e. Ugyancsak hasonló vizsgálatot lehet elvégezni a szülők és az F_1 populáció keresztezésével kapott visszakeresztett populációkkal is, ahol a várt arány az egyes fenotípusokra 1 : 1. A három populációban talált arányok nem tértek el szignifikánsan a modell alapján várt arányoktól. Kiegészítették az analízist egy korreláció-vizsgálattal, amelyhez az F_2 populációban, valamint a szülőkből és a hibridből készített „szintetikus” F_2 populációban vizsgálták az egyes enzimek szintjének egymással való korrelációját.

Az adatok alapján igen nagy valószínűséggel állítható volt, hogy sikerült kimutatni egy — a három enzim bomlását egyformán befolyásoló — gént, amelynek két allélja a bomlást különbözőképpen befolyásolja, a fenotípusban kétszeres különbséget hozva létre.

Meg kell jegyeznünk, hogy a szép analízis sikerében valószínűleg nagy része volt annak a ténynek, hogy a két altörzs viszonylag kevésbé különbözhetett egymástól, ezért a genetikai háttér közel azonos volt, nem zavarta a vizsgált fenotípust. A két altörzs egy a katekolamin-enzimek bomlását szabályozó gén mutációjá miatt különbözik a vizsgált fenotípusokban.

2. Irányított szelekció

Noha igen sok beltenyésztett törzs áll a rendelkezésünkre, ezek genotípusa véletlenszerűen szelektálódott. Ritkán találni pontosan olyan törzseket, amelyek egy adott fenotípus szempontjából éppen különböznek. Irányított, a megfelelő fenotípus szélső értékeire történő szelekcióval ilyen törzseket könnyebben elő lehet állítani, és emellett, ha a fenotípus változását a szelekció során több generációban követjük, hasznos genetikai információhoz is juthatunk. A szelekciós munka lényege, hogy egy sokféle változatot tartalmazó génkészlettel rendelkező populációból a fenotípus generációnkénti egyedi mérésével és megfelelő párosítással olyan tenyészvonalakat szelektáljunk, amelyek az adott fenotípus szélsőértékeit mutatják, és remélhetőleg a fenotípus szélsőértékeiért felelős allélváltozatok feldúsulnak bennük. Ez természetesen csak akkor sikerülhet, ha a kiindulási populáció elegendő genetikai variabilitást tartalmaz, és ha a szelekció sémája alkalmas arra, hogy a kínált változatosságot ki is használja. A kiindulási populáció gyakran egy természetes populáció [41] vagy egy kültenyésztett, még inkább egy „szintetikus” populáció, amelyet ismert tulajdonságú beltenyésztett törzsekből hoznak létre [17, 27, 122]. Mindenesetre mindig azzal érdemes a szelekciós programot kezdeni, hogy meg kell vizsgálni, van-e megfelelő egyedi variabilitás a kiválasztott kiindulási populációban vagy a szintetikus populációhoz felhasznált törzsek között. Sokszor olyan nagy fenotípusos különbségeket lehet egy ilyen populációban találni, és a nagy különbségek jó részéért egyszerű genetikai faktorok a felelősek, hogy már a szelekció első generációi értékes adatokat szolgáltatnak, és lehetővé teszi egyszerűbb genetikai modellek illesztését [41, 107, 138]. Abban az esetben, ha az adott fenotípus genetikai háttere komplex, poligénes, csak szisztematikus, sok generáción keresztül történő szelekció során lehet megfelelő adatokat nyerni. Elvileg a szelekció célja az, hogy az adott fenotípus szélsőségeit létrehozó allélváltozatokat egy-egy szelektált törzsbe elkülönítse. De ha a szelekció során a kérdéses fenotípusban jól különböző törzseket kapunk is, ez még nem bizonyítja, hogy célunkat sikerült elérnünk. A különböző gének közötti kölcsönhatás, esetleg a gyors fixálódás, a homogenitás túlságosan gyors növekedése miatt megeshet, hogy a két szelektált vonal fenotípusos különbségei egyéb okokra vezethető vissza. Ha legalább két-két vonalat szelektálunk, a beltenyésztés mértékét alacsonyan tartjuk, és a szelekciós plato elérése után a vonalakat keresztezzük, valamint ha egy bizonyos számú generáció után megfordítjuk a szelekció irányát, ezek a hibák könnyen kiderülnek. RODERICK és munkatársai az egér agysúlyának szélsőséges értékeire végzett szelekciót, munkájukban a szelekciós technika kitűnő értékelése is megtalál-

ható [122]. Farmakológiai szempontok szerint végzett szelekciós munkákat újabban BROADHURST foglalta össze [17].

3. Korrelációs szelekció

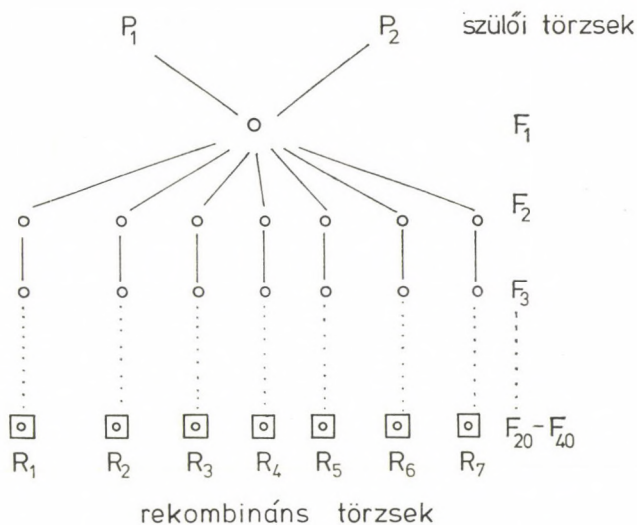
Gyakori eljárás az, hogy valamilyen meghatározott fenotípusra történt szelekcióval kapott törzseket fenntartják, és keresik azokat az egyéb, a szelekció során nem vizsgált fenotípusokat, amelyeknek változásai esetleg az eredetileg szelektált fenotípussal együtt járnak. Így például vizsgálták a szelekcióval nyert hipertenzióra hajlamos és rezisztens törzsek noradrenalin koncentrációját és tirozinhidroxiláz aktivitását [39], emocionális viselkedésre szelektált Roman High Avoidance és Roman Low Avoidance patkánytörzsek agyi receptorainak variabilitását [108], és különböző farmakonok hatását e törzsek explo-tatorikus aktivitására [83]. Vigyázni kell arra, hogy ha ilyen összehasonlításoknál törzsek közötti különbséget észlelünk, ez még egyáltalán nem jelenti azt, hogy korreláció van az adott fenotípus és az eredetileg szelektált fenotípus között. Nincs kizárva ilyen korreláció, de szorosabb összefüggést bizonyítani csak megfelelő keresztezési kísérletek eredményeinek értékelése során lehet.

Bilineális törzsek

A quadrilineális eredetű beltenyésztett törzsek összehasonlításából kapott adatok ritkán vezetnek jól használható genetikai analízishez, elsősorban a törzsek közötti nagy genetikai variabilitás miatt. A bilineális törzsek konstruálása csökkenti a kiindulási variabilitást, és ezért egy elvileg új típusú genetikai analízist tesz lehetővé, amely ma a gerinces állatok genetikájában a legkorszerűbb módszernek tekinthető; felhasználási területe is igen széles körű.

1. Rekombináns törzsek

Rekombináns törzseket először BAILEY állított elő [4] immunológiai fenotípusok tanulmányozására. Kiválasztott két egymástól sok fenotípusban jelentősen különböző, gyakorlatilag homogén beltenyésztett egértörzset, a BALB/cBy-t és a C57B2/cBy-t; ezek adták a kiindulási két génsorozatot. Elkészítette az F_1 generációt, majd az F_2 -t. Ez utóbbiból szisztematikus testvérpárosítással 40 generáción keresztül beltenyésztést végzett, és ismét homogén törzseket állított elő. Ezek a törzsek, szám szerint 7, az F_1 generációt létrehozó két szülői törzs génkészletének véletlen kombinációit hordozzák. Lényegében egy F_2 generációnak tekinthető azzal a különbséggel, hogy minden egyed egy-egy törzs képvisel, és nincsenek közöttük heterozigóták. Az 1. ábrán bemutatjuk a rekombináns törzsek készítésének általános sémáját. Azáltal, hogy egyedek helyébe törzsek kerülnek, nagymértékben megnövekszik a genetikai analízis felbontóképessége: olyan fenotípusok is vizsgálhatók, amelyek csak populációk átlagával és statisztikai módszerekkel értékelhetők. Különösen fontos szempont ez a magatartási fenotípusok és a neurokémiai fenotípusok vizsgálatában. A BAILEY által előállított törzsállományt nem csak



1. ábra. Rekombináns törzsek készítésének sémája

Fig. 1. Scheme of genesis of recombinant strains

immunológiai fenotípusok vizsgálatára használták, hanem számos egyéb (többek között neurokémiai) fenotípus esetében is [6, 68, 101]. Ha a rekombináns törzspopuláció már készen van, a vizsgálat menete aránylag egyszerű. Az adott fenotípus értékeit kimérik a szülői törzseken, az F₁ generáción és a rekombináns törzseken (BAILEY a rekombináns törzsekkel együtt nagyobb számú kongenikus törzset is előállított a két szülői törzsből, és ezeket is felhasználták a vizsgálatokban, de ezekkel majd külön foglalkozunk.) Ha a mérési eredmények statisztikailag megbízható különbséget mutatnak, az egyes fenotípus kategóriák előfordulási arányának elemzésével juthatunk genetikai paraméterekhez. A gondolatmenet a következő: tételezzük fel, hogy a kiindulási szülői törzsek az adott fenotípusra vonatkozóan csupán egyetlen génben különböznek, mindegyik szülői törzs egy-egy allélváltozatot hordoz homogén állapotban. A szülői populációk fenotípusában mutatkozó különbség tehát az allélok hatásának különbségére vezethető vissza. Ebben az esetben, miután a két allélváltozatot az F₁ hibridben összehoztuk, majd az F₂-ből kiinduló sok generációs beltenyésztés során ismét szétválasztottuk, a kapott rekombináns törzsek vagy az egyik, vagy a másik allélváltozatot fogják hordozni, homogén állapotban. Ennek megfelelően az egyes alléleknek megfelelő fenotípus nagyjából egyforma valószínűséggel található meg a rekombináns törzsek között. Ha ez a helyzet, és az egygénés modell a visszakeresztezett populációkkal, esetleg a szülőkből készített F₁ és F₂ generációkon végzett mérésekkel is megerősíthető, a bizonyítást igen megbízhatónak tekinthetjük (2. ábra). Vizsgálták a hipotalamusz noradrenalin szintjét mint fenotípust: az egyik szülői törzsből, a BALB/cBy-ban és a rekombináns törzsek közül hatban statisztikailag megkülönböztethetetlen magas értékeket mértek, több mint kétszeresét a másik szülő, a C57B2/6By és a hetedik rekombináns törzs megfelelő értékeinek. A két szülő reciprok keresztezésével kapott F₁ populációk egyformán köztes értékeket adtak, valószínű

II. táblázat

A génszám becslése egy 15 rekombináns törzset tartalmazó csoportból az észlelt fenotípusok száma alapján

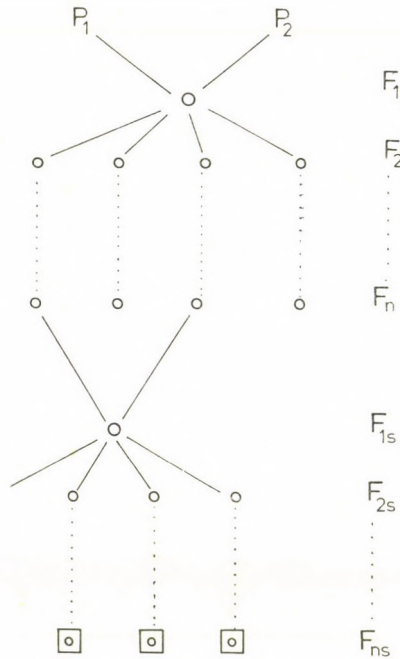
Table 2. Estimation of the number of genes from the number of phenotypes in a battery of 15 RI Strains

Gének száma	Fenotípusok száma	Legalább $(2^n - 1 + 1)$ fenotípus előfordulásának valószínűsége
1	2	$1 - 2 (1/2)^{15} \approx 1,000$
2	4	$1 - 6 (1/2)^{15} \approx 0,999$
3	8	$1 - 56 (1/2)^{15} \approx 0,998$
.	.	.
.	.	.
.	.	.
.	.	.
n	2^n	$1 - \left(\frac{2^n}{2^{n-1}} \right) (1/2)^{15}$

magatartásra. Vizsgálták a tanulás [102], az agresszió [33] fenotípusában mutatkozó különbségek genetikai hátterét. A módszer bizonyos esetekben lehetővé teszi az adott gének kromoszomális lokalizációját is. Ha egy adott lokusz kromoszomális pozíciója ismert, akkor a lokusz által befolyásolt fenotípus törzsek közötti megoszlása (SDP) egyeztethető a vizsgált fenotípusával. Meg- egyezés esetén a két fenotípus azonos vagy egymás közelében elhelyezkedő gének hatása alatt van [31]. BAILEY első rekombináns törzspopulációját azóta több másik követte [101, 134–136], és szélesedett a vizsgálatba vont fenotípusok köre [101].

Néhány szót a módszer limitációiról. Összehasonlítva a rekombinánsokkal végzett munka mennyiségét az egyszerű mendeli analízissel, nyilvánvalóvá válik, hogy a rekombinánsokkal sokkal több munka van, még akkor is, ha már ismert törzskészlettel dolgozunk. Ezért viszont bőven kárpótol az analízis nagyobb felbontóképessége. Egyszerű mendeli analízissel ritkán sikerül egy génes mechanizmusoknál bonyolultabbakat felderíteni, különösen olyan nagy hibával mérhető fenotípusok esetében, mint a neurokémiai fenotípus. A rekombinánsokkal két, sőt három génes különbségek is mérhetők. Valószínű, hogy a módszer jelentősen tovább fejleszthető, ha a kialakított rekombináns törzsekből újabb keresztezéssel és újabb beltenyészéssel szubrekombináns csoportot hozunk létre (3. ábra), amelynek segítségével elvileg sok génes rendszerek is felbonthatók, ha a fenotípus mérése elegendő pontosságú.

Nehezíti a mérések értékelését ugyanúgy, mint az egyszerű mendeli keresztezések esetében — a genetikai háttér. A szülői törzsek nemcsak a vizsgált fenotípust befolyásoló génekben különböznek, hanem még sok száz vagy ezer más génben is, ezek is rekombinálnak, és véletlen kombinációik jelentősen zavarhatják egy-egy törzsben a vizsgált lokusz hatását, esetleg teljesen elfedhetik azt. Ilyen hatások esetén, ha a vizsgált fenotípus érdekessége megérdemli ezt, a szubrekombináns törzsek kialakítása az egyetlen kivezető út; ez a genetikai hátteret is jelentősen homogenizálja.



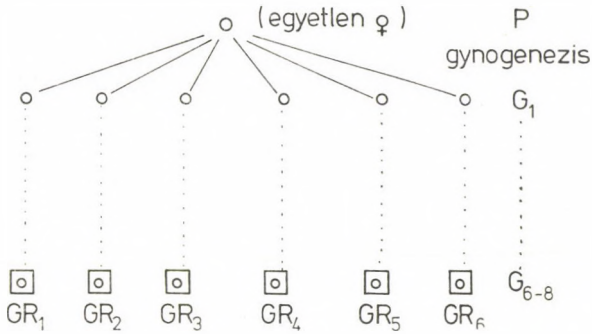
3. ábra. Szubrekombináns törzs készítésének sémája
 Fig. 3. Scheme of genesis of subrecombinant strains

2. Gynogenetikus törzsek

A rekombináns törzsekkel való munkát igen megnehezíti az előállításához szükséges sok munka és hosszú idő. Alacsonyabb rendű gerinceseken kidolgoztak olyan módszereket, amelyekkel a homogén bilineális törzsek előállítása alaposan megrövidíthető. A módszer a partenogenezis egyik fajtája, az inaktívált spermium sejtekkel történő *gynogenezis*. Gynogenezis segítségével néhány generáció alatt genetikailag nagymértékben homogén törzsek állíthatók elő. A módszert alkalmazták halakon [46, 90, 94, 114, 131], békán [92, 139] és gőtén [60]. A mesterséges gynogenezis során nagyrészt haploid embriók keletkeznek, amelyek a kikelés után rendszerint elpusztulnak. Különböző technikák segítségével megoldható, hogy gynogenetikus diploidok keletkezzenek. Ez vagy az első mitotikus osztódás gátlásával érhető el [131], és az így létrejött diploid embrióból létrejött egyed egyben száz százalékgig homozigóta, vagy olyan módon, hogy megakadályozzák a második poláris test kizáródását a megtermékenyítés után [46, 60, 92]. Ez utóbbi esetben a gynogenetikus diploid egyed nem lesz tökéletesen homozigóta, mert a meiotikus rekombináció miatt a poláris test és az anyai pronukleusz kromoszómái részben különböző alléleket hordozhatnak.

A rekombináció ellenére a homozigócia mértéke jelentősen megnő, egy generációnyi gynogenezis megfelel nyolc-tíz testvér párosításnak [94]. Még gyorsabban nő a gynogenetikus populációk izogénitása, amely már 3–4 gyno-

genetikus generáció után megközelíti a beltenyésztett törzsek hasonló paraméterét [95]. A szexuális generáció és a gynogenezis megfelelő együttes alkalmazásával igen gyors genetikai homogenizációt lehet elérni [96]. Gynogenezis segítségével egyetlen nőstény állatból, két génsorozat hordozójából néhány generáció alatt kívánság szerinti számban a két szülői génsorozat rekombinációit hordozó gynogenetikus rekombinánsok állíthatók elő [47] (4. ábra). A



4. ábra. Gynogenetikus rekombináns törzsek készítésének sémája
Fig. 4. Scheme of genesis of gynogenetic recombinant strains

gynogenetikus rekombináns törzsek készítésének előnye, hogy nem szükséges előállításukhoz két teljesen homogén beltenyésztett törzs, mert egyetlen szülőből lehet a törzspopulációt leszármaztatni, így bármilyen eredetű egyed — akár egy vad típus is — kiinduló egyede lehet a törzspopulációnak. A genetikai modellek lényegében ugyanolyanok, mint azt a rekombináns törzseknél bemutattuk, ha a gynogenetikus rekombinánsokat egyetlen állatból indítottuk el, természetesen hiányozni fognak a szülői populációk és az F₁, de az innen nyerhető adatokért kárpótol a könnyen előállítható rekombináns törzsek nagyobb száma.

A gynogenetikus technika ugyancsak megkönnyíti a szubrekombináns populációk előállítását. Noha még neurokémiai fenotípus vizsgálatáról nincs tudásunk, bizonyos, hogy az elegáns új módszer alkalmas ilyen vizsgálatokra is. Nagyon valószínű az is, hogy a gynogenezist rövidesen megkísérlik felhasználni az emlősök, elsősorban az egér esetében homogén törzsek előállítására. Sejtsebészeti beavatkozásokkal már állítottak elő néhány egyedet [43], de gyakorlati célokra is alkalmas módszert valószínűleg csak inaktivált spermiumok felhasználásával lehet kidolgozni, mint a halak esetében.

Partenogenezist nem csak gerinceseken lehet sikerrel alkalmazni. Izogén egyedek előállítására sikeresen felhasználták a tücsöknél. Az előállított izogén tücsök-klonokban meghatározott neuronok és kapcsolataik egyedfejlődését tanulmányozták [49]. A természetes körülmények között gynogenezissel szaporodó fajokról, amelyek genetikailag nem homogének, a megfelelő későbbi fejezetben lesz szó.

Unilineális törzsek

Természetes körülmények a gének polimorfiaját erősen korlátozza a szelekció: olyan mutánsok, amelyek fejlődésében az életképességet, termékenysé-

get csökkentő zavarok jelentkeznek, természetes körülmények között nem maradnak fenn. Mesterséges, laboratóriumi körülmények között viszont ezeknek a mutánsoknak egy része szaporítható, és jelentős segítséget nyújthatnak a legkülönbözőbb fenotípusok fiziológiai mechanizmusának felderítésében. Egyedül egérben több mint ötszáz, egyetlen gén megváltozására visszavezethető mutánst írtak le [125, 144], ezek közül több mint százötven neurológiai mutáns [130]. A mutánsokat általában beltenyésztett törzsekből származtatják, vagy ha nem beltenyésztett törzsből fordult elő először az adott mutáció, igyekeznek azt egy jól ismert beltenyésztett törzshez bevinni (sokszor visszakeresztezéssel), ezért ezeket unilineális eredetűnek tekintjük. Általában kétféle mutáns törzset használnak, az egyik típus kizárólag a mutációt szenvedett lokuszban különbözik a háttértörzstől, ezek a koizogén törzsek, gyakori az is, hogy a mutációt hordozó genotípust önálló entitánsként mint altörzset tartják fenn [104]. A kétféle típus nem teljesen azonos, mindkettő általában nagymértékben homogén (előfordulhat szemiletalitális, vagyis sterilitást okozó mutációknál az a jelenség, hogy a mutáns génre nézve csak heterozigóta állapotban szaporíthatók, de ez a heterozigócia csak a mutáns lokuszt érinti), de csak a koizogén törzsek azonosak a háttértörzsszel, leszámítva magát a mutáns lokuszt. A különböző altörzsek általában több lokuszban eltérhetnek egymástól, részben felderítetlen mutációk, részben a kiindulási törzsek esetleges heterozigóta génállapotai miatt [56]. Emlős mutánsok detektálásának módszerei állandóan fejlődnek, intenzív kutatás tárgyai. A rendkívül nagy érdeklődés és évtizedes intenzív munka ellenére sem mondható, hogy az emlős mutánsok felhasználása problémamentes.

Egy mutáns akkor kerül be a laboratóriumi készletbe, ha egy rendszerint ismeretlen gén mutációja olyan súlyos zavart okoz az állat szervezetében, amely könnyen felismerhető. A kutatás első lépése az öröklődésment tisztázása után a mutáció által okozott eltérés általános leírása. „Sajnos” a legtöbb génnek számtalan pleiotróp hatása is van, egy apró hiba a gén vagy a fehérjék szintjén igen súlyos idegrendszeri vagy szerkezeti elváltozásokhoz vezethet egyfajta kaszkád hatás révén, és ezért sokszor szinte lehetetlen megállapítani a szerveződés felső szintjein észlelt zavarok végső okát [145].

Érdekes adatokat nyújthat egy-egy fenotípusnál a génhelyettesítési módszer, amelynél egy meghatározott homogén beltenyésztett törzsből, megfelelő keresztezésekkel különböző lokuszok mutáns alléljeit tartalmazó törzssorozatot készítenek, és az azonos genetikai háttérbe helyezett mutációk hatását vizsgálják az adott fenotípusra. Magatartási fenotípusnál alkalmazta ezt a módszert OLIVERIO és MESMERI [103]. Néha szerencsés esetben egyetlen mutáns tanulmányozása is értékes adatokkal szolgál az adott mutáns fenotípus különlegessége miatt [20]. Ha a vizsgálandó fenotípus esetében több független mutáns áll rendelkezésünkre, akkor az egyes mutáns fenotípusok szisztematikus összevetése kialakíthatja az adott fenotípus teljes fejlődési képét, feltárhatja a leglényegesebb szabályozási pontokat. Ilyen vizsgálatokat végeztek a mielinizációt befolyásoló mutációk [9], valamint az agy sejtarchitektúrájának kialakítását befolyásoló mutánsok esetében [21]. Ugyancsak ide sorolható, bár valószínűleg nem egyetlen gén megváltozására vezethető vissza azon mutációk köre, amelyek a humán epilepsiákhoz hasonló tüneteket hoznak létre a legkülönbözőbb fajokban — így egérben [97, 126], patkányban [26], szíriai aranyhörcsögben [146], tyúkban [61], kutyában [29] —, és rendkívül értékes modellként szolgálnak.

A mutánsok felhasználásának sokkal eredményesebb területei az olyan fajokkal végzett vizsgálatok, amelyekben a mutánsok izolálásának és identifikálásának módszerei előrehaladottabbak, mint a gerinceseknél. Így a *Drosophyla* mutánsok segítségével egészen speciális neurobiológiai problémák közelíthetők meg, mint pl. a szinaptikus transzmisszió [59]; a fotoreceptor funkció [14], szexuális magatartás [33], neurotranszmitter mechanizmusok [66]. A Nematodák genetikája is jelentősen előre jutott már [16, 74], és megkezdődött speciális neurokémiai problémák megoldása, így pl. a kemoszenzoros érzékelés [75], illetve az acetilkolin receptorok [76] vizsgálatának területén. Ide tartozik még egy óriás egysejtűn, a Parameciumon végzett munka [71] is, amely kitűnő modellje a magasabb rendű neuronnak, és adatokat szolgáltat a különböző ioncsatornák és a membránpotenciál-változások összefüggéseinek felderítéséhez.

Szabályozott heterogenitás

Heterozigóta izogén populációk

A fentebb ismertetett vizsgálatokban homogén törzseket használtak, a kísérlettervezés a genetikai homogenitás előnyeit használta ki. Nagymértékben heterozigóta genotípusokkal is lehet azonban hasznos kísérleteket végezni, ha biztosított a felhasznált egyedek izogenitása, vagyis a csoporton belül semmiféle genetikai variancia nincs. Neurokémiai célok érdekében még alig használták az ilyen típusú populációkat, ezért az áttekintés csak a leglényegesebb tudnivalókra szorítkozik.

1. F_1 heterozigóták

A legegyszerűbben úgy juthatunk izogén heterozigótákhoz, ha homogén beltenyésztett törzseket keresztezünk. Általában több törzs keresztezését végzik el az összes lehetséges kombinációban, és a módszert *diallél keresztezésnek* nevezik. A kombinációk statisztikai értékeléséből bizonyos következtetéseket lehet levonni a felhasznált törzsek genotípusának a vizsgált fenotípusra gyakorolt kvantitatív hatását illetően. Megkülönböztetnek általános és speciális kapcsolódókészséget. Az általános kapcsolódási készség az additív genetikai varianciában játszik döntő szerepet, a speciális kapcsolódási készség, amely az egyes párok kölcsönhatásából számítható, az interaktív variancia kialakítója.

A diallél módszerrel kapható paraméterek a kvantitatív genetika körébe tartoznak, és aránylag kevés hasznosítható belőlük a neurokémiaiában [91]. Tanulmányozásra ajánlunk egy magatartás-kísérletet [85]. Nagyobb szelekciós kísérlet vagy több törzsre tervezett összehasonlító vizsgálatok előtt azonban hasznos adatokat szolgáltat az egyes törzsek várható reagálásait illetően, még akkor is, ha a fiziológiai mechanizmusokba semmiféle bepillantást nem tesz lehetővé.

2. Természetes izogén populációk

Nem csak genetikai manipulációkkal lehet izogén populációkat előállítani; több faj esetében természetes körülmények között is élnek ilyenek. Néhány faj, közöttük a Crustaceákhoz tartozó *Daphnia* szaporodási ciklusának egy részében partenogenetikus módon szaporodik. Így az egyetlen anyától nyert ivadékok izogének, és számos neurobiológiai probléma megoldására alkalmasak. LEVINTHAL és munkatársai izogén *Daphniák* segítségével vizsgálták a neurális konnektiókban fellelhető variabilitás természetét [73, 80]. Gerincesek között is vannak partenogenetikus fajok, így a *Poecilia formosa*, két normálisan szaporodó rokon faj, a *P. latipinna* és a *P. sphenops* természetes hibridje [1, 65], amely csak nőstényeket tartalmazó önálló fajként, természetes gynogenezissel szaporodik. Az egy anyától származó utódok izogének, közöttük genetikai variancia nincs, noha a genomon belüli heterogenitás magas fokú. A *P. formosa*-t ugyancsak az idegrendszer egyedfejlődési problémái vizsgálatában használták fel. Igen alkalmas ilyen típusú munkára még a közönséges aranyhal vad típusának egy triploid formája, a *Carassius auratus gibelio*, amely szintén gynogenezissel szaporodik, és az egyetlen anyától származó utódpopuláció izogén. Laboratóriumi munkára kiválóan alkalmas, aránylag kistermetű és könnyen tartható, kitűnően kiegészíthetné az aranyhalon végzett neurobiológiai munkákat. A triploid aranyhal fenotípusainak az izogenitásból következő kicsiny variabilitását magatartás-vizsgálatokban demonstrálták [63].

3. Gerinces állatok klónjai

Több fajban dolgoztak ki módszereket az egyedek klónozására, így pl. békán [50], egéren [58]; a módszer lényege, hogy szomatikus sejtekből vagy embriókból sejtmagokat ültetnek át megtermékenyített, majd enukleált petesejtekbe, amelyeket a fajtól függő módon fejlődésnek indítottak. Az egyetlen embrióból kifejlődő egyedek genetikailag tökéletesen azonosak, izogének. Alkalmasak mindenfajta probléma megoldására, amelynél az izogenitás fontos szempont, így elsősorban a neurális struktúrák kifejlődésének genetikai szabályozására irányuló kutatásokban. A klónozás előnye az F_1 hibridekkel vagy a természetes izogén populációkkal szemben, hogy segítségével bármilyen meghatározott egyed genetikai replikája előállítható, tanulmányozhatók tehát a különleges fenotípusok is, amelyek esetleg csak nagy ritkán kerülnek vizsgálatra, és nem stabilizálhatók konvencionális módszerekkel. Ehhez természetesen még az lenne szükséges, hogy a klónok előállításának módszerei tömegtermelésre is alkalmasak legyenek.

Kimérák

Egészen különleges szervezetek az állati kimérák, amelyek különböző genotípushoz tartozó sejtekből felépülő mozaik organizmusok. Felhasználásuk igen érdekes eredményeket hozhatna a neurokémiaiban is, mint ahogy igen hasznosnak bizonyult a neurobiológia más területein. Az első módszert kimérák előállítására TARKOWSKI dolgozta ki [133]. Néhány sejtből álló egérembriókat fuzionáltatott, és a fúzió után megfelelően előkészített nősténybe transzplantált, ahol a normális embrionális fejlődés végbement. MINTZ használt

először genetikailag különböző blasztulákat a kimérák előállítására [86]. Az úttörők munkája óta igen sok eredmény született, és megbízható módszereket dolgoztak ki. Részletesebb tájékozódásra MCLAREN könyvét ajánljuk az emlős-kimérákról [84]. Előállítottak hat- és nyolcszülős kimérákat is [112]. Sokféle-képpen lehet felhasználni a kimérákat neurobiológiai problémák tanulmányozására. Egy egérmutáns fenotípusára a kisagy PURKINJE-sejtjeinek szinte teljes hiánya jellemző. A genetikai tényező a *pcd* autoszomális lokusz mutációja. MULLEN azt a kérdést vizsgálta, hogy a mutánsra jellemző fenotípus vajon magukban a PURKINJE-sejtekben bekövetkező génakcióra vezethető vissza, vagy a genetikai károsodás más sejtekben manifesztálódik, és a PURKINJE-sejtek degenerációja csak ennek következménye. Normális és a mutáns sejtekből készített kiméra vizsgálatával eldönthető volt, hogy a mutáns gén a PURKINJE-sejteken belül fejt ki hatását [89]. Hasonló vizsgálatot végeztek egy retina-degenerációban szenvedő mutáns és normális változatú egér kiméraiával [141]. Részletesen analizálták az egér kisagy egyfejlődésének folyamatát az egér cerebelláris mutánsainak segítségével készített kimérák tanulmányozásával [90]. Ez utóbbi munka jelzi, hogy az egyébként sokkal nehezebben hasznosítható mutánsok milyen értékes adatokat szolgáltathatnak a kimératechnikával kiegészítve. Újabbán rendkívül gyorsan fejlesztik ki a kimératechnika legkülönbözőbb változatait, így előállítanak különböző fajokból [57] és fajok között készített sejthibridekből származó kimérákat [151], malignus sejtek felhasználásával készített kimérákat [87], madárkimérákat [118]. És felfedezik, hogy bizonyos régi technikák, mint pl. a vérátömlesztés is a kimérakészítés egy szerényebb válfajának tekinthető [155].

Konklúzió

A genetika rendkívül gyorsan fejlődik napjainkban, és gyorsan fejlődnek a hagyományosnak mondott genetikai eszközök is. A biológia egy-egy speciális területén dolgozó kutatók eszközök egész arzenáljából választhatja ki azt a technikát, amely speciális céljainak a legjobban megfelel. Az itt bemutatott módszerek főként a hagyományos gerincesgenetika módszerei, csak néhány esetben érintettünk olyan módszereket, amelyeket nem gerinces állatok esetében használnak. Sok olyan módszer is erősen fejlődőben van, amely átlépi az organizmus határait, kitűnő genetikai munkát lehet végezni szomatikus sejtenyészetek, sejthibridek segítségével is, amire ez az összefoglaló nem tért ki.

IRODALOM

1. ABRAMOFF, P., DARNELL, R. M. and BALSANO, J. S. (1968) Electrophoretic demonstration of the hybrid origin of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Amer. Naturalist.*, **102**, 555–567.
2. ALLEGRA, S. P., MACK, G., OLIVERIO, A. and MANDEL, P. (1980) Effects of apomorphine and sodium di-n-pro-pylacetate on the aggressive behavior of three strains of mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, **3**, 491–502.
3. ALTMAN, P. L. and KATZ, D. D. (eds.) (1979) *Inbreed and genetically defined strains of laboratory animals*. Biological Handbooks. Vol. I–III, Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Bethesda, Maryland
4. BAILEY, D. W. (1971) Recombinant inbreed strains. *Transplantation*, **11**, 325–327.

5. BAILEY, D. W. (1978) Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice. In: MORSE III, H. C. (ed.): *Origins of inbred mice*. Academic Press, New York, 197—215.
6. BAILEY, D. W. (1980) Recombinant inbred strains and bilineal congenic strains. In: FOSTER, H. L. and SMALL, J. D. (eds.): *The mouse in biomedical research*. Vol. I. Academic Press, New York
7. BARAN, A., SHUSTER, L., ELEFThERIOU, B. E. and BAILEY, D. W. (1975) Opiate receptors in mice: genetic differences. *Life Sciences*, **17**, 633—640.
8. BARCHAS, I. D., CIARANELLO, R. D., DOMINIC, J. A., DEGUCHI, T., ORENBERG, E., RENSON, J. and KESSLER, S. (1974) Genetic aspects of monoamine mechanism. In: USDIN, E. (ed.): *Neuropsychopharmacology of monoamines and their regulatory enzymes*. Raven Press, New York
9. BAUMAN, N. (1980) Mutations affecting myelination in the central nervous system: research tools in neurobiology. *TINS*, **3**, 82—85.
10. BERGER, B., HERVE, D., DOLPHIN, A., BARTHELMEY, C., GAY, M. and TASSIN, J. P. (1979) Genetically determined differences in noradrenergic input to the brain cortex: a histochemical and biochemical study in two inbred strains of mice. *Neuroscience*, **4**, 877—888.
11. BLACK, I. B. (1976) Abnormal catecholamine enzymes in weaver mutant mice. *Brain Res.*, **105**, 602—605.
12. BODMER, W. F. and CAVALLI-SFORZA, L. L. (1976) *Genetics, evolution and man*. Freeman, San Francisco
13. BOEHME, R. E. and CIARANELLO, R. D. (1981) Dopamine receptors binding in inbred mice: strain differences in mesolimbic and nigrostriatal dopamine binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 3255—3259.
14. BOVET, D. (1977) Strain differences and learning in the mouse. In: OLIVERIO, A. (ed.): *Genetics, environment and intelligence*. Elsevier—North-Holland Biomedical Press, 79—91.
15. BRAKEFIELD, X. O. (ed.) (1979) *Neurogenetics: genetic approaches to the nervous system*. Elsevier, New York
16. BRENNER, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71—94.
17. BROADHURST, P. L. (1978) *Drugs and the inheritance of behaviour*. A survey of comparative psychopharmacogenetics. Plenum Press, New York.
18. CASTELLANO, C., ELEFThERIOU, B. E., BAILEY, D. W. and OLIVERIO, A. (1974) Chlorpromazine and avoidance: A genetic analysis. *Psychopharmacologia*, **34**, 309—316.
19. CAVALLI-SFORZA, L. L. and BODMER, W. F. (1971) *The genetics of Ruman populations*. Freeman, San Francisco, 7—22.
20. CAVINESS, U. S. (1980) The developmental consequences of abnormal cell position in the reeler mouse. *Trends in Neuroscience*, **3**, 31—36.
21. CAVINESS, U. S. and RAKIC, P. (1978) Mechanisms of cortical development: A view from mutations in mice. *Ann. Rev. Neurosci.*, **1**, 297—326.
22. CHOLNOKY, E., FISCHER, J. and JÓZSA, S. (1969) Aspects of genetically defined populations in toxicity testing. *Z. Versuchstierk.*, **11**, 298—311.
23. CIARANELLO, R. D. (1977) Genetic regulation of the catecholamine synthesizing enzymes. In: FIELDS, W. S. (ed.): *Neurotransmitter function*. Symposia Specialists, Miami, 281—303.
24. CIARANELLO, R. D. and AXELROD, I. (1973) Genetically controlled alterations in the rate of degradation of phenylethanolamine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 5616—5623.
25. CIARANELLO, R. D., HOFFMAN, H. J., SHIRE, J. K. M. and AXELROD, J. (1974) Genetic regulation of catecholamine biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4528—4536.
26. CONSROE, P., PICCHIONI, A. and CHIN, L. (1979) Audiogen seizure susceptible rats. *Fed. Proc.*, **38**, 2411—2416.
27. DOOLITTLE D. P. and EILSON, S. P. (1981) Crossing selected lines vs. selecting from a cross mice. *J. Heredity*, **72**, 142—144.
28. EAST, J. and DUTTON, G. R. (1980) Muscarinic binding sites in developing normal and mutant mouse cerebellum. *J. Neurochem.*, **34**, 657—661.
29. EDMONDS, H. L. JR., HEGREBERG, G. A., VAN GELDER, N. M., SYLVESTER, D. M., CLEMMONS, R. M. and CHATBURN, C. G. (1979) Spontaneous convulsions in beagle dogs. *Fed. Proc.*, **38**, 2424—2428.
30. ELEFThERIOU, B. E. (1974) Genetic analysis of hypothalamic retention of ³H corticosterone in two inbred strains of mice. *Brain Res.*, **69**, 77—82.
31. ELEFThERIOU, B. E. (1974) A gene influencing norepinephrine levels in mice. *Brain. Res.*, **70**, 538—540.

32. ELEFThERIOU, B. E. and BAILEY, D., W. (1972) Genetic analysis of plasma corticosterone levels in two inbred strain of mice. *J. Endocr.* **55**, 415—420.
33. ELEFThERIOU, B. E., BAILEY, D. W. and DENENBERG, V. H. (1974) Genetic analysis of fighting behavior in mice. *Physiology and Behavior*, **13**, 773—777.
34. FESTING, M. F. W. (1974) Controlling genetic identity in the mice. *Lab. Anim.*, **8**, 265—270.
35. FESTING, M. F. W. (1975) A panel of inbred strains for substitute the random bred. *Fd. Cosmet. Toxicology*, **13**, 369—375.
36. FESTING, M. F. W. (1976) Phenotypic variability of inbred and outbred mice. *Nature*, **263**, 230—232.
37. FESTING, M. F. W. (1981) Wrong rodents. *Nature*, **296**, 626.
38. FESTING, M. F. W., KONDO, M., LOOSLI, R., POILEY, S. M. and SPIGEL, A. (1972) International standardized nomenclature for outbred stocks of laboratory animals. *ICLA Bull.*, **30**, 4—97.
39. FEUERSTEIN, G., ZAMIR, N., BEN-ISNAY, D., and GUTMAN, Y. (1979) Inverse relationship of medulla oblongata noradrenaline concentration and tyrosine hydroxylase activity in hypertension-prone and resistant rats. *J. Neurochem.*, **33**, 393—395.
40. FISCHER, R. A. (1949) *The theory of inbreeding*. Oliver & Boys, London and Edinburgh
41. FLOW, B. L., CARTWRIGHT, T. C., KUEHL, T. J., MOTT, G. E., KRAEMER, D. C., KRUSKI, A. W., WILLIAMS, J. D. and MCGILL, H. C. (1981) Genetic effects on serum cholesterol concentrations in baboons. *J. Heredity*, **72**, 97—103.
42. FRIGENI, V., BRUNO, F., CARENZI, A. and RACAGNI, G. (1981) Difference in the development of tolerance to morphine in C57/BL6J and DBA/2J mice. *Life Sciences*, **28**, 729—736.
43. FULLER, J. L. (1974) Single-locus control of saccharin preference in mice. *J. Heredity*, **65**, 33—36.
44. FULLER, J. L. (1979) Genetic analysis of deviant behavior. In: KEEHN, J. D. (ed.): *Psychopathology in animals*. Acad. Press, 61—79.
45. FULLER, I. L. and THOMPSON, W. R. (1978) *Foundations of behavior genetics*. The C. V. Mosby Company, Saint Louis
46. GERVAL, J. MONOSTORY, Zs., and CsÁNYI, V. (1982) Isogenic paradise fish (*Macropodus opercularis*) by serial gynogenesis. *J. Fish Biology*, (submitted)
47. GERVAL, J. and CsÁNYI, V. (1982) Recombinant strains of paradise fish (*M. opercularis*) by serial gynogenesis. (In preparation)
48. GOLDSTEIN, D. J., WEINSHEILBOUN, R. M., DUNETTE, J. H., and CREVELING, C. R. (1980) Developmental patterns of catechol-O-methyltransferase in genetically different rat strains. *J. Neurochem.*, **34**, 153—163.
49. GOODMAN, C. S. (1979) Isogenic grasshoppers: genetic variability and development of identified neurons. In: BREAKEFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: genetic approach to behavior*. Elsevier, New York, 101—151.
50. GOURDON, J. B. (1974) *The control of gene expression in animal development*. Cambridge, Harvard University Press.
51. GREEN, E. L. and DOOLITTLE, D. P. (1963) Systems of mating used in mammalian genetics. In: BURDETTE, W. J. (ed.): *Methodology in mammalian genetics*. Holden-Day Inc., San Francisco, 3—56.
52. GRIMM, V. E., BÁRTFAI, T., PALMSKOG, G. and SEDVALL, G. (1980) Possible correlation between noradrenergic innervation in the cerebellum and jumping behavior in mice *Neuroscience*, **5**, 373—378.
53. HALL, C. J. (1981) Sex behavior mutants in *Drosophila*. *Bioscience*, **31**, 125—129.
54. HOPPE, P. C. and ILLMENSE, K. (1977) Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5657—5661.
55. HOWARD, J. G., HOLE, C. and LIEW, F. Y. (1980) Genetically determined susceptibility to infection. *Nature*, **288**, 161—162.
56. ILLMENSE, K., HOPPE, C. and CROCE, C. M. (1978) Chimeric mice derived from human mouse hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1914—1918.
57. ILLMENSE, K. and CROCE, C. M. (1979) Xenogenic gene expression in chimeric mice derived from rat mouse hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 879—883.
58. ILLMENSE, K. and HOPPE, P. C. (1981) Nuclear transplantation in *Mus musculus* developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, **23**, 9—18.
59. JAN, Y. N., JAN, L. Y. and DENNIS, M. J. (1977) Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. (London) Ser. B*, **198**, 87—108.
60. JAYLET, A. and FERRIER, V. (1978) Experimental gynogenesis in the newt species. *Chromosoma*, **69**, 65—80.

61. JOHNSON, D. D., DAVIS, H. L. and CRAWFORD, R. D. (1979) Pharmacological and biochemical studies in epileptic fowl. *Fed. Proc.*, **38**, 2417–2423.
62. JORI, A. and RUTCZYNSKI, M. (1978) A genetic analysis of the hyperthermic response to d-amphetamine in two inbred strains of mice. *Psychopharmacology*, **58**, 199–203.
63. KABAI, P. and CSÁNYI, V. (1978) Step-out latency measurements using clonal goldfish. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **29**, 299–301.
64. KING, R. C. (ed.) (1975) *Handbook of genetics*. Vol. 4. Vertebrates of genetic interest. Plenum Press, New York
65. KALLMAN, K. D. (1962) Gynogenesis in the teleost *Mollinesia formosa*. *J. Genet.*, **58**, 7–21.
66. KANKEL, D. R. and FERRUS, A. (1979) The neurobiology of *Drosophyla*. In: BREAKEFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: Genetic approaches to the nervous system*. Elsevier, New York, 27–67.
67. KLEIN, J. (1973) List of congenic lines of mice. *Transplantation*, **15**, 137–153.
68. KLEIN, T. W. (1978) Analysis of major gene effects using recombinant inbred strains and related congenic lines. *Behavior Genetics*, **8**, 261–268.
69. KROG, H. H. (1976) Identification of inbred strains of mice. *Biochem. Genet.*, **14**, 319–326.
70. KROG, H. H. and MOUTIER, R. (1978) Characterization of different substrains of the C3H strain. *J. Heredity*, **69**, 66–70.
71. KUNG, C. (1979) Neurobiology and neurogenetics of *Paramecium* behavior. In: BREAKEFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: genetic approach to the nervous system*. Elsevier, New York, 1–27.
72. LERNER, I. M. (1970) *Genetic homeostasis*. Dover Publ. Inc., New York
73. LEVINTHAL, F., MACAGUO, E. and LEVINTHAL, C. (1976) Anatomy and development of identified cells in isogenic organisms. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **40**, 321–331.
74. LEWIS, J. A. (1980) On the uses of small nematode worms. *Neuroscience*, **5**, 961–966.
75. LEWIS, J. A. and HODGIN, J. A. (1977) Specific neuroanatomical changes in chemosensory mutants of the nematode *C. elegans*. *J. Comp. Neurol.*, **172**, 489–510.
76. LEWIS, J. A., WU, C. H., LEWINE, J. H. and BERG, H. (1980) Levamisole resistant mutants of the nematode *C. elegans* appears to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neurosciences*, **5**, 967–989.
77. LEWONTIN, R. C. and HUBBY, J. L. (1966) A molecular study of genetic heterozygosity in natural populations II. *Genetics*, **54**, 595–609.
78. LEWONTIN, R. C. (1974) *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York
79. LI, C. C. (1968) *Population genetics*. The University of Chicago Press, Chicago
80. MACAGUO, E. R., LO PRESTI, V. and LEVINTHAL, C. (1973) Structure and development of neural connections in isogenic organisms: variations and similarity in the optic system of *Daphnia magna*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 57–61.
81. MAENGWYN-DAVIES, G. D., JOHNSON, N. G., THOA, N. B., WEISE, V. K. and KOPIN, I. J. (1973) Influence of isolation and fighting on adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase activities in three strains of mice. *Psychopharmacologia (Berl.)*, **28**, 339–350.
82. MALUP, T. K., PODOPLELOVA, M. L. and SVIRIDOV, S. M. (1978) Biochemical genetic analysis of the behavior of two inbred mouse strains contrasting in brain S-100 protein content in shuttle box. I. Neurospecific S-100 protein and learning. *Genetika*, **14**, 1634–1645.
83. MARTIN, J. R., OVERSTREET, D. H., DRISCOLL, P. and BÖTTIG, K. (1981) Effects of scopalamine, pilocarpine and oxotremorine on the exploratory behavior of two psychogenetically selected lines of rats in a complex maze. *Psychopharmacology*, **72**, 135–142.
84. McLAREN, A. (1976) *Mammalian chimeras*. Cambridge University Press, Cambridge
85. MESSERI, P., OLIVERIO, A. and BOVET, D. (1972) Relations between avoidance and activity. A diallel study in mice. *Behavioral Biology*, **7**, 733–742.
86. MINTZ, B. (1965) Genetic mosaicism in adult mice of quadriparental lineage. *Science*, **148**, 1232–1233.
87. MINTZ, B. and ILMENSE, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 3585–3589.
88. MOISSET, B. (1977) Factors contributing to the modulation of norepinephrine uptake by synaptosomes from mouse brain cortex. *Brain Res.*, **121**, 113–120.
89. MULLEN, R. J. (1977) Site of *ped* gene action and Purkinje cell mosaicism in cerebella of chimeric mice. *Nature*, **270**, 245–247.
90. MULLEN, R. J. and HERRUP, K. (1979) Chimeric analysis of mouse cerebellar mutants. In: BREAKEFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: Genetic approaches to the nervous system*. Elsevier, New York, 173–197.

91. MURPHY, E. A. (1979) Quantitative genetics: A critique. *Social Biology*, **26**, 126—141.
92. NACE, G. W. (1968) The amphibian facility of the University of Michigan. *Bioscience*, **18**, 767—775.
93. NAGY, A., RAJKI, K., HORVÁTH, L. and CSÁNYI, V. (1978) Investigation on carp *Cyprinus carpio*, gynogenesis. *J. Fish Biol.*, **13**, 215—224.
94. NAGY, A., RAJKI, K., BAKOS, J. and CSÁNYI, V. (1979) Genetic analysis in carp (*Cyprinus carpio*) using gynogenesis. *Heredity*, **43**, 35—46.
95. NAGY, A. and CSÁNYI, V. (1982) Changes of genetic parameters in successive gynogenetic generations and some calculations for carp¹gynogenesis. *Theor. Appl. Genet.*, **63**, 105—110.
96. NAGY, A. and CSÁNYI, V. (1982) A new breeding system using gynogenesis and sex reversal for fast inbreeding. *Theor. Appl. Genet.*, (submitted.)
97. NEEBELS, J. L. (1979) Analysis of inherited epilepsy using single locus mutatnts in mice. *Fed. Proc.*, **38**, 2405—2410.
98. O'BRIEN, S. J. (1980) The extent and character of biochemical genetic variation in the domestic cat. *J. Heredity*, **71**, 2—8.
99. O'BRIEN, S. J., GAIL, M. H. and LEVIN, D. L. (1980) Correlative genetic variation in natural populations of cats, mice, and men. *Nature*, **288**, 580—583.
100. OLIVERIO, A. (ed.) (1977) *Genetics, environment and intelligence*. North-Holland, Amsterdam
101. OLIVERIO, A. (1979) Uses of recombinant inbred lines. In: THODAY, P. (ed.): *Quantitative genetic variation*. Academic Press, New York, 197—218.
102. OLIVERIO, A., CASTELLANO, C. and MESSERI, P. (1972) Genetic analysis of avoidance, maze and wheel-running behavior in the mouse. *J. Comp. Physiol. Psych.*, **79**, 459—473.
103. OLIVERIO, A. and MESSERI, P. (1973) An analysis of single gene effects on avoidance maze wheel-running and exploratory behavior in the mouse. *Behav. Biol.*, **8**, 771—783.
104. OLIVERIO, A., ELEFTHRIOU, B. E. and BAILEY, D. W. (1973) Exploratory activity: genetic analysis of its modification by scopolamine and amphetamine. *Physiol. Behav.*, **10**, 893—899.
105. OLIVERIO, A., CASTELLANO, C. and ELEFTHRIOU, B. E. (1975) Morphine sensitivity and tolerance: A genetic investigation in the mouse. *Psychopharmacologia*, **42**, 219—224.
106. ORENBERG, E. K., RENSON, J., ELLIOT, G. R., BARCHAS, J. D. and KESSLER, S. (1975) Genetic determination of aggressive behavior and brain cyclic AMP. *Psychopharmacol. comm.*, **1**, 99—107.
107. OVERSTREET, D. H., RUSSEL, R. W., HELPS, S. C. and MESSENGER, M. (1979) Selective breeding for sensitivity to anticholinesterase DFP. *Psychopharmacology*, **65**, 10—20.
108. OVERSTREET, D. H., DRISCOLL, P., MARTIN, J. R. and YAMAMURA, H. J. (1981) Brain muscarinic and cholinergic receptor binding in Roman high and low avoidance rats. *Psychopharmacology*, **72**, 143—145.
109. ÖDEGÁRD, Ö. (1963) The psychiatric disease entities in the light of a genetic investigation. *Acta Psychiatr. Scand.*, **39**, S, 169—194.
110. PAIGEN, K., SWANL, R. T., TOMINO, S. and GANSCHOW, R. E. (1975) The molecular genetics of mammalian glucuronidase. *J. Cell. Physiol.*, **85**, 379—392.
111. PAUK, W. L. (1979) Study of photoreceptor function using *Drosophyla* mutants. In: BREAKFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: Genetic approach to the nervous system*. Elsevier, New York, 67—99.
112. PETTERS, R. M. and MARKET, C. L. (1980) Production and reproductiv performance of hexaparental mice. *J. Heredity*, **71**, 70—74.
113. PRYOR, G. T., SCHLESINGER, K. C. and CALHOUN, H. (1966) Differences in brain enzymes among five inbred strains of mice. *Life Sci.*, **5**, 2105—2111.
114. PURDOM, C. E. (1969) Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, **24**, 431—444.
115. QUINN, W. G. and GOULD, J. L. (1979) Nerves and genes. *Nature*, **278**, 19—23.
116. RICE, M. C. and O'BRIEN, S. J. (1980) Genetic variance of laboratory outbred swiss mice. *Nature*, **283**, 157—161.
117. RICE, M. C., GARDNER, M. B. and O'BRIEN, S. J. (1980) Genetic diversity in leukemiaprone feral house mice infected with murine leukemia virus. *Biochem. Genet.*, **18**, 915—928.
118. RATHBONR, M. P. (1980) Avian chimaeras and the study of neuromuscular development. *TINS*, **3**, 17—19.
119. ROBERTSON, H. A. (1979) Benzodiazepin receptors in „emotional” and „nonemotional” mice: comparisons of four strain. *Eur. J. Pharmacol.*, **56**, 163—166.
120. ROBERTSON, H. A. (1980) Audiogenic seizures: increased benzodiazepin receptor binding in susceptible strain of mice. *Eur. J. Pharm.*, **66**, 249—552.
121. RODERICK, T. H. and SCHLAGER, G. (1966) Multiple factor inheritance. In: GREEN, E. L. (ed.): *Biology of the laboratory mouse*. McGrawhill, New York, 151—164.

122. ROEDRICK, T. H., WIMER, R. E. and WIMER, C. C. (1966) Genetic manipulation of neuroanatomical traits. In: PETRINOVICH, L. and MCGAUGH, J. L. (eds.): *Knowing, thinking and believing*. Pergamon Press, New York, 143—178.
123. ROEDRICK, T. H. and SHERIDAN, W. (eds.) (1979) Methods in mammalian mutagenesis. *Genetics*, **92**, Suppl., 1—209.
124. RUSSEL, R. L., JOHNSON, C. D., RAND, J. B., SCHERER, S. and ZWASS, M. S. (1977) Mutants of acetylcholine metabolism in the nematode *C. elegans*. In: WILCOX, G., ABELSON, J. and FOX, C. G. (eds.): *Molecular approach to the genetic systems*. Academic Press, New York, 359—371.
125. SEARLE, A. G. (ed.) (1977) Mouse mutant gene list. *Mouse News Letter*, **56**, 4—28.
126. SEYFRIED, T. N. (1979) Audiogen seizures in mice. *Fed. Proc.*, **38**, 2399—2404.
127. SEYFRIED, T. N., GLASER, G. H. and YU, R. K. (1979) Genetic variability for regional brain gangliosides in five strains of young mice. *Biochem. Genet.*, **17**, 43—55.
128. SHUSTER, L., WEBSTER, G. W., YU, G. and ELEFThERIOU, B. E. (1975) A genetic analysis of the response to morphine in mice: analgesia and running. *Psychopharmacologia*, **42**, 249—254.
129. SHUSTER, L., YU, G. and BATES, A. (1977) Sensitization to cocaine stimulation in mice. *Psychopharmacologia*, **52**, 185—190.
130. SIDMAN, R. L., GREEN, M. C. and APPEL, S. H. (1965) *Catalog of neurological mutants of mouse*. Harvard University Press, Cambridge
131. STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBEK, D. and SINGER, F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish. *Nature*, **291**, 293—296.
132. SWANK, R. T. and BAILEY, D. W. (1973) Recombinant inbred lines: value in genetic analysis of biochemical variants. *Science*, **181**, 1249—1251.
133. TARKOWSKI, A. K. (1961) Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*, **190**, 857—860.
134. TAYLOR, B. A. (1978) Recombinant inbred strains: use in gene mapping. In: MORSE, III, H. C. (ed.): *Origins of inbred mice*. Academic Press, New York
135. TAYLOR, B. A. and MEIER, H. (1976) Mapping the adrenal lipid depletion gene of the AKR/J mouse strain. *Genet. Res. Camb.*, **26**, 307—312.
136. TAYLOR, B. A., BEDINGIAN, H. G. and MEIER, H. (1977) Genetic analysis of a virus receptor. *J. Virology*, **23**, 106—109.
137. TICKU, M. K. (1979) Differences in gamma-aminobutyric acid receptor sensitivity in inbred strains of mice. *J. Neurochem*, **33**, 1135—1138.
138. VAIDO, A. J. and SITDIKOV, M. K. (1979) Selection of rat strains by long-term threshold of excitability of neuro-muscular apparatus. *Genetika*, **15**, 144—148.
139. VOLPE, E. P. (1970) Chromosome mapping in the leopard frog. *Genetics*, **64**, 11—21.
140. WAHLSTEIN, D. (1977) Heredity and brain structure. In: OLIVERIO, A. (ed.): *Genetics, environment and intelligence*. North-Holland, Amsterdam, 93—117.
141. WEGMAN, T. G., La VAIL, M. M. and SIDMAN, R. C. (1971) Patchy retinal degeneration in tetraparental mice. *Nature*, **230**, 333—334.
142. WEINSHILBOUM, R. M. (1979) Catecholamine biochemical genetics in human populations. In: BRAKEFIELD, X. O. (ed.): *Neurogenetics: Genetic approach to the nervous system*. Elsevier, New York, 267—282.
143. WILLIAMS, R. J. (1956) *Biochemical individuality*, John Wiley, New York
144. WOMACK, J. E. (1979) Single gene differences controlling enzyme properties in the mouse. *Genetics*, **92**, Suppl., 5—12.
145. WRIGHT, S. (1968) *Evolution and the genetics of population*. Vol. I—III. The University of Chicago Press, Chicago
146. YOON, C. H., PETERSON, J. S. and CORROW, D. (1976) Spontaneous seizures: a new mutation in syrian golden hamsters. *J. Heredity*, **67**, 115—116.

NEUROCHEMICAL GENETICS

Csányi, V.

Department of Behavior Genetics, Loránd Eötvös University of Budapest, Hungary

Classical and recently developed genetical techniques which can be applied in the field of neurochemistry are reviewed.

A SZTEROID HORMONOK HATÁSAINAK SZERKEZETI ALAPJAI

ARÁNYI PÉTER

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, II. Kémiai-Biokémiai Intézete

Beérkezett: 1982. március 3-án

Kulcsszavak: szteroid hormonok, hormonhatás mechanizmus, szerkezet—funkció összefüggés

Bevezetés

A szteroid hormonok felfedezését és azonosítását gyors ütemben követte a szintetikus analógok előállítása abban a reményben, hogy a természetes hormonoknál hatékonyabb molekulák előállítása is lehetséges. Valóban — mint kiderült —, a szerkezet kicsinek tűnő módosítása a biológiai hatást nagymértékben befolyásolhatja. Az első véletlen felfedezések óta a farmakológusok egyik központi törekvése volt, hogy felderítsék a szteroid molekulák szerkezete és biológiai aktivitásuk közti összefüggéseket.

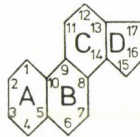
A közelmúltban, elsősorban a hetvenes években felgyülemlett nagyszámú kísérleti adat már lehetővé tette szemiempirikus formulák felállítását, melyek felhasználásával a szerkezet alapján a biológiai hatás megbecsülhető.

Ugyanakkor a szteroidok térszerkezetére vonatkozó ismereteink is jelentősen bővültek. Ma már a hormon által kiváltott hatást esetenként a három dimenziós szerkezettel hozhatjuk kapcsolatba, sőt az sem tűnik utópiának, hogy a felismert összefüggések alapján tervezzünk és szintetizáljunk a jövőben új, hormon hatású gyületeket.

Jelen összefoglalónak az a célja, hogy áttekintse a szteroid hormonok hatásának strukturális feltételeit, elsősorban a hormon — receptor kölcsönhatás tükrében. Hasonló jellegű munka magyar nyelven a szerző tudomása szerint eddig még nem jelent meg.

A szteroidok hatásai

A gerincesek számos szövetének működését befolyásolja valamilyen szteroid hormon. E hormonokat hatásaik alapján az ösztrogének, progesztogének, androgének, glukokortikoidok és mineralokortikoidok csoportjára oszthatjuk. Valamennyi természetes szteroid alapváza a ciklopentanoperhidrofenantrén váz (1. ábra).



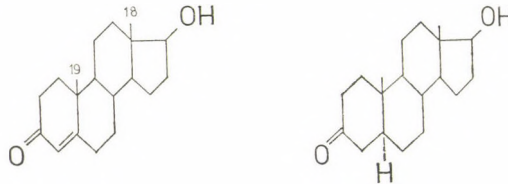
1. ábra. A szteroidok alapváza

Fig. 1. Perhydrocyclopentanophenanthrene nucleus of steroids

Az egyes hormon osztályok

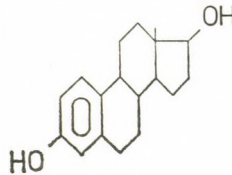
- az alapvázhoz csatlakozó további szénatomok számában;
- az A gyűrű telítettségének mértékében;
- a vázhoz csatlakozó poláros szubsztituensek (hidroxil- és oxocsoportok) számában és elhelyezkedésében különböznek.

- a) Az androgének (tesztoszteron, dihidrotesztoszteron) (2. ábra) a patkány prosztata hipertrofiáját és hiperpláziáját idézik elő [55], de hatással vannak a vesére és izomra [11], a herére és a mellékherére [40] is.



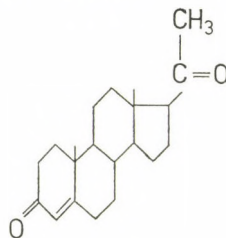
2. ábra. Tesztoszteron és dihidrotesztoszteron
Fig. 2. Testosterone and dihydrotestosterone

- b) Az ösztrogének (ösztradiol: 3. ábra) fő hatása a női reproduktív rendszer növekedésének és érésének stimulálása és a reprodukciós képesség fenntartása. Részletesen tanulmányozták csirke oviducton [83] és májon [92] kifejtett hatását is a patkány uterusra gyakorolt hatás mellett [50].



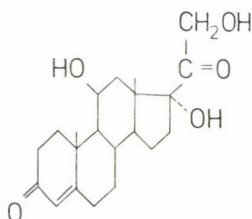
3. ábra. Ösztradiol
Fig. 3. Estradiol

- c) A progesztinek (progeszteron: 4. ábra) klasszikus funkciója a terhesség fenntartása emlősökben, de más biológiai válaszokat is kiváltanak, melyeknek nincs feltétlenül közük a terhességhez. Kétéltűek és madarak ovariuma is progeszteron célszövetnek tekinthető [53].



4. ábra. Progeszteron
Fig. 4. Progesterone

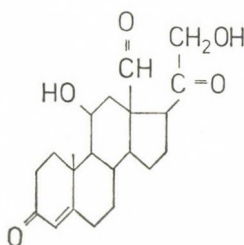
d) A glukokortikoidok (hidrokortizon; 5. ábra) szabályozzák a szénhidrát anyagcserét a májban, a vércukorszintet [13], ezenkívül specifikus hatást fejtenek ki a limfocitákra, a vázizomra, zsírszövetre és a központi idegrendszerre is [65].



5. ábra. Hidrokortizon

Fig. 5. Cortisol

e) A mineralokortikoidok (aldoszteron; 6. ábra) fő fiziológiás hatása a Na^+ reabszorpció és K^+ kiválasztás a kiválasztó epitheliumokban, mint pl. patkány vese [25] vagy a béka (*Bufo marinus*) hólyagja [57].



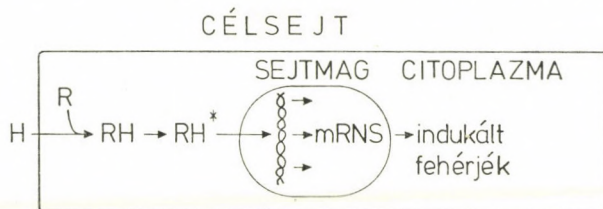
6. ábra. Aldoszteron

Fig. 6. Aldosterone

A szteroid hormonok hatásmechanizmusa

Habár az ismertetett hormonok hatásai és célszövetei különböznek egymástól (bár lehetségesek átfedések), a hatásmechanizmus alapvető egyezéseket mutat [30, 39]. Sőt valószínű, hogy az alábbiakban ismertetendő hatásmechanizmus többé-kevésbé érvényes a D_3 metabolitok [22] és a rovarhormon ekdizin esetében is [10].

A hatásmechanizmus egyes lépései a következők (7. ábra):



7. ábra. A szteroidok hatásmechanizmusa

Fig. 7. Mechanism of action of steroid hormones

1. A szteroid hormon a megfelelő endokrin szövetből kiválasztódván, a vérpályán keresztül eljut a célszövetig.
2. A célsejtek membránján akadálytalanul áthatol.
3. A célsejt citoplazmájában nem kovalens komplexet képez a receptor molekulával.
4. A hormon — receptor komplex konformációváltozást szenved, majd transzlokálódik a sejtmagba, ahol a kromatinhoz kötődik.
5. A hormon — receptor komplex sejtmagban való kötődését követően specifikus mRNS-ek szintézise indul meg, aminek specifikus fehérjék szintézisének fokozódása a következménye. A hormonhatás végeredményben a célsejt fehérje (enzim) összetételének specifikus megváltozásán keresztül valósul meg. Bizonyos esetekben egyes fehérjék szintézise nem növekszik, hanem csökken a hormonhatás következtében.

A hormon metabolizmus révén inaktiválódik. Ha a hormonszekréció csökken, azt követi a hormonszint csökkenése a célsejtben is, majd a hatás revertálódik.

Ez az általános kép bizonyos esetekben némileg módosul. Így például a szecernált tesztoszteron a célsejtben — és kizárólag ott — dihidrotesztoszteronra redukálódik: ez a hatásos molekula, ez kötődhet a receptorhoz [4]. Vagy az ösztradiol uterotróp hatásához szükséges, hogy az ösztradiol-receptor komplex viszonylag hosszú időn keresztül tartózkodjon a sejtmagban [23].

A szerkezet és az aktivitás közötti összefüggés

Van-e közvetlen korreláció a szerkezeti elemek és a hormonhatás között ?

Az 1950-es években indultak meg a hormonhatással rendelkező új szteroid származékok szintézisére irányuló kutatások abban a reményben, hogy a természetes hormonoknál hatékonyabb anyagok állíthatók elő. Ezeknek a vizsgálatoknak az előterében a glukokortikoidok álltak, gyulladásgátló hatásuk miatt.

1953—58 között sikerült is a hidrokortizonnál erőteljesebb gyulladásgátlókat felfedezni (*I. táblázat*). E felfedezések azonban inkább a véletlennek

1. táblázat

Gyulladásgátló szteroidok felfedezése

Table 1. Discovery of anti-inflammatory steroids

Szubsztituens	Felfedezés módja
9 α -Cl, 6 α -Cl 9 α -F, 12 β -F, 6 α -F Δ_1 (kettőskötés) 2 β -CH ₃ , 6 α -CH ₃ 16 α -OH 16 α -CH ₃ , 16 α -CH ₃	Új hidrokortizon szintézis utak keresése A kortizon bakteriális hidrolízisének mellékterméke Új prednizon szintézis utak keresése 9 α -F analógok vizsgálata Anaestetikus szteroidok vizsgálata

köszönhető, mintsem szisztematikus szerkezet — aktivitás összefüggéseken alapuló irányított molekulatervezésnek.

A későbbiekben nagyszámú szteroid származékot szintetizáltak, és mód nyílt a szerkezet és aktivitás közti összefüggések szisztematikus vizsgálatára. WOLFF és HANSCH [102] 9- α -szubsztituensekben különböző kortizol-acetát analógokat vizsgáltak, és azt tapasztalták, hogy patkánymájban a glikogén lerakódás (A) a szubsztituens hidrofobicitásával (π) és induktív effektusával (σ) pozitívan, a szubsztituens méretével (P_E) negatívan korrelált a következő összefüggés szerint:

$$\log A = 0,07 + 0,76\pi - 0,22 \log P_E + 2,76\sigma$$

AHMAD és MELLORS [1] mintegy 30 szteroidot vizsgálva azt találták, hogy azok glutamin szintetáz, tirozin aminoszferáz és alkalikus foszfatáz indukáló hatása, valamint egy egér limfoma sejtvonal növekedését stimuláló hatása korrelációban voltak a szteroid molekula egészét jellemző mennyiséggel, a parachorral [90]. A parachor értékeit táblázatok alapján számították. E korreláció nem jelent lineáris összefüggést, és a szerzők nem tudták magyarázni egyes jelentősebb eltérések okát.

Progesztagének hatékonyságát az endometrium proliferációját mérő klasszikus CLAUBERG-tesztel jellemezve [24, 89] megállapították, hogy a progeszteron származékok és a tesztoszteron 17 α -alkil analógjai rendelkeznek nagy CLAUBERG-aktivitással.

Farmakodinamikai tényezők

Az egyes szteroidok hatásosságát végső soron a receptorral való kölcsönhatás erőssége és jellege, valamint farmakodinamikai tényezők együttesen határozzák meg [9].

Ezenkívül tudatában kell lennünk annak is, hogy a receptorral erős kölcsönhatásba lépő szteroid nemcsak optimális agonista, hanem részleges agonista vagy antagonist is lehet [81]. Ez utóbbi kérdés tárgyalására a későbbiekben térünk ki.

A természetes szteroidok kémiai módosítása a hormonhatás kifejeződését több szinten befolyásolhatja.

A vízdékonyságot növelő szubsztituensek általában elősegítik a hatás gyors bekövetkezését orális adagolás esetén. Így például a diklorizonfoszfát gyulladásgátló hatása jóval kifejezettebb, mint a diklorizoné. Ezt valószínűleg a foszfátészter jobb oldékonysága magyarázza [67].

A szteroidok a plazmában részben szabad, részben fehérjéhez kötött formában vannak jelen. A természetes kortikoszteroidokat a transzkortin, az ösztradiolt és a tesztoszteront a szex szteroid kötő globulin, a progeszteront a transzkortin és a progeszteron kötő globulin köti meg nagy affinitással, de az albuminhoz való kötődést sem lehet elhanyagolni. A kötődés erőssége a szteroid hidrofób jellegének erősödésével nő [15].

Csak a szabad szteroid képes a célsejt belsejébe jutni, a plazmafehérjéhez kötött forma nem. Ezzel szemben a fehérjével való kapcsolódás védi a molekulát a metabolizmussal szemben. E két effektus végeredményben ellentétes irányban befolyásolja a hormonhatás kifejeződését. Így nem lehet *a priori*

	Plazma		Membrán	Uterus		
	szabad	meta-bolizált		kötés	felvétel	aktivitás

8. ábra. Farmakodinamikai tényezők befolyása ösztradiol analógok biológiai aktivitására. Az egyes szimbólumok nagysága az adott folyamat lefolyásának mértékével vagy frakciónagyságával arányos

Fig. 8. Influence of pharmacodynamic factors on the biological activity of estradiol analogues. Area of the symbols is proportional to the measure of the process or of the fraction concerned

megmondani, hogy a plazmafahérjékhez való kötődés változása végeredményben milyen módon változtatja meg egy adott szteroid hatékonyságát [103].

Az aktív szteroidok metabolikus bontásának sebessége is alapvetően befolyásolja a hormon-analóg hatásosságát. Így azok a szerkezetmódosítások, amelyek a hormon metabolizmusát lassítják, az eredeti vegyületnél hatékonyabb származékot eredményeznek. Ezért rendelkeznek fokozott aktivitással pl. a kortizol-analógok közül a 2- β -metil [95], a 6- α -metil [68], a 16- α -hidroxil [33] származékok, az ösztradiol analógjai közül pedig a 17-etinil és 11-metoxi származékok [17].

RAYNAUD és mtsai 16 ösztradiol származék összehasonlító analízisével kimutatták, hogy az egyes drogok esetében a plazmadisztribúció, a metabolizmus, valamint a hormon célsejt általi felvétele változó mértékben befolyásolhatja a végeredményben észlelhető hatást [68]. A plazma disztribúció jelentős szerepet játszik a hatékonyság meghatározásában, és bár minden aktív analóg kötődik az ösztradiol receptorhoz *in vivo*, a hatékonyság nem jól korrelál az *in vitro* kötődés mértékével.

A legaktívabb származékok uterotrop aktivitását és a befolyásoló tényezőket tünteti fel a 8. ábra. Az összehasonlítás kedvéért egy inaktív származék jellemzői is szerepelnek a 8. ábrán.

A receptorhoz való kötődés vizsgálata

Láttuk az előzőekben, hogy a receptorhoz való affinitás mértéke nem nyújt elegendő információt ahhoz, hogy új származékok hormonhatását előzetesen megbecsülhessük. Azonban bizonyosnak látszik, hogy a receptorhoz való kötődés minden szteroid hatás előfeltétele. Ezért és a hormon—receptor kölcsönhatás-mérés viszonylagos egyszerűsége és kis anyagigénye miatt, az utóbbi időben igen nagyszámú szteroid származék receptor iránti affinitását határozták meg. Ez módot nyújt a fehérje—ligand kölcsönhatás molekuláris és szubmolekuláris szintű analízisére is.

E fejezet hátralevő részében röviden néhány metodikai jellegű kérdést tárgyalunk.

A kölcsönhatás meghatározására az esetek zömében kompetíciós tesztet alkalmaznak, megfelelően választott radioligand és receptor felhasználásával. Adott szteroid affinitását az ún. relatív kötési affinitás (RBA) értéke jellemzi. Ez a kérdéses szteroid és a referencia ligandum (nem radioaktív formájának) kompetíciós hatékonyságát összehasonlító számadat. Definíciója: az izotóppal jelzett ligandum 50%-os leszorításához szükséges koncentrációk hányadosa szorozva 100-zal. Például a triciált R 5020-at nyúluterus progesztin receptorról kb. 5 nM jelzetlen R 5020 vagy 10 nM progeszteron szorítja le 50%-ban. Ha progesztin receptor esetében a progeszteront választjuk referencia szteroidnak, akkor az RBA progeszteronra 100, R 5020-ra kb. 200 [66].

Számos szövetben találunk szteroid hormon receptor fehérjét. Ösztrogén receptorokat elsősorban az uterus, vagina, ovarium és az emlőmirigyek tartalmaznak [80].

Mivel a progesztin receptor szintézisét ösztrogének indukálják [94], valószínű, hogy funkcióképes ösztrogén receptort tartalmazó struktúrák progesztin receptorral is rendelkeznek. Jelenlétüket többek között kimutatták az uterusban [61], a vaginában [82] és az emlőmirigyben [101].

Androgén receptor jelenlétét kimutatták sok androgénérzékeny szövetben (prostatata, ondóhólyag, levator ani, mellékhere) [31, 59, 100]. Mineralokortikoid receptort találtak békabőrben [63] és patkánymájban, -vesében, -lépben [91]. Glukokortikoid receptort találtak májban, vesében [65]. Sokat tanulmányozták a HTC hepatóma sejtkultúra glukokortikoid receptorát is [12].

Mindegyik receptorfeleség előfordul bizonyos agyterületeken és a hipofízisben. Humán eredetű szövetekben is kimutatták mind az ötféle receptor létezését [73]. E lista korántsem teljes. A különböző eredetű, de azonos hormonosztályra specifikus receptorok igen hasonló sajátosságúak [7], de azonosságukra nézve nem áll meggyőző bizonyíték rendelkezésre. Alaposan meg kell tehát fontolni azt a kérdést, hogy milyen receptort célszerű használni a szerkezet és a funkció közötti összefüggések felderítését célzó vizsgálatokban.

Általánosságban mondhatjuk [74], hogy olyan célszöveteket célszerű választani, melyek az adott hormonhatás biológiai végpontjának felelnek meg és melyekben a metabolikus aktivitás lehetőleg alacsony (kivéve, ha a cél éppen a metabolikus inaktiválásnak ellenálló származék előállítására).

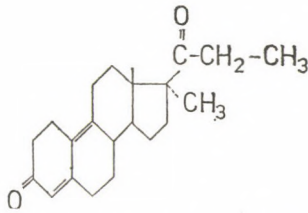
A preparátumot nem szükséges jelentősen dúsítani vagy a receptor fehérjét teljesen megtisztítani. A mérések zömét a különböző laboratóriumokban egyaránt citoszol vagy sejtszuszpenzió felhasználásával végezték.

Nem közömbös az eredmények szempontjából az sem, hogy milyen radioligandummal végezzük a kompetíciós kísérleteket. A ligandum kiválasztásánál az alábbi szempontok a legfontosabbak [74]. A választott ligandum lehetőleg ne metabolizálódjon a tesztrendszerben, ne kötődjék az esetleg jelenlevő plazmaférjékhez, és lehetőleg minél kevésbé kötődjék a rendszerben található egyéb specifikus kötőfehérjékhez, receptorokhoz.

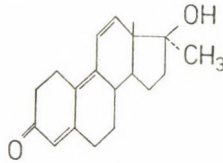
E szempontok alapján leginkább a következő radioaktív (triciált) analógok jöhetnek számításba: ösztrogén receptor jelzésére ösztradiol; progesztin receptorához R 5020 (9. ábra) [70]; androgén receptorához tesztoszteron vagy dihidrotesztoszteron [105], esetleg a szintetikus R 1881 (10. ábra) [16]; mineralokortikoid receptorához aldoszteron; glukokortikoid receptorához dexametazon (11. ábra) [74, 77] vagy triamcinolon acetamid (12. ábra) [58]. A fenti rendszerekben vizsgált analógok száma több százra rúg [66, 73, 77, 89].

A hormon—receptor komplex kialakulása, különösen 0° C-on meglehetősen lassú folyamat. A disszociációs egyensúlyi állandóval számértékben kb. egyező szteroid koncentrációk esetén az egyensúly beállása órákig, sőt napokig is tarthat [5, 6]. Ennek következtében a kompetíciós kísérletek tényleges körülményei sok esetben nem teszik lehetővé az egyensúly elérését, vagy akár megközelítését [88]. Az egyes szteroidok RBA-i, sőt a receptor iránti affinitásuk sorrendje is függhet attól, hogy hosszú ideig (esetleg magas hőmérsékleten) vagy rövid ideig inkubáljuk a receptorral és a jelzésre használt radioaktív szteroiddal együtt [18, 66]. Ezért RAYNAUD és mtsai [74] azt javasolják, hogy szteroidok szűrő vizsgálatokor minden kérdéses analóg RBA-ját két különböző módon, rövid ideig alacsony hőmérsékleten és hosszabb ideig magasabb hőmérsékleten inkubálva is állapítsuk meg. A lassan disszociáló analógok RBA-ja az inkubálási idővel és hőmérséklettel nő, a gyorsan disszociálóké pedig csökken. A rövid inkubálási idő után meghatározott RBA elsősorban az asszociációs sebességi állandótól függ, ezzel szemben a hosszú inkubálási idő után meghatározott RBA inkább a disszociációs sebességi állandó értékét tükrözi.

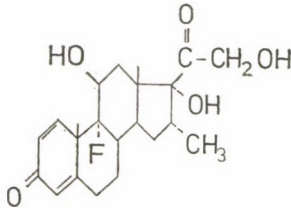
Az asszociációs és disszociációs sebességi állandók közvetett becslésével szemben a sebességi állandók tényleges meghatározása ajánlható [6, 8].



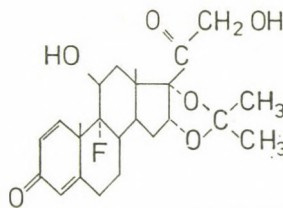
9. ábra. R 5020 (promegesztin) 17,21-dimetil-19-nor-pregna-4,9-dién-3,20-dion
Fig. 9. R 5020 (promegestone)



10. ábra. R 1881 (metiltrienolon) 17 β-hidroxi-17 α-metilösztira-4,9,11-trién-3-on
Fig. 10. R 1881 (methyltrienolone)



11. ábra. Dexametazon (9 α-Fluoro-11 β, 17 α, 21-trihidroxi-16 α-metil-pregna-
-1,4-dién-3,20-dion)
Fig. 11. Dexamethasone



12. ábra. Triamcinolon acetamid (9 α-Fluoro-11 β, 16 α, 17 α, 21-tetrahidroxi-pregna-
-1,4-dién-3,20-dion-16, 17-acetonid)
Fig. 12. Triamcinolone acetamide

Hogyan függ a receptor-szteroid komplex stabilitása a szteroid szerkezetétől?

1. Ösztradiol származékok

Csak a fenolos jellegű A gyűrűt tartalmazó ösztradiol származékok kötődnek az ösztrogén receptorhoz. Akár a C-3, akár a C-17 hidroxil metilezése a kötődés megszűnéséhez vezet [48, 69, 87]. Nem közömbös a hidroxil helyzete az A gyűrűn: az ösztradiol C-2 OH analógjának affinitása az ösztradiolénak csak mintegy harmada [87].

A D gyűrű szerkezetének és szubsztituenseinek befolyása a következőkben foglalható össze. A 17 β -hidroxil csoportot ketonnal helyettesítve az RBA kb. 50%-os csökkenését tapasztaljuk. Az ötagú D gyűrű helyett fenolos D gyűrűt tartalmazó származékok, valamint a 16, 17-dihidroxil származékok affinitásai az alapvegyületének 20–30%-át teszik ki [87]. Általában a 17 β -analógok affinitása a 17 α analógokét jelentősen meghaladja, de a 16 α , 17 α -dihidroxil származék affinitása nagyobb az ösztradiolénál és a 16 α -epiöszt-radiolénál is, melyek 17 β származékok.

Az A és C gyűrűkön történő módosítások általában az RBA csökkenéséhez vezetnek, kivéve a 7 α -metil szubsztitúciót. Így a C-2 α vagy C-9 helyzetű metil és némileg C-17 α metil is csökkenti a kötődés erősségét [48, 74]. A C-18 helyzetű metil hiánya nem okozott jelentős változást, azonban hosszabb homológokkal való helyettesítése a növekvő szénatomszámmal egyre inkább csökkentette a kötődés erősségét, így a 18-butil homológ RBA-ja már csak mintegy 10–15% [74]. A C-11 β helyre bevitt szubsztituensek (-hidroxil, = metoxil, = etoxil) egyaránt az affinitás drasztikus csökkenését eredményezték [71]. A kötés erősségét egyedül a C-17 α -etnil szubsztitúció növelte jelentősen [74].

Az ösztradiol származékok általában igen specifikusan csak az ösztrogén receptorhoz kötődnek. Kivétel az etinil-öszt-radiol, amelynek jelentős a progesz-tin receptorhoz való affinitása (RBA kb. 15–25%) és a 7 α -metil ösztradiol, amely szignifikáns androgén kötést mutat [72].

2. Progeszteron származékok

A progesztin receptorhoz való effektív kötődés lényeges feltétele a 3-keto-4-en szerkezeti részlet megléte a molekulában. A kettőskötés redukciójakor akár az 5 α , akár az 5 β izomert tekintjük, az RBA jelentősen (30% alá) csökken [62]. Hasonló csökkenést okoz a 3-keto csoport redukciója is [62].

A C-17 oldallánc szerepe jóval kisebb, mint az A gyűrűé, olyannyira, hogy tesztoszteron származékok is esetenként igen jól (RBA 100% körüli vagy több) kötődhetnek a progesztin receptorhoz [66, 74, 89].

A C-17 α szubsztituensek közül a hidroxil csoport erősen csökkenti a progesztin receptorhoz való kötődés erősségét [89], ám a 17 α -alkil, sőt 17-gyűrűs éter, 17-lakton, 17-oxatiolán származékok is a progeszteronéval körülbelül egyező, esetenként még nagyobb affinitással rendelkeznek a progesztin receptor iránt [74].

A 17 α helyzeten kívül a 16 α , 14 α , 11 α , 11 β , 6 α , 6 β helyzetbe bevitt hidroxil csoport vagy a 20-keton redukciója az RBA jelentősen csökken, azonban ezt a hatást az acilezés megszünteti [62, 89].

Az α -alkil származékok affinitása az alapvegyülethez képest változatlan vagy fokozott a 17 α -analógok, vagy némileg csökkent a 6 α -, 7 α -, 16 α -metil származékok esetében [74].

Kettőskötések bevezetése a kötés erősségét csökkentheti, mint a $\Delta 11$, $\Delta 6$ és $\Delta 16$ vegyületek esetében [89], azonban a $\Delta 9$ és $\Delta 11$ analógok, valamint a 19-norprogeszteron affinitása a progesztin receptorhoz nagyobb, mint a progeszteroné [71, 74].

F atom bevitele a 6 α vagy a 21 helyzetbe a kötődés erősségét lényegében nem befolyásolta, azonban 6 Br szubsztituens mindkét térállásban erősen csökkentette [89].

E vegyületek specificitása kisebb, mint az ösztradiol származékoké. A több konjugált kettőskötéssel rendelkező származékok jelentősen kötődnek az androgén receptorhoz, a hosszú 17 oldallánccal rendelkezők és a 17 laktonok pedig a glukokortikoid és mineralokortikoid receptorhoz is [74].

3. Tesztoszteron származékok

Az androgén receptorhoz való kötődéshez is többnyire 3-keto-4-en szerkezet szükséges. Az androsztandiol és androsztendiol származékok gyenge kompetitorok [54].

A telített származékok közül az 5 α -dihidrotesztoszteron affinitása az androgén receptorhoz körülbelül azonos a tesztoszteronéval, míg az 5 β -dihidrotesztoszteron gyakorlatilag nem kötődik [54]. A kettőskötés helyzete nem közömbös. A $\Delta 5$ analóg RBA-ja mintegy 80%-kal alacsonyabb a tesztoszteronénál. A 17 β -hidroxil csoport jelenléte esszenciális az androgén receptorhoz való kötődés szempontjából, és 17 α -hidroxil csoporttal sem helyettesíthető [54, 71].

A 19-nortesztoszteron származékok szintén jól kötődnek az androgén receptorhoz és a progesztin receptorhoz is, akkor is, ha a C-13-as szubsztituens a metilnél hosszabb alkil csoport volt [74].

A 17- α -metil analógok továbbra is jól kötődnek az androgén receptorhoz, de a progesztin receptorhoz is, míg a 17 α -etil analógok a progesztin receptorhoz jól, az androgén receptorhoz kevésbé jól kötődnek [74, 86, 89].

A $\Delta 4,9$ -dien és $\Delta 4,9,11$ -trien affinitása az androgén receptor iránt nagyobb, mint az alapvegyületé, ám a $\Delta 4,9,11$ -trien a progesztin receptorhoz is jelentősen kötődik. Ezeknek a telítetlen származékoknak a 17 α -etil analógjai és 17 α -metil analógjai a progesztin receptorhoz legalább olyan jól kötődnek, mint az androgén receptorhoz [74].

A tesztoszteron és 19-nortesztoszteron 7 α -metil analógjai az alapvegyületnél nagyobb affinitással rendelkeznek az androgén receptor iránt [54]. Ezzel szemben a $\Delta 4,9,11$ -trien 7 α -metil származékának affinitása csak a progesztin receptor iránt nő meg [69].

Metil szubsztituens bevitele 1 α , 2 β vagy 4 helyzetbe, vagy geminális dimetil bevitele a 2 szénatomra [74] csökkentették az androgén receptorhoz való kötődés erősségét.

A 18-metil hosszabb alkil láncsal helyettesítve a glukokortikoid receptorhoz is kötődő származékok adódtak. A 11 β -metoxi és a 11 β -fenil származékok az androgén receptorhoz gyakorlatilag nem kötődtek, de jelentős affinitással rendelkeztek a progesztin és a glukokortikoid receptor iránt.

A három konjugált kettőskötéssel rendelkező tesztoszteron származékok kevésbé specifikusak, mint a megfelelő progeszteron származékok. Például a 7 α -, 17 α -dimetil-13 β -etil-17-hidroxigona-4,9,11-trién-3-on a progesztin-, az androgén- a mineralokortikoid- és a glukokortikoid- receptorhoz egyaránt mintegy 100%-os RBA-val vagy még jobban kötődik [74].

A 17 β -OH redukciója vagy oxidációja egyaránt igen erősen csökkenti az androgén receptor iránti affinitást anélkül, hogy jelentősen megváltoztatná a szteroid váz térszerkezetét. Valószínű, hogy a 17 β -hidroxil csoport hidrogén kötésben vesz részt, mégpedig úgy, hogy oxigénje proton akzeptorként szerepel [86].

C-17 deoxipregnán oldallánccal rendelkező szteroidok is képesek az androgén receptorhoz kötődni [66].

Ez a tény a 17 α -etinil származékokról írottakkal együtt azt jelenti, hogy az androgén receptor szteroid kötő felszínén van hely viszonylag nagy térkitöltésű csoportok elhelyezésére a 17-C atom közelében. Másfelől arra utal, hogy a progeszteron származékok esetében a 20-ke-ton oxigénjének π pályája lehet a hidrogén kötés akceptor eleme.

4. Mineralokortikoid származékok

Az aldoszteronéhoz hasonló vagy nagyobb affinitással a mineralokortikoid receptor iránt csak a 9 α -fluorokortizol és a 9 α -fluoroprednizolon rendelkezik [37, 74].

A dezoxikortikoszteron 50%-nál nagyobb RBA-val jellemezhető, amelyet némileg csökkent a 21-OH acetilálása vagy $\Delta 6$ kettőskötés bevezetése [37].

A 18-hidroxikortikoszteron és a 18-hidroxidezoxikortikoszteron igen kis affinitással kötődnek a receptorhoz [35].

A 17 α -hidroxil bevitele a dezoxikortikoszteron molekulába szintén csökkenti a receptor iránti affinitást, amit 11 β -hidroxil bevitele tovább gyengít [99].

GENARD és PALEM-VLIERS [37] szerint a receptorhoz való kötődés szabadentalpia csökkenését elsősorban a következő poláros csoportok jelenléte határozza meg: a 21-hidroxil, a 20-karbonil és az aldoszteronban hemiacetál formában jelenlevő 18-hidroxil és a 9 α -fluor. Megjegyzendő, hogy az elsősorban hemiketál formában előforduló 18-hidroxi származékok, pl. 18-hidroxi-dezoxikortikoszteron affinitása a receptor iránt csekély.

Azonban e csoportok mindegyike önmagában viszonylag kis hatású, jelenlétük nem elengedhetetlen a kötődéshez. Így a 9 α -fluoro-11 β -hidroxil progeszteron, bár sem 21-hidroxi, sem 18-OH csoportja nincsen, jelentős mineralokortikoid aktivitással rendelkezik [35].

A 9 α -fluor atom jelenléte a molekula konformációját kevésbé befolyásolja [99], a C—H és C—F kötések közötti dipol—dipol kölcsönhatás azonban a C₅—C₇, C₁₂ és C₁₄ atomok és α -axiális hidrogénjeik közötti kötést befolyásolja. A mineralokortikoid receptorhoz való kötődés specificitását viszont éppen a C₅, C₁₂ és C₁₄ atomok és a hozzájuk kapcsolódó α -axiális hidrogén atomok határozzák meg. A kölcsönhatás természete: VAN DER WAALS erők.

A szteroid molekula β oldala és az A gyűrű szubsztituensei és konformációja valószínűleg alárendelt jelentőségűek [37].

5. Glukokortikoid analógok

A glukokortikoid receptorhoz való kötődés mértékét sok esetben jelentősen befolyásolja a vizsgált szteroid metabolikus átalakulása a tesztrendszerben. Például a dezoxikortikoszteron vagy az aldoszteron látszólag igen alacsony affinitását a máj citoszol glukokortikoid receptora iránt, másfelől a kortizon jelentős látszólagos RBA-ját metabolikus lebontás, illetve aktiválás (hidrokortizonná alakítás) eredményezheti [34]. Megjegyezzük, hogy a metabolizmus sebességét a hidrokortizon molekulának csaknem tetszőleges szubsztituálása csökkenti, sőt a szubsztituensek stabilizáló hatása mintegy összegeződik [34].

A 9- α -fluor csoport növeli a glukokortikoid receptor iránti affinitást. A 16 α -metil csoport nem befolyásolja, a 21-es hidroxil acetilezése csökkenti, a Δ 11 kettőskötés bevezetése növeli a kötődés erősségét. A C-16 szubsztituens orientációja nem lényeges a kötődés szempontjából, azonban poláros szubsztituens esetén a kötődés gyengébb, mint apoláros szubsztituens esetében [74].

A 9 α -fluor származékok közül azok a 16 α -metil analógok, melyek 17 α -hidroxil csoportot nem tartalmaznak, jól kötődtek a progesztin receptorhoz is. A 6 α , 9 α -dihalogénezett származékok kötődése a progesztin receptorhoz még kifejezettebb.

A hidroxil szubsztituensek szerepéről megállapítható, hogy a 17 α -hidroxil csoport jelenléte csökkenti, a 21-hidroxilé növeli a glukokortikoid receptorhoz való kötődés erősségét.

A 11 β -OH csoport jelenléte a pregnán sorozat szteroidjainak affinitását növeli, ám az androsztán származékok affinitását csökkenti.

A 11 α vagy 20 α -hidroxilt tartalmazó származékok gyakorlatilag nem kötődnek a receptorhoz [77, 104].

A glukokortikoid hormon-receptor kölcsönhatás egyensúlyi és sebességi állandóinak hőmérséklet függéséből WOLFF és mtsai [103] arra következtettek, hogy a komplexet elsősorban hidrofób kölcsönhatások stabilizálják, s ugyancsak hidrofób kölcsönhatások következtében alakul ki a komplex képződésére vezető átmeneti állapot. Hidrogén kötések kialakulásának a jelentősége csekély vagy semmi.

22 szteroid vizsgálata alapján az egyes szubsztituensek közelítő szabadentalpia járulékát is kiszámították. A fehérjék hidrofób kölcsönhatásban részt vevő felszínének nagysága és a kölcsönhatás erőssége közötti összefüggés alapján [21, 46] kiszámítható volt, hogy a glukokortikoid hormon-receptor komplex észlelt nagy stabilitása feltételezi, hogy a receptor mintegy beburkolja a szteroid molekulát, annak mindkét oldalával kölcsönhatásba lépve.

Végül WOLFF és mtsai [103] multilineáris regressziós analízist végeztek a disszociáció állandó logaritmus (lényegében a folyamat standard szabadentalpia változása) és a szteroid szerkezet néhány jellemzője közötti összefüggés megvilágítására. A következő változóknak van lényeges hatása:

- A származék felszíne, melyet a progesztin vázon levő valamennyi szubsztituens felszíneinek összegezésével kaptak, jelölése SA ($\text{cal}/\text{Å}^2$).
- A szteroid poláros csoportjainak a receptorral való kölcsönhatását jellemző változó, P (cal). Értékét úgy kapták, hogy a C-11 és C-21 helyzetekben levő hidroxil csoportok +1, a C-17 és C-16 helyzetekben levő hidroxil csoportok -1, és a 11-keto csoport -2 számot kap. Ezeket aszerint összegezték, hogy mely szubsztituens volt ténylegesen jelen a molekulában.

- Az A gyűrű konformációját jellemző változó. Ez a C-3 és C-17 atomok Å-ben mért távolsága, T (cal/Å).
- A 9 α -helyzetű szubsztituens méretét jellemző paraméter. Nagyméretű csoport jelenléte ebben a helyzetben a kötődést meggátolja. Ez a változó $-X$ (cal/Å) — 0, ha a 9 α szubsztituensnek a pregnán vázról mért radiális távolsága kisebb, mint a 9 α -Cl-é. Ha adott szubsztituens esetében ez a távolság nagyobb, mint a klórra vonatkozó érték, akkor X értékeként a két távolság különbségét vették.

A multilineáris regresszióval kapott függvény a következő:

$$\Delta G_{\text{asszoc}}(\text{cal}) = -27 SA - 734 P + 1865 T + 7585 X - 8143$$

29 szteroidra végzett statisztikai analízis a regressziós egyenletet igen jónak mutatta (a többszörös korrelációs együttható 0,97).

6. A szteroidok receptor specificitása

A $\Delta 4,9$ és különösen a $\Delta 4,9,11$ konjugált kettőskötést tartalmazó 3-oxo szteroid származékok, amelyek 17 β -hidroxi, 17 β -lakton vagy 17 β -oxatiolán funkciót tartalmaznak, jelentős affinitással kötődnek több különböző szteroid hormon osztály (progesztin, androgén, mineralo- és glukokortikoid) receptoraihoz is [27]. Így pl. a C-13 alkil nortesztozsteron származékok elsősorban az androgén receptorhoz kötődnek, míg a $\Delta 4,9,11$ analógjaiknak a progesztin receptor iránti RBA-ja is 40–90%.

A 17 α -metil nortesztozsteron erősen kötődik a progesztin és az androgén receptorhoz; $\Delta 4,9,11$ analógjának a mineralokortikoid és glukokortikoid receptorokhoz is jelentős affinitása van.

A C-17 lakton vagy spiro-oxatiolán funkciót tartalmazó származékok igen jól és meglehetősen specifikusan a progesztin receptorhoz kapcsolódnak, ám a $\Delta 4,9,11$ konjugált kettőskötés rendszer bevezetése e vegyületcsalád kötési specificitását is csökkenti. Jelentős affinitást észleltek az androgén, mineralokortikoid és glukokortikoid receptorok iránt is e vegyületek esetében.

DELETRÉ és mtsai [27] szerint a szintetikus hormonanalógok a következő feltételek mellett képesek a receptorhoz való kötődésre:

- A molekula két végén (a C-3 és C-17 atomok környezetében) poláros csoporttal kell rendelkezniük, hogy H-hídat alakíthassanak ki.
- Nem lehet nagy térkitöltésű szubsztituens a C-3 atom közelében. Pl. a metiltrienolon 2-gem-dimetil származékának a progesztin és az androgén receptorhoz való affinitása az alapvegyületénél lényegesen kisebb, míg a 6-gem-dimetilszármazék mindkét receptorral szemben jelentős affinitást mutat.
- Elegendő számú VAN DER WAALS kölcsönhatást kell létesíteniük, fokozhatja a receptorok iránti affinitást a 17- α -alkil lánc vagy a $\Delta 9,11$ kettőskötések és a 7 α -metil szubsztituens.
- Megfelelő molekulakonformációt kell felvenniük, ami valószínűleg minden receptorfehérje esetén más és más.

A $\Delta 4,9,11$ triének molekulái jelentősen flexibilisebbek, mint a megfelelő dieneké és monoéneké. E szteroidok kis (1–2 kcal/mol) energia befektetéssel egymástól viszonylag távoli konformációs állapotokba vihetők, amely állapotok különböző természetes 3-keto-4-en szteroidok legstabilabb konformá-

cióinak felelnek meg. Valószínűleg ez a tény magyarázza, hogy a $\Delta 4,9,11$ szteroidok hatékonyan szorítják le a különböző hormonosztályok receptoraihoz kötődő jelző szteroidokat.

A C-11 helyzetben szubsztituált szteroidok szerkezete is igen flexibilis [19]. Azonban az általában alkalmazott hidroxil vagy metoxi szubsztituensek szterikus és poláris hatásaik következtében a receptorokhoz való kötődést jelentősen csökkentik [66], míg a kettőskötések számának növelése csak a konformációt és esetleg az elektroneloszlást befolyásolja.

Az a tény, hogy 3-keto-4-en szteroidok több hormonosztály receptorához is képesek kötődni, többek között arra hívja fel a figyelmet, hogy e receptorfehérjék egymáshoz igen hasonló sajátosságú molekulák. A hormonosztályok közötti különbség elsődleges okát nem is a receptor és a hormon közötti kapcsolódási pontok különbségében kell keresnünk, hanem inkább azokban a konformációváltozásokban, amelyek ahhoz szükségesek, hogy a kérdéses környezetben a komplex egyáltalán kialakulhasson.

7. Nem szteroid vázú molekulák

Ha a receptorral való kölcsönhatásban szereplő csoportok egy molekulában jelen vannak, továbbá szterikusan is megfelelően helyezkednek el, akkor a receptorral való kölcsönhatás is bekövetkezik, függetlenül attól, hogy a molekula tartalmaz-e szteroid vázat vagy sem.

Így kimutatták, hogy bizonyos nem szteroid vázú ösztrogének, (pl. dietilstilbésztról és hexösztról) [45], antiösztrogének (pl. tamoxifen és nafoxidin) [93], továbbá a CI-628 (α -[4-pirrolidino-etoxi]-fenil-4-metoxi- α -nitrostilbén) [51] és egyéb trifenil-etilén származékok [52] kötődnek az ösztrogén receptorhoz.

Nem szteroid struktúrával rendelkező antiandrogének: hidroxiflutamid és RU 23908 (5,5-dimetil-3-[4-nitro-3-/trifluorometil/-fenil]-2,4-imidazolidindion) nem elhanyagolható affinitással kötődnek a tesztoszteron, illetve a dihidrotesztoszteron receptorhoz [72, 74]. Bizonyos nem szteroid vázú gyulladásgátló anyagok, pl. aszpirin, fenilbutazon és indometacin [32], vagy a dezacilkortivazol [41] pedig a glukokortikoid receptorhoz kötődnek.

A kötése erősség és a biológiai hatás közötti összefüggés

I. Vizsgálati rendszerek

RAYNAUD és munkatársai [74] úgy vélekednek, hogy ha a tradicionális aktivitási tesztek és a receptorhoz való affinitás között sikerül korrelációt megállapítani, akkor várható, hogy — a farmakokinetikai tényezők tekintetbe vételével — a receptorkötési tesztek a régi vizsgálati módszereket teljesen ki fogják szorítani a gyakorlatból. Sajnos, viszonylag kevés olyan tesztrendszer áll rendelkezésre, amely a biológiai hatékonyság és a receptorkötés közti összefüggés kiderítését szteroid hormonok esetében könnyen megállapíthatóvá tenné.

A glukokortikoidokat, mint a tirozin aminoszferáz enzim indukálószerait, HTC sejtekben viszonylag részletesen vizsgálták [13, 76, 77]. A glukokortikoid receptorhoz való kötődés és az egér emlőtumor vírus-indukció [97] az uridin inkorporáció gátlás [26] és az ACTH termelés gátlása [98] között is találtak korrelációt.

A többi szteroid hormon esetében a tradicionális módszereket alkalmazták a potenciális drogok szűrővizsgálataiban. Ez ösztrogéneknél az uterotróp hatás meghatározását [79], progesztineknel az endometrium proliferációjának mérését [24], androgéneknel a prosztata trophikus válaszána meghatározását [43], mineralokortikoidoknál a Na^+ retenció mértékének meghatározását [60] jelenti.

Némi korrelációt valóban megállapítottak az ösztrogének [87], a progesztinek [81] és az androgének [54] esetében is.

Nyilvánvaló, hogy nem várhatunk jó korrelációt azoknál a származékoknál, amelyek hatékonyságát az eloszlás és felszívódás vagy a metabolikus átalakítás döntően meghatározza.

A várható korreláció mértéke erősen függ attól is, hogy a receptorhoz való affinitást milyen inkubálási körülmények között állapítottuk meg. Általában a lassan disszociáló szteroidoktól várható, hogy stabil komplexet képeznek a receptorral, és tartós választ válthatnak ki, jó agonistaként viselkednek.

Ennek megfelelően azt találták glukokortikoidoknál, hogy a relatív biológiai aktivitások inkább a 37°C -on, mint a 0°C -on meghatározott relatív affinitásokkal korrelálnak [47]. Hasonlóan csak a hosszú inkubálási idő után meghatározott RBA tükrözi egy adott szteroid androgén aktivitását [105].

Hasonló eredmények adódtak ösztrogének esetében is [18]. Azonban az inkubálási körülményektől függetlenül is állíthatjuk, hogy a szteroid molekulának azok a módosításai, melyek a receptorhoz való affinitását növelik, a hormonális aktivitását is fokozzák. Így például az ösztrogéneknel a 17 α -etnil csoport; progesztineknel a 19 metil csoport hiánya, $\Delta 4,9$ -kettőskötések bevitel, 17 α -metil vagy oxatiolán csoport jelenléte; androgéneknel a 17 α -metil csoport jelenléte az aktivitást és az RBA-t is növeli [74]. Ezért a receptorhoz való affinitás meghatározása valóban használható igen aktív szteroid hormonok keresésére mint szűrési módszer.

2. Agonisták és antagonisták

A receptorhoz kapcsolódó szteroidok közül nem mindegyik képes a hormonhatás kiváltására. Az öt hormonosztálynak megfelelően léteznek származékok, melyek antiösztrógen, anti-androgén, anti-progesztin, anti-mineralokortikoid és anti-glukokortikoid hatású anyagok, szteroid és nem szteroid származékok egyaránt, amelyek a hormonhatás kifejeződését — a megfelelő agonista adása esetén — kisebb-nagyobb mértékben akadályozzák.

Az anti-ösztrógenek gátolják az uterus növekedését [49, 93] és az ösztrogének egyéb hatásait is [56, 106].

Az antiandrogén ciproteron acetát, flutamid és a 17 β -hidroxi-2,2,17-trimetil-ösztra-4,9,11-trién-3-on és néhány egyéb származék a tesztoszteron propionát által indukált prosztata súlynövekedést és mitotikus aktivitás fokozódást gátolja a receptorral való kölcsönhatás révén [73, 74].

Kevés anti-progesztin aktivitású vegyületről tudunk. A gesztrinon (13-etil-17 β -hidroxi-18,19-dinorpregna-4,9,11-trién-20-in-3-on) néhány vizsgálati rendszerben mutatott antiprogesztin aktivitást, azonban ennek értékelése némileg kétséges a gesztrinon saját viszonylag nagy progesztomimetikus aktivitása miatt [75].

A spironolakton, aktív metabolitja a kanrenon és a 6-dehidrodeoxikortikoszteron acetát csökkentik az aldoszteron által indukált Na^+ -retenciót [37, 74].

Antiglukokortikoid hatású szteroidok a tirozin aminoszteroidok indukcióját gátló analógok, pl. a progeszteron, 16 α -metil-progeszteron, a kortexolon, a tesztoszteron stb. [76, 77, 81]. A progeszteron és a kortexolon antiglukokortikoid aktivitását más tesztrendszerben is sikerült kimutatni [64, 96].

Egyes szteroid származékok többféle antihormon hatást is kifejthetnek. Így a progesztinek közül több vegyület rendelkezik antiösztrogén és antiglukokortikoid, esetleg antiandrogén hatással is, míg néhány anti-mineralokortikoid hatású analóg antiandrogén hatást is mutat [75].

Bár általánosságban az agonisták nagyobb affinitással rendelkeznek a receptor iránt, mint az antagonisták, mégsem lehet szoros korrelációt megállapítani az egyensúlyi állandók értéke és a hormon vagy antihormon viselkedés között [14, 77]. Ezzel szemben elég általánosan igaznak tűnik az a megállapítás, hogy a hormon-antagonisták azon vegyületek közül kerülnek ki, amelyek a receptorral a hormonhoz képest gyorsan disszociáló komplexet képeznek, és így a receptort effektíve elvonják a hormon elől, ám nem képesek kiváltani a receptornak a sejtmagba való transzlokációját a komplex idő előtti disszociációja miatt [14, 75].

Megjegyezendő, hogy az antihormonok hatásmechanizmusa még nem tekinthető tisztázottnak. Az antiglukokortikoid hatás magyarázatára számos egyéb modell is született [14, 81]. Másfelől a progesztinek antiösztrogén hatása valószínűleg nem az ösztrogén receptorral való kölcsönhatáson, hanem az ösztrogén receptor szint regulációján keresztül valósul meg [74].

A szteroidok térszerkezete

Az utóbbi időben egyre nagyobb számban váltak ismertté különböző szteroidok kristályszerkezetére [28] és oldatbeli konformációjukra vonatkozó adatok [36]. Ezek az adatok elvi lehetőséget nyújtanak arra, hogy a szteroidok konformációja és biológiai aktivitása közötti kapcsolatot vizsgálni lehessen. Ezért az alábbiakban röviden összefoglaljuk, hogy miként befolyásolják a szteroid molekula térszerkezetét az egyes szubsztituensek.

Az atomok koordinátáinak meghatározására a röntgen és NMR vizsgálatokon kívül még egyéb lehetőségek is vannak. Nevezetesen a kötéstávolságok és kötésszögek értékén alapuló elméleti számítások [3], valamint a molekula energia minimalizálásán alapuló optimalizációs módszer [84]. E két elméleti módszer közül az első olyan méretű és olyan „feszült” molekulákra, mint a szteroidok, nem alkalmazható megfelelő pontossággal [3].

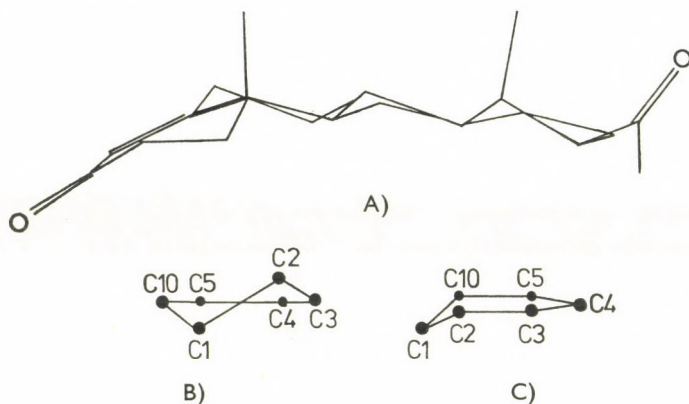
A második módszer, bár csak a relatív energiák számolására alkalmas, azonban ezekre és a molekula konformációjára nézve igen megbízható eredményeket ad. Bizonyos előnyöket még a röntgen krisztallográfiához képest is rejt ez a módszer: egyrészt nem igényli a röntgen krisztallográfia technikailag sokszor nehezen meghatározható adatait; sőt olyan molekulák esetében is használható, melyeket még meg sem szintetizáltak, de pl. biológiai szempontból érdekesek lehetnek; másrészt a kristályrács külső erőhatásokat jelent a molekula számára, melynek következtében oldatbeli szerkezete a kristályrácsban felvett szerkezettől különbözhet; végül az optimalizációs módszer lehetővé teszi a molekulászerkezet dinamikus változásainak és ezek energiaigényének tanulmányozását is, amire a röntgenszerkezet vizsgálatok — jelleghűknél fogva — nem alkalmasak [102].

Ilyen jellegű számításokat a WESTHEIMER-egyenleten alapuló GEMO-program felhasználásával egy sor szteroid esetében végeztek [27, 78].

Azokban az esetekben, amikor összehasonlítást lehetett tenni, a röntgen kristallográfiai és a geometria optimalizációval számított molekula alakok általában jól egyeztek egymással.

A 3-keto-4-en szteroidokra nézve a következő megállapítások tehetők [78, 85].

Az A gyűrű szerkezete általában az 1α -szofa és az 1α , 2β félszék struktúrák közé esik. Előbbit a C2, C3, C4, C5 és C10 atomok koplanáris helyzete jellemzi, a C1 atom a sík alatt, az alfa oldalon van. Utóbbi szerkezetben a C3, C4, C5 és C10 atomok koplanárisak, a C1 atom a sík alatt, a C2 a sík felett helyezkedik el (13. ábra) [29].



13. ábra. A progesteron térszerkezete (A); az A gyűrű félszék szerkezete (B); az A gyűrű szofa szerkezete (C)

Fig. 13. Overall shape of the progesterone skeleton (A); half-chair structure of ring A (B); sofa structure of ring A (C)

Az A gyűrű helyzete széles határok között változhat egy adott szteroid esetében is viszonylag kis energia felvételével. Így a tesztoszteron esetében a C1—C2—C3—C4 torziós szög 22° és 53° között változhat anélkül, hogy a molekula energiája 1 kcal/mol értéknél többel változna meg [20].

A B és C gyűrűk egymáshoz hasonlóan szék konformációjuk. A B gyűrű kissé laposabb a C gyűrűnél. A progesteron D gyűrűjének konformációja 13β , 14α -félszék.

A pregnán oldallánc helyzete erősen függ attól, hogy a szteroid tartalmaz-e 17-hidroxil szubsztituens, vagy sem. A 17-H származékokban a C—13—C17—C20—O20 torziós szög értéke kb. 80° , a 17—OH származékokban pedig kb. 100° , a geometria optimalizálási számítások szerint. Ezek az eredmények a röntgenkristallográfiai adatokkal ellentétben vannak, ami a kristályban fellépő intermolekuláris H-híd kötések perturbáló hatásának lehet a következménye.

A szteroid molekula görbültsége, amely az A és B—C, B—C és D, valamint az A és D gyűrűk síkjának szögével mérhető, ezenkívül a szteroid mole-

kula felszíne és térfogata (ezen belül az oldószer, azaz a víz számára hozzáférhető térfogata) lehet elsősorban fontos a receptorhoz való kapcsolódás szempontjából. A geometria optimalizálás módszerével ezeket az adatokat is meg lehet kapni, és természetesen azt is, hogy a különböző szubsztituensek hogyan befolyásolják ezeket a paraméterekeket.

A következő szubsztitúciók voltak *hatástalanok* a molekula geometria egyes összetevői paramétereire. A 16 és 17 helyen levő szubsztituensek az A gyűrű konformációját nem befolyásolták. A 11-hidroxil epimerizációja sem az A, sem a D gyűrűk konformációját nem változtatta meg. Végül a pregnán oldallánc rotációja nem járt a szteroid váz optimális geometriájának módosulásával. Egyetlen vizsgált szubsztituens sem változtatta meg szignifikánsan a B és C gyűrűk konformációját.

A $\Delta 1$ kettőskötés következtében az A gyűrű koplanáriássá válik. Ugyanakkor az A gyűrűnek az α oldal felé hajlása jelentősen megnő.

A $\Delta 16$ kettőskötés az A/B—C síkok szögét csökkentette, a B—C/D szöget növelte úgy, hogy végeredményben a szteroid váz görbülsége valamelyest csökkent.

A $\Delta 17$ kettőskötés hatására B—C/D szög növekedett. Ezenkívül a molekula térfogata csökkent, méghozzá nagyobb mértékben, mint a $\Delta 1$ vagy $\Delta 16$ származékok esetében.

A több konjugált kettőskötést tartalmazó molekulák esetén a molekulaszerkezet megnövekedett flexibilitása figyelhető meg. Ez azt jelenti, hogy a legstabilisabb konformáció környékén a konformáció-energia görbe igen lapos minimumot mutat. Elsősorban a szteroid váz görbülete változhat számottevően, a $\Delta 4,9,11$ triének kevéssé és erősen görbült konformációi közötti átmenet 2 kcal/mol-nál kevesebb energiát igényel. Ez magyarázhatja, hogy e triének jól kötődnek több különböző szteroid hormonosztály receptoraihoz is [75].

Metil szubsztituensek

A 6 α -metil csoport hatására az A/B—C szög némileg növekedett. Ugyancsak befolyásolta a szubsztituens a 17-es oldalláncnak a D gyűrűhöz viszonyított helyzetét.

A 16 α -metil szubsztituens csökkentette a 17,21-dihidroxi analógok esetén a pregnán oldallánc rotációs energiáját. Azonban a 21-deoxiszteroidok esetében függetlenül attól, hogy 17-es helyzetben van-e hidroxil csoport, a rotációs energiáját nem csökkentette, hanem ellenkezőleg, növelte. Ennek következtében a 16 α -metil analógok glukokortikoid hatékonysága 21-hidroxil an szubsztituens is tartalmazó vegyületek esetében megnövekedett, a 21-deoxalógok esetében csökkent mértékű volt.

A 16 β -metil 21-hidroxil analógok esetén az oldallánc rotációs energiáját szintén jelentősen lecsökkent, de nem emelkedett a 21-deoxiszteroidoknál sem.

A 16 α -metil csoport 16 β helyzetbe történő epimerizációja a D gyűrű konformációját a 13 β , 14 α félszék forma felé toltá el.

Végül megjegyzendő, hogy a metil szubsztituens a molekula térfogatát 16 β helyzetben 12 Å³-mal, 16 α helyzetben 15 Å³-mal és 6-os helyzetben 18 Å³-mal növelte.

A 11 α -hidroxil szubsztitúciónak a molekulaalakra alig volt hatása.

A 11 β -hidroxil hatására a szteroid váz görbülete jelentősen növekedett: mind az A/B—C, mind a B—C/D szög megnőtt. Az oldallánc helyzete csak kissé módosult.

A 17- β szubsztituens jelentősen növelte a C13—C17—C20—O20 torziós szöveget 80°-ról kb. 100°-ra. A D gyűrű konformációja a 13 β -boríték alak felé tolódott el, és az α oldal felé történő lehajlása erősen csökkent, ennek eredményeképpen a molekula teljes görbülete is mérséklődött. Viszonylag nagy volt a 11 β -hidroxil szubsztituens térfogatnövelő hatása is.

A 21-hidroxil szubsztituens hatását az oldallánc rotációjára a 16 metil szubsztituenseknél tárgyaltuk. Ezen túlmenően a 21-hidroxil hatására változott a 16 β metil csoportnak a D gyűrűhöz viszonyított helyzete. A D gyűrű konformációja a 13 β -boríték forma felé tolódott el.

A szteroid felszíne 14 Å²-tel nő a 21 hidroxil szubsztituens hatására, míg a 11 hidroxil csak 6 Å²-tel növelte a felszínt.

A receptor iránti affinitást eddig még csak kivételes esetekben sikerült térszerkezeti alapon megmagyarázni (lásd a molekula flexibilitásáról szóló részeket). Várható azonban, hogy a térszerkezetre vonatkozó ismereteink bővülésével további lényeges korrelációkat ismerünk fel a jövőben.

Következtetések

A különböző szteroidok biológiai hatásait egyes atomcsoportok jelenléte, azok egymástól való távolsága, azaz szubmolekuláris adatok, továbbá a szteroid egészének flexibilitása alapján értelmezhetjük. Ez az értelmezés feltételezi, hogy a receptor fehérjével való kölcsönhatás jellege az, ami a hormonhatást egy adott célszövetben végső soron meghatározza. A rendelkezésre álló adatok és módszerek kijelölik új szteroid alapú hatóanyagok, potenciális gyógyszerek tervezésének irányvonalait ennek az elvnek megfelelően. A szteroidok térszerkezetére és receptoraik iránti affinitásukra vonatkozó adatok felhasználásával hipotéziseket állíthatunk fel a hormon-receptor kapcsolat természetére nézve. A hormon—receptor komplexet összetartó erők pontos megismerésének elméleti jelentősége van. A szteroid hormonok hatásmechanizmusát érthetjük meg általa az eddigieknél még részletesebben és a valóságot még jobban megközelítő módon.

Összefoglalás

Öt osztályba tartozó szteroid-hormon analógok: ösztrogének, progeszti-
nek, androgének, mineralokortikoidok és glukokortikoidok — biológiai hatá-
sait tekintjük át szerkezetük függvényében. Egyes atomcsoportok jelenléte a
molekulában meghatározza, hogy az adott analóg milyen affinitással kötődik
a receptor fehérjéhez, bár ezt egyéb, a molekula egészére vonatkozó jellemzők
is befolyásolják.

A receptorhoz való affinitás pontos indikációt ad arra, hogy a molekula
milyen biológiai hatékonysággal rendelkezhet, noha az *in vivo* hatásokat

jelentősen módosíthatják a felszívódás, plazma disztribúció, metabolikus aktíválás és inaktíválás folyamatai. A szerkezet és hatás összefüggéseinek megismerése — elméleti értékén túl — új, hatékony analógok tervezését, célzott előállítását teheti lehetővé a jövőben.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a Számítógépes Hatóanyagtervezési Társaság támogatásával készült.

IRODALOM

1. AHMAD, P. and MELLORS, A. (1976) Glucocorticoid potency and parachor. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 19—28.
2. ALBERTI, K. and SHARP, G. (1970) Identification of four types of steroids by their interaction with mineralocorticoid receptors in the toad bladder. *J. Endocr.*, **48**, 565—571.
3. ALLINGER, N. L., TRIBBLE, M. T. and YUH, Y. (1975) Androsterone. The structure by force-field calculations. *Steroids*, **26**, 398—406.
4. ANDERSON, K. M. and LIAO, S. (1968) Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. *Nature*, **219**, 277.
5. ARÁNYI, P. (1979) Kinetics of the glucocorticoid hormone-receptor interaction. False association constants determined in slowly equilibrating systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **584**, 529—537.
6. ARÁNYI, P. (1980) Kinetics of the hormone-receptor interaction. Competition experiments with slowly equilibrating ligands. *Biochim. Biophys. Acta*, **628**, 220—227.
7. ARÁNYI, P. and NÁRAY, A. (1980) Physicochemical characterization of the cytosol glucocorticoid receptors in various lymphoid tissues. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **15**, 185—198.
8. ARÁNYI, P. and QUIROGA, V. (1980) Determine rate constants of interaction of steroid receptors with non-labelled ligands. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 1167—1172.
9. ARIENS, E. J. (1969) Modulation of pharmacokinetics by modification of the various factors involved. *Farm. Ed. Sci.*, **24**, 3—102.
10. ASHBURNER, M., CHIHARA, C., MELKER, P. and RICHARDS, G. (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 655—662.
11. BARDIN, C. W., BULLOCK, L. P., MILLS, N. C., LIN, Y. C. and JACOB, S. T. (1978) The role of receptors in the action of androgens. In: MALLEY, B. W. O. and BIRNBAUMER, L. (eds.): *Receptors and hormone action*. 83—103.
12. BAXTER, J. D. and TOMKINS, G. M. (1970) The relationship between glucocorticoid binding and tyrosine aminotransferase induction in hepatoma tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **65**, 709—715.
13. BAXTER, J. D. and TOMKINS, G. M. (1970) Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 932—937.
14. BELL, P. A. and JONES, T. R. (1979) Interactions of glucocorticoid agonists and antagonists with cellular receptors. In: AGARWAL, M. K. (ed.): *Antihormones*. Elsevier-North-Holland Biomed. Press, 35—50.
15. BLANFORD, A. T., WITTMAN, W., STROUPE, S. D. and WESTPHAL, V. (1978) Steroid-protein interactions. XXXVIII. Influence of steroid structure on affinity to the progesterone binding globulin. *J. Steroid Biochem.*, **2**, 187—201.
16. BONNE, C. and RAYNAUD, J. P. (1975) Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids*, **26**, 227—232.
17. BORQUIN, D., AZADIAN-BOULANGER, G., PHILIBERT, D. and RAYNAUD, J. P. (1970) 3rd Int. Congr. Hormonal Steroids (Hamburg). *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, **210**, 151—152.
18. BOUTON, M. M. and RAYNAUD, J. P. (1977) The relevance of kinetic parameters in the determination of specific binding to the estrogen receptor. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 9—15.

19. BROEK, v. d., A. J., BROESS, A. I. A., HEUREL, v. d. M. J., JONGH, de H. P., LEEHUIS, J., SCHÖNEMANN, K. H., SMITS, J., VISSER, de J., VLET, van N. P. and ZEELLEN, F. J. (1977) Strategy in drug research. Synthesis and study of the progestational and ovulation inhibitory activity of a series of 11 beta-substituted-17 alfa-ethynyl-4-estren-17-beta-ols. *Steroids*, **30**, 481—510.
20. BUCOURT, R., COHEN, N. C. and LEMOIN, G. (1975) Nature quasi-trans ou quasi-cis de la fusion de deux cycles important un atome trigonal á la jonction. *Bull. Soc. Chim. France*, **3—4**, 903—907.
21. CHOTHIA, C. (1974) Hydrophobic binding and accessible surface area in proteins. *Nature*, **248**, 338—339.
22. CHRISTAKOS, N. (1981) Studies on the mode of action of calciferol. XXIX. Biochemical characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in chick pancreas and kidney cytosol. *Endocrinology*, **108**, 140.
23. CLARK, J. H., PASZKO, Z. and PECK, E. J. JR. (1977) Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex: relation to the agonistic and antagonistic properties of estriol. *Endocrinology*, **100**, 91—96.
24. CLAUBERG, C. (1930) Zur Physiologie und Pathologie der Sexualhormone in besonderen des Hormons des Corpus Luteum. 1-Mitt: der biologische test für das Luteohormon (das spezifische Hormon des Corpus Luteum) am infantilen Kaninchen. *Zbl. Gyn.*, **54**, 2757—2770.
25. CRABBÉ, J. (1977) The mechanism of action of aldosterone. In: PASQUALINI, J. R. (ed.): *Receptors and mechanism of action of steroid hormones*. Marcel Dekker Inc., New York, 513—568.
26. DAUSSE, J. P., DUVAL, D., MEYER, P., GAIGNAULT, J. C., MARCHANDEAU, C. and RAYNAUD, J. P. (1977) The relationship between glucocorticoid structure and effects upon thymocytes. *Mol. Pharmacol.*, **13**, 948—955.
27. DELETTRE, J., MORNON, J. P., LEPICARD, G., OJASOO, T. and RAYNAUD, J. P. (1980) Steroid flexibility and receptor specificity. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 45—59.
28. DUAX, W. L. and NORTON, D. A. (1975) *Atlas of steroid structure*. Vol. I. Plenum Press, New York
29. DUAX, W. L., WEEKS, C. M. and ROHRER, D. C. (1976) Crystal structure of steroids: molecular conformation and biological function. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **32**, 81.
30. EDELMAN, I. S. (1975) Mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem.*, **6**, 147—159.
31. FANG, S. and LIAO, S. (1971) Androgen receptors. Steroid and tissue-specific retention of a 17 beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate. *J. Biol. Chem.*, **246**, 16—24.
32. FELDMAN, D., CONROPMITREE, C. (1976) Intrinsic mineralocorticoid agonist activity of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Clin. Invest.*, **57**, 1—7.
33. FLORINI, J. R., SMITH, L. L. and BUYSKE, D. A. (1961) Metabolic fate of a synthetic corticosteroid (triamcinolone) in the dog. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1038—1042.
34. FOTHERBY, K. and JAMES, F. (1972) Metabolism of synthetic steroids. *Adv. Steroid Biochem. Pharmacol.*, **3**, 67—165.
35. FUNDER, J. W., FELDMAN, D., HIGHLAND, E. and EDELMAN, I. S. (1974) Molecular modifications of anti-aldosterone compounds: effects on affinity of spiroactones for renal aldosterone receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1493—1501.
36. GENARD, P. (1979) Effets de solvant aromatique en resonance magnetique protonique des steroïdes hydroxyles. *Org. Mag. Res.*, **12**, 396—398.
37. GENARD, P. and PALEM-VLIERS, M. (1980) Structure-activity relationships for agonistic and antagonistic mineralocorticoids. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 1299—1305.
38. GLENN, E. M., STAFFORD, R. O., LYSER, S. C. and BOWMAN, B. J. (1957) Relation between biological activity of hydrocortisone analogues and their rates of inactivation by rat liver enzyme systems. *Endocrinology*, **61**, 128—142.
39. GORSKI, J. and CANNON, F. (1976) Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 425.
40. HANSSON, V., TRYGSTAD, O., FRENCH, F. S., MCLEAN, W. S., SMIT, A. A., TYNDALL, D. J., WEDDINGTON, S. C., PETRUSZ, P., NAYFEH, S. N. and RITZÉN, E. M. (1974) Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. *Nature*, **250**, 387.
41. HARMON, J. M., SCHMIDT, T. J. and THOMPSON, E. B. (1981) Deacylcortivazol acts through glucocorticoid receptors. *J. Steroid Biochem.*, **14**, 273—279.
42. HELLER, G. G., MOORE, D. J., PAULSON, C. A., NELSON, W. O. and LAIDLAW, W. M. (1959) Effects of progesterone and synthetic progestins on the reproductive physiology of normal men. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 1057—1065.

43. HERSHBERGER, L. G., SHIPLEY, E. G. and MEYER, R. K. (1953) Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator any muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 175—180.
44. HERZ, J. E., FRIED, J. and SZABO, E. F. (1956) 12-alfa-halo derivatives of 11 beta-hydroxyprogesterone. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2017—2018.
45. HÄHNEL, R., TWADDLE, E. and RATAJCZAK, T. (1973) The specificity of the estrogen receptor of human uterus. *J. Steroid Biochem.*, **4**, 21—31.
46. JANIN, J. and CHOTHIA, C. (1976) Stability and specificity of protein-protein interactions: the case of the trypsin-trypsin inhibitor complexes. *J. Mol. Biol.*, **100**, 197—211.
47. JONES, T. R., SLOMAN, J. C. and BELL, P. A. (1979) Competitive binding studies with glucocorticoid receptors from rat thymus cells: differential temperature dependence of steroid binding. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **13**, 83—92.
48. KATZENELLENBOGEN, J. A., JOHNSON, H. J., JR. and NYERS, H. N. (1973) Photoaffinity labels for estrogen binding proteins of rat uterus. *Biochemistry*, **12**, 4085—4092.
49. KATZENELLENBOGEN, B. S. and FERGUSON, E. R. (1975) Antiestrogen action in the uterus: biological ineffectiveness of nuclear bound estradiol after antiestrogen. *Endocrinology*, **97**, 1—12.
50. KATZENELLENBOGEN, B. S. and GORSKI, J. (1975) Estrogen action on syntheses of macromolecules in target cells. In: LITWACK, G. (ed.): *Biochemical actions of hormones*. Vol. III. Academic Press, New York, 187—243.
51. KATZENELLENBOGEN, B. S., KATZENELLENBOGEN, J. A., FERGUSON, E. R. and KRAUTHAMMER, N. (1978) Anti-estrogen in reaction with uterine estrogen receptors. *J. Biol. Chem.*, **253**, 697—707.
52. KATZENELLENBOGEN, B. S., KATZENELLENBOGEN, J. A., ECKERT, R. L., HAYES, J. R., ROBERTSON, D. W., TATEE, T. and TSAI, T. S. (1980) Antiestrogen action in estrogen target tissues: receptor interaction and antiestrogen metabolism. In: JACOBELLI, S., LINDNER, H. R. and LIPPMAN, M.E. (eds.): *Hormones and cancer*. Raven Press, New York, 309—320.
53. LEAVITT, W. W., CHEN, T. J., DO, Y. S., CARLTON, B. D. and ALLEN, T. C. (1978) Biology of progesterone receptors. In: O'MALLEY, B. W. and BIRNBAUMER, L. (eds.): *Receptors and hormone action*. Vol. II. Acad. Press, New York, 157—188.
54. LIAO, S., LIANG, T., FANG, S., CASTANEDA, E. and SHAO, T. C. (1973) Steroid structure and androgenic activity. Specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6154—6162.
55. LIAO, S. (1977) Molecular actions of androgens. In: LITWACK, G. (ed.): *Biochemical actions of hormones*. Vol. IV. Academic Press, New York 351—406.
56. LIPPMAN, M. E. and BOLAN, G. (1976) Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature*, **256**, 592—593.
57. LUDENS, J. H. and FANESTIL, D. D. (1976) The mechanism of aldosterone function. *Int. Encycl. Pharmacol. Ther.*, **2**, Part B, 371—412.
58. MACDONALD, R. G. and CIDLOWSKI, J. A. (1979) Alterations in specificity of the glucocorticoid receptor with temperature in rat splenic lymphocytes. *J. Steroid Biochem.*, **10**, 21—29.
59. MAINWARING, W. I. P. and MANGAN, F. R. (1973) A study of the androgen receptors in a variety of androgen sensitive tissues. *J. Endocrinol.*, **59**, 121—139.
60. MARVER, D. and EDELMAN, I. S. (1978) Dihydrocortisol: a potential mineralocorticoid. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 1—7.
61. MCGUIRE, J. L. and DEDELLA, D. (1971) *In vitro* evidence for the progesterone receptor in the rat and rabbit uterus. *Endocrinology*, **88**, 1099—1103.
62. MCGUIRE, J. L., BARISO, C. D. and SHROFF, A. P. (1974) Interaction between steroids and a uterine progesterone specific binding macromolecule. *Biochemistry*, **13**, 319—322.
63. MOCULEWSKY, M. and RAYNAUD, J. P. (1976) Un modèle d'étude des antimineralocorticoides: la peau de grenouille. *J. Pharmacol.*, **7**, 211—222.
64. MOSHER, K. M., YOUNG, D. A. and MUNCK, A. (1971) Evidence for irreversible, actinomycin D-sensitive and temperature sensitive steps following binding of cortisol to glucocorticoid receptors and preceding effects on glucose metabolism in rat thymus cells. *J. Biol. Chem.*, **246**, 654—659.
65. MUNCK, A. and LEUNG, K. (1977) Glucocorticoid receptors and mechanism of action. In: PASQUALINI, J. R. (ed.): *Receptors and mechanism of action of steroid hormones*. Marcel Dekker Inc., New York, 311—397.
66. OJASOO, T. and RAYNAUD, J. P. (1978) Unique steroid congeners for receptor studies. *Cancer Res.*, **38**, 4186—4198.

67. PRATT, W. B., KAINE, J. L. and PRATT, D. V. (1975) Kinetics of glucocorticoid binding to soluble specific binding protein of mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4584—4591.
68. RAYNAUD, J. P. (1973) Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids*, **21**, 249—258.
69. RAYNAUD, J. P., BOUTON, M. M., GALLET-BOURQUIN, D., PHILIBERT, D., TOURNEMINE, C. and AZADIAN-BOULANGER, G. (1973) Comparative study of estrogen action. *J. Mol. Pharmacol.*, **2**, 520—533.
70. RAYNAUD, J. P. (1977) Une stratégie de recherche pour les hormones de synthèse: leurs interactions avec les récepteurs hormonaux. *Actual. Pharmacol.*, **29**, 49—64.
71. RAYNAUD, J. P. (1977) R5020, a tag for the progestin receptor. In: MCGUIRE, W. L., RAYNAUD, J. P. and BAULIEN, E. E. (eds.): *Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues*. Raven Press, New York, 9—21.
72. RAYNAUD, J. P., AZADIAN-BOULANGER, G., BONNE, C., PEROUNET, C. and SZKIZ, E. (1977) Present trends in anti-androgen research. In: MARTINI, L. and MOTTA, M. (eds). *Androgens and antiandrogens*. Raven Press, New York, 281.
73. RAYNAUD, J. P. (1979) The mechanism of action of antihormones. In: JACOB, J. (ed.): *Advanced Pharmacological Theratology*, Vol. I. Pergamon Press, New York, 259—278.
74. RAYNAUD, J. P., OJASOO, T., BOUTON, N. M. and PHILIBERT, D. (1979) Receptor binding as a tool in the development of new bioactive steroids. In: *Drug design*. Vol. 3. Academic Press, New York, 169—214.
75. RAYNAUD, J. P., BOUTON, M. M. and OJASOO, T. (1980) The use of interaction kinetics to distinguish potential antagonists from agonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 324—327.
76. ROUSSEAU, G. G., BAXTER, J. D. and TOMKINS, G. M. (1972) Glucocorticoid receptors: relations between steroid binding and biological effects. *J. Mol. Biol.*, **67**, 99—115.
77. ROUSSEAU, G. G. and SCHMIT, J. P. (1977) Structure-activity relationships for glucocorticoids. I. Determination of receptor binding and biological activity. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 911—919.
78. ROUSSEAU, G. G. and SCHMIT, J. P. (1978) Glucocorticoid activity and steroid structure: a new look. In: BELL, P. A. and BORTHWICK, N. M. (eds.): *Glucocorticoid action and leukaemia*. Alpha Omega Publishing LTD, Cardiff, 23—35.
79. RUBIN, B. L., DORFMAN, A. S., BLACK, L. and DORFMAN, R. I. (1951) Bioassay of estrogens using the mouse uterine response. *Endocrinology*, **49**, 429—439.
80. SAIDUDDIN, S. and ZASSENHAUS, H. P. (1977) Estradiol-17beta receptors in immature rat ovary. *Steroids*, **29**, 197—213.
81. SAMUELS, H. H. and TOMKINS, G. M. (1970) Relation of steroid structure to enzyme induction in hepatoma tissue culture cells. *J. Mol. Biol.*, **52**, 57—74.
82. SAR, M. and STUMPF, W. E. (1973) Cellular and subcellular localization of ³H-progesterone or its metabolites in the oviduct, uterus, vagina and liver of the guinea pig. *Endocrinology*, **94**, 1116—1125.
83. SCHIMKE, R. T., RHOADS, R. E., PALACIOS, R. and SULLIVAN, D. (1973) Ovalbumin mRNA, complementary DNA and hormone regulation in chick oviduct. In: DICZFALUSSY, E. (ed.): *Protein synthesis in reproductive tissue*. 6th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Bogtrykkeriet Forum Press, Copenhagen, 357—375.
84. SCHMIT, J. P. and ROUSSEAU, G. G. (1977) Structure-activity relationships for glucocorticoids. II. Theoretical approach of molecular structures based on energy optimisation of a Westheimer model. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 921—928.
85. SCHMIT, J. P. and ROUSSEAU, G. G. (1979) Structure and conformation of glucocorticoids. In: BAXTER, J. D. and ROUSSEAU, G. G. (eds.): *Glucocorticoid hormone action*. Springer-Verlag, Berlin, 79—95.
86. SCHMIT, J. P., QUIVY, J. I. and ROUSSEAU, G. G. (1980) The androgen receptor binding site: a conformational study of steroids in relation with their affinity I. Interaction with the D-ring. *Steroid Biochem.*, **13**, 1387—1394.
87. SHUTT, D. A. and COX, R. I. (1972) Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *J. Endocrinol.*, **52**, 299—310.
88. SIMONS, S. S. JR., THOMPSON, E. B. and JOHNSON, D. F. (1979) Anti-inflammatory pyrazolosteroids: potent glucocorticoids containing bulky A-ring substituents and no C-3 carbonyl. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **86**, 793—800.
89. SMITH, H. E., SMITH, R. G., TOFT, D. O., NEERGAARD, J. R., BURROWS, E. P. and O'MALLEY, B. W. (1974) Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5924—5932.
90. SUGDEN, S. (1924) *J. Chem., Soc.*, **125**, 1177—1189.

91. SWANECK, G. E., HIGHLAND, E. and EDELMAN, I. S. (1969) Stereospecific nuclear and cytosol aldosterone-binding proteins of various tissues. *Nephron*, **6**, 297—316.
92. TALWAR, G. P., JAILKHANI, B. L., NARAYANAN, P. R. and NARASIMHAN, C. (1973) Oestrogen induced synthesis of a protein in avian liver. In: DICZFALUSSY, E. (ed.): *Protein synthesis in reproductive tissue*. 6th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Bogtrykkeriet Forum Press, Copenhagen, 341—351.
93. TERENIUS, L. (1971) Structure-activity relationships for anti-oestrogens with regard to interaction with 17 betaestradiol in the mouse uterus and vagina. *Acta Endocrinol.* (Copenhagen), **66**, 431—447.
94. TOFT, D. O. and O'MALLEY, B. W. (1972) Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. *Endocrinology*, **90**, 1041—1045.
95. TOMKINS, G. M. and MICHAEL, P. J. (1957) The enzymic reduction of Δ^4 -3-ketosteroids. *J. Biol. Chem.*, **225**, 13—24.
96. TURNELL, R. W., KAISER, N., MILHOLLAND, R. J. and ROSEN, F. (1974) Glucocorticoid receptors in rat thymocytes. Interactions with the antiglucocorticoid cortexolone and mechanism of its action. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1133—1138.
97. YOUNG, H. A., SCOLNICK, E. M. and PARKS, W. P. (1975) Glucocorticoid-receptor interaction and induction of mammary tumor virus. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3337—3343.
98. WATANABE, H., ORTH, D. N. and TOFT, D. O. (1973) Glucocorticoid receptors in pituitary tumor cells. I. Cytosol receptors. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7625—7630.
99. WEEKS, DUAX, W. L. and WOLFF, M. E. (1973) A comparison of the molecular structures of six corticosteroids. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2865—2868.
100. WILSON, E. M. and FRENCH, F. S. (1976) Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis and prostate. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5620—5629.
101. WITTLIFF, J. L., MEHTA, R. G., BOYD, P. A. and GORAL, J. E. (1977) Steroid-binding proteins of the mammary gland and their clinical significance in breast cancer. *J. Toxicol., Environ. Health.*, Suppl. **1**, 231—236.
102. WOLFF, M. E. and HANSCH, C. (1973) Correlation of physicochemical parameters and biological activity in steroids.
103. WOLFF, M. E., BAXTER, J., KOLLMAN, P. A., LEE, D. L., KUNTZ, I. D., BLOOM, E., MATULICH, D. and MORRIS, J. (1978) Nature of steroid-glucocorticoid receptor interactions: thermodynamic analysis of the binding reaction. *Biochemistry*, **17**, 3201—3208.
104. WOLFF, M. E. (1979) Structure-activity relationships in glucocorticoids. In: BAXTER, J. D. and ROUSSEAU, G. G. (eds): *Glucocorticoid hormone action*. Springer-Verlag, Berlin, 97—107.
105. ZAKÁR, T. and TÓTH, M. (1980) Studies on the androgen receptor of the rat seminal vesicle: comparison of the binding characteristics of dihydrotestosterone and testosterone. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 743—750.
106. ZAVA, D. T., CHAMNESS, G. C., HORWITZ, K. B. and MCGUIRE, W. L. (1977) Human breast cancer: biologically active estrogen receptor in the absence of estrogen? *Science*, **196**, 663—664.

RELATION OF STEROID STRUCTURE TO HORMONE EFFECTS

Arányi, P.

2nd Institute of Biochemistry, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary

Biological responses to steroids belonging to five hormone classes, those of estrogens, progestins, androgens, mineralocorticoids and glucocorticoids are reviewed with specific attention to the structure dependence.

Presence of certain groups in the molecule determines the affinity of the analogue for the receptor protein, albeit other features of the molecule as a whole also modulate binding.

Affinity of an analogue indicates the possible biological efficacy of the molecule. However, *in vivo* effects may be strongly influenced by uptake, plasma distribution, metabolic activation and inactivation.

Understanding of the structure activity relationships in the family of steroids has a considerable theoretical value and, besides, it may allow us to design and manufacture new potent analogues in the future.

KÍSÉRLETEK TERVEZÉSE REGRESSZIÓS MÉRÉSEK ESETÉN

KANYÁR BÉLA és TORNÓCI LÁSZLÓ

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítástechnikai Csoport, Budapest

Beérkezett: 1982. január 4-én

Kulcsszavak: regresszió, paraméterbecslés, kísérlettervezés, kinetikai függvények, D-optimalis, izninformációs görbék

Bevezetés

A kísérleti vizsgálat — pl. a görbe vonalakkal leírható, ún. regressziós mérés — esetén, és az azt követő adatelemzés során is, rendszerint a lehető legtöbb információt kívánjuk megszerezni a vizsgált jelenségről. Így a MICHAELIS — MENTEN-féle kötéskinetikában általában a MICHAELIS-állandónak (a K_M -nek) a minimális hibával történő meghatározására törekszünk, a radioimmun vizsgálatokban pedig a kalibrációs görbét kívánjuk a lehető legpontosabban megadni. A kísérlet, ill. a mért adatokból számolt mennyiségek hibájának csökkentésére kézenfekvő és hatékony eljárás a mérési pontosság és/vagy a mért pontok számának növelése.

Az információnövelés harmadik és eddig kevésbé vizsgált lehetősége a mérési pontok optimális kiválasztása az adott cél érdekében. Belátható, hogy egy egyenes meredekségének meghatározottsága nemcsak a mérés pontosságától, a pontok számától, hanem a pontok elhelyezkedésétől is függ. Amennyiben a pontok nagy része a mérési tartomány közepén van, s csak egy-kettő a szélén, úgy a meredekség hibája nagyobb, mint fordítva. Természetesen az utóbbi lehetőség rendszerint kevésbé látványos és kevésbé hatékony meghatározottságot eredményez, mint pl. a mérési hiba jelentős csökkentése. Viszont a pontok optimális elosztásához elsősorban az egyre olcsóbbá váló számolási kapacitás szükséges, miközben a legtöbb vizsgálat során akár a pontok|számának növelése, akár a mérési hiba csökkentése fokozott költségnövekedést jelent.

Jelen munkánk célja a regressziós kísérlettervezés matematikai módszereinek bemutatásán túlmenően néhány eredmény és azok alkalmazhatóságának ismertetése. A matematikai igényű függelékben fogalmak definiálása, bizonyítás és számolási eljárás található a módszerek további alkalmazhatóságának megkönnyítésére. Arra törekedtünk viszont, hogy a függelék nélkül is érthető legyen a munka.

A kísérlettervezés matematikai megfogalmazása, kritériumai

A görbe vonalakkal leírható mérési eredmények analízise során rendszerint a görbék, ill. a biológiai jelenség (a modell) paraméterei érdekelnek, ezek értékéből kívánunk következtetést levonni. A paraméterek meghatározására, becslésére felhasználható a maximum likelihood módszer, ami a gyakorlati

esetek közel 100%-ában a súlyozott legkisebb négyzetek módszeréhez vezet [1, 3]. E módszerek segítségével számolható a paraméterek és a mérési függvény hibája is.

Az $y = mx + b$ egyenes — azaz lineáris regresszió — esetén ismeretes, hogy az m meredekség értékét és hibáját — állandó, x -től független mérési hiba esetén — a következő összefüggések adják:

$$m = \frac{\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i / N}{\sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2 / N} \quad (1)$$

$$s_m^2 = \frac{s^2}{\sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2 / N}, \quad (2)$$

ahol: y_i az x_i -hez tartozó mért érték, N a mérési pontok száma, s a mérés és s_m a meredekség szórásának becslése.

Belátható, hogy a meredekség szórása (s_m) akkor lesz a legkisebb, ha pontjaink a szóba jöhető mérési tartomány két szélén — fele-fele arányban megosztva — helyezkednek el. Amennyiben pedig a b tengelymetszetet kívánjuk meghatározni, akkor $x = 0$ az optimális pont, hiszen akkor magát a b értékét mérjük.

A fenti példában a vizsgálat tárgya az egyenes paraméterének hibája, illetve a hiba csökkentése volt a tervezés kritériuma. Általános esetben, ha a tervezéssel a paraméterek hibáját kívánjuk csökkenteni, akkor *D-optimális* kísérlettervről beszélünk [7, 9]. Matematikai fogalmakkal, a *D-optimális* tervezés esetén célunk a paraméterek hibájára jellemző diszperziós mátrix determinánsának csökkentése, s ami ezzel ekvivalens, az ún. FISHER-féle információs mátrix determinánsának növelése [7]. Amennyiben az y mérési függvény hibájának a csökkentése a fontos, akkor használhatunk *G-optimális* vagy *Q-optimális* tervezési kritériumot [7]. A *G-optimális* tervezés kritériuma az y -érték maximális hibájának csökkentése, ezért *minimax*-tervezés elnevezéssel is találkozunk. A *Q-optimális* kritériumnál pedig az y érték hibájának a mért tartományban vett összege (pontosabban integrálja) a minimalizálandó mennyiség. A fentiekén kívül még többféle szempont figyelembevétele, s így matematikailag is többféle kritérium felállítása lehetséges (l. Függelék a) pont). A szempontok egy része gyakorlatilag ugyanarra az eredményre vezet. Pl. bebizonyítható, hogy a *D-optimális* és a *minimax-tervezés* normális eloszlású mérési hiba mellett ekvivalens [7].

Mivel az információs mátrixnak rendszerint kitüntetett szerepe van, ezért megadjuk a meghatározását is. Egy általános $f(x, p)$ mérési függvény esetén a mátrix egy eleme a következő:

$$M_{jk} = \sum_i w_i \frac{\partial f_i}{\partial p_j} \frac{\partial f_i}{\partial p_k} \quad (i = 1, 2, \dots, N; \quad j, k = 1, 2, \dots, n), \quad (3)$$

ahol: $\frac{\partial f_i}{\partial p_j}$ az f mérési függvény j -ik paramétere szerinti parciális differenciálhá-

nyadosa az x_i pontban, w_i súlytényező az x_i pontban, n a paraméterek száma és N a mérési pontok száma. A definícióból következik, hogy az M mátrix szimmetrikus, azaz $M_{jk} = M_{kj}$.

Például az $f = p_1x + p_2$ egyenes és $w_i = 1$ esetén $\frac{\partial f_i}{\partial p_1} = x_i$ és $\frac{\partial f_i}{\partial p_2} = 1$, az információs mátrix pedig a következő lesz:

$$M = \begin{bmatrix} \sum_i x_i^2 & \sum_i x_i \\ \sum_i x_i & N \end{bmatrix}. \quad (4)$$

A fenti kétdimenziós esetben a determináns is könnyen számolható, mégpedig

$$\det(M) = N\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2.$$

Paraméterekben lineáris $f(x, p)$ függvény esetén az M információs mátrix független a p paraméterektől. Viszont nem lineáris kapcsolat — pl. exponenciális függvény — esetén az M a paraméterértékektől is függ, s így a tervezést befolyásolja, meghatározza a paraméterek értéke.

Több paraméter esetén előfordul, hogy közülük csak egynek vagy néhány-
nak kívánjuk meghatározni az értékét. Pl. exponenciális függvény esetén a felezési idő elsődleges lehet a kezdeti értékkel szemben. Ez a megkülönböztetés módosíthatja a tervezés információs mátrixát, és így az eredményeket is [8, 10].

Az eddigiekből látszik, hogy a kísérlettervezés matematikai módszerével nem a mérés hibáját (pl. a mért y_i érték szórását), hanem az adatokból számolt (becsült) mennyiségek hibáját lehet csökkenteni. Tehát, ha a kívánt mennyiséget közvetlenül mérni tudjuk — nem kell számolni, becsülni, interpolálni, ill. extrapolálni —, akkor nincs értelme mérési tartományról és ezen belüli x_i érték beállításáról beszélni. A mérési függvény hibájának csökkentése is elsősorban akkor fontos, amikor interpolálni és extrapolálni kell (pl. görbe alatti terület meghatározásához).

A becsült mennyiség hibájának csökkenésétől azt várjuk, hogy a becsült érték is közelebb lesz a valódihoz, és összehasonlító vizsgálatok esetén a kisebb hiba következtében gyengébb változások, kisebb hatások is kimutathatók lesznek.

Tervezési eredmények néhány, a biológiában alkalmazott függvény esetén

Paraméterekben lineáris mérési függvény esetén — mint azt az első pontban láttuk — az optimális mérési pontok a tartomány két szélén vannak, amennyiben a mérés pontossága állandó, független az x -től. Ha a mérési hiba és a szórásnégyzet (σ^2) reciproka — a w_i súlytényező — függ a mérés helyétől, úgy már más eredményt kaphatunk. Belátható, hogy ha σ^2 az $y = mx + b$ érték köbével arányos — azaz $w_i = 1/(mx_i + b)^3$ —, akkor a két optimális pont (x_1 és x_2) közötti kapcsolat: $(x_2 - 3x_1)m = 2b$. Igaz, mérésnél köbös arányú hibaváltozás ritkán fordul elő, de transzformációk során — pl. a MICHAELIS-MENTEN kinetikánál a LINEWEAVER-BURK-féle kiegyenesítéssel — felléphet ilyen fokú hibafüggés.

A biológiai (biofizikai, biokémiai stb.) vizsgálatokban gyakran szerepelnek exponenciális, hiperbola és szigmoid alakú mérési függvények. Ezek esetén kapott eredményeket közöljük a következőkben.

Exponenciális függvények

Az $f(t) = A \cdot \exp(-\lambda t)$ alakú egytagú exponenciális függvény esetén az A és λ (ill. $T = 0,693/\lambda$ szerint a T felezési idő) paraméterek. Tehát legalább két mérés szükséges, hogy a két paraméter értékét számolni lehessen. Ekkor Box és Lucas [2] D -optimális számításai szerint, állandó mérési hiba ($\sigma = \text{áll.}$) esetén az optimális mérési pontok: $t_1 = t_0$ és $t_2 = t_0 + 1/\lambda$, ahol t_0 a mérési tartomány legkisebb t értéke. Saját vizsgálatainkban figyelembe vettük a hiba változását is. Ugyanis a biológiában gyakran mérünk állandó relatív hibával ($\sigma/f = \text{áll.}$), másrészt — különösen a radioaktivitás mérésénél — ún. gyökös hiba ($\sigma/\sqrt{f} = \text{áll.}$) is előfordul.

Az I. táblázatban található optimális pontok értékét olyan esetben is meghatároztuk, amikor a λ paramétert elsődlegesnek tekintettük az A -paraméterrel szemben.

I. táblázat

*A D-optimális pontok (t_1 és t_2) egytagú exponenciális kifejezés esetén a mérési hiba jellegének függvényében**

Table 1. D-optimal points (t_1 and t_2) in case of one-term exponential function depending on type of data error. The minimal t -value is $t_1 = 0$

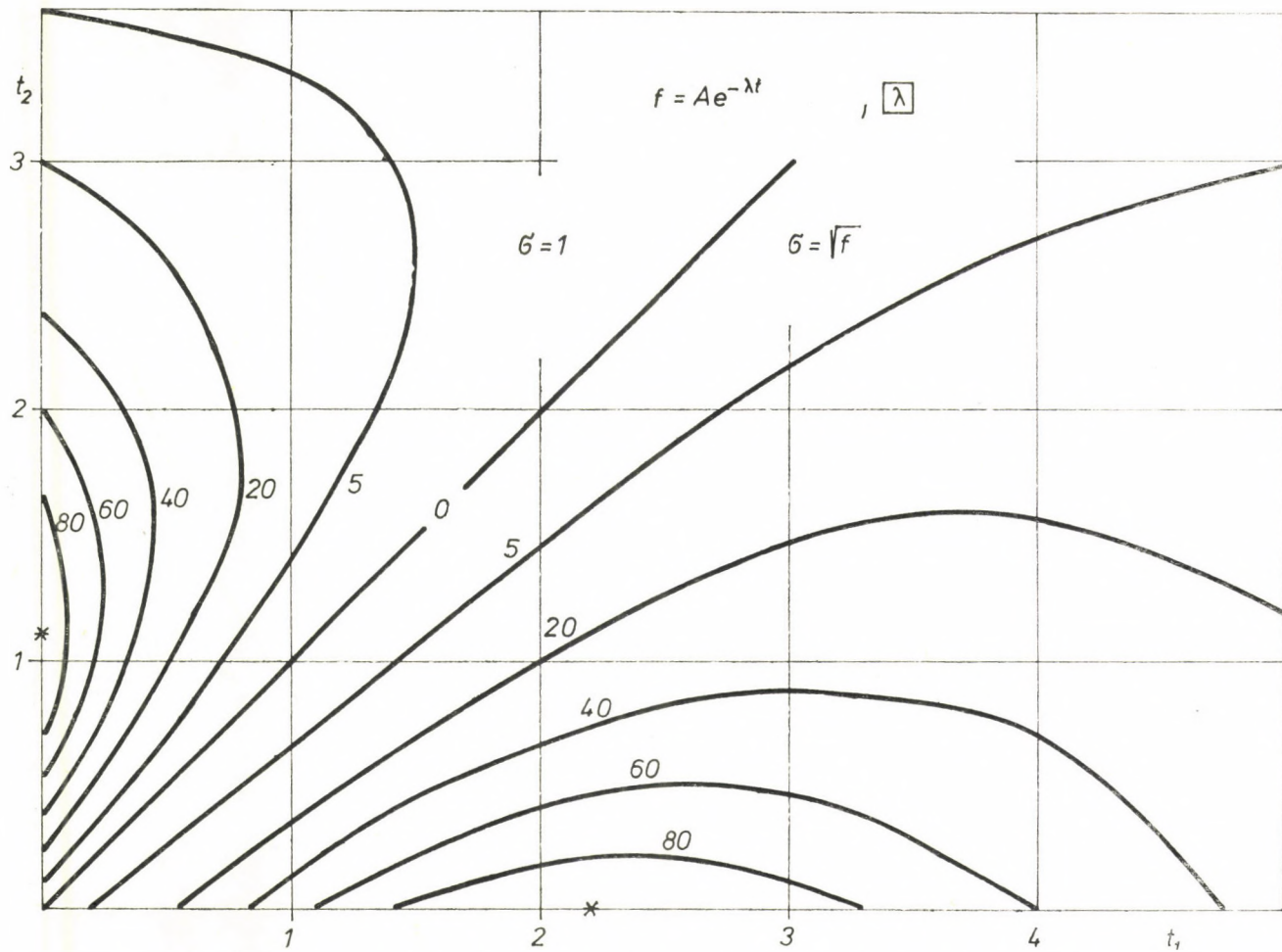
$f = Ae^{-\lambda t}$	$\sigma = \text{áll.}$		$\sigma \sim \sqrt{f}$		$\sigma \sim f$	
	t_1	t_2	t_1	t_2	t_1	t_2
Nincs elsődleges paraméter	0	$1/\lambda$	0	$2/\lambda$	0	$\max(t)$
λ elsődleges	0	$1,1/\lambda$	0	$2,2/\lambda$	0	$\max(t)$

* Itt feltettük, hogy a legkisebb t értéke $t_1 = 0$.

A táblázat szerint a második optimális pont (t_2) elsősorban a mérési hiba jellegétől és kevésbé a λ paraméter elsődlegességétől függ. A $\max(t)$ azt jelenti, hogy a mérési tartomány „felső” határpontján kell mérni. Belátható az is, hogy újabb mérési pontok esetén ezeken a helyeken kell ismételni; páros számú pontnál fele-fele arányban megosztva, páratlanoknál pedig mindegy, hogy páratlan pontként a t_1 -t vagy a t_2 -t választjuk.

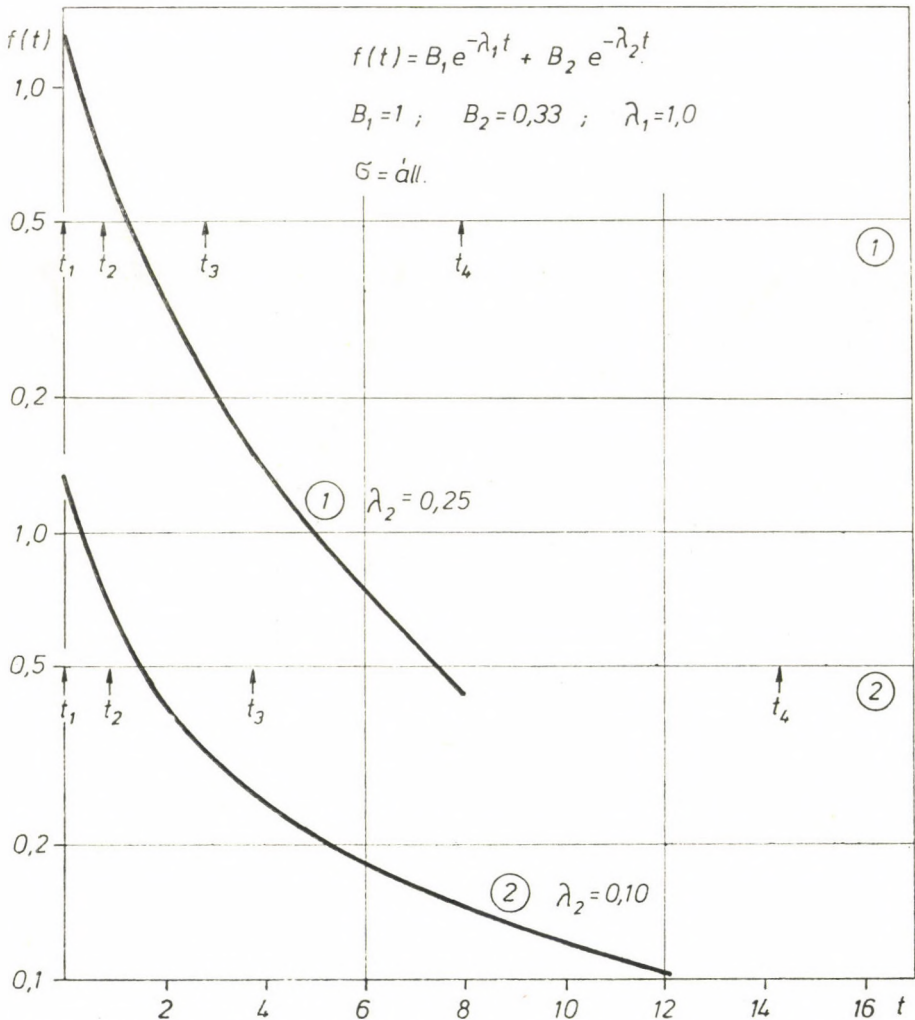
Előfordul, hogy a statisztikai szempontból optimális mérési pontok más, pl. költség, kockázat stb. szempontjából kevésbé előnyösek. Ilyenkor az információs mátrix determinánsának értékét szinte minden szóba jöhető mérési fel-tétel mellett célszerű ismerni. Amennyiben az azonos determináns értékű pontokat összekötjük, kapjuk az ún. izoinformációs görbéket [10]. Az I. ábrán látható görbéket (szintvonalakat) az $f = A \exp(-\lambda t)$ függvény esetén, két (t_1 és t_2) mérési pontot feltételezve, $A = \lambda = 1$ mellett kaptuk. A szintvonalakra írt számok a maximális determináns-érték %-át jelentik. Mivel az izoinformációs görbék szimmetrikusak a $t_1 = t_2$ egyenesre, egy ábrán kétféle súlyozás mellett kapható eredményt tudtunk ábrázolni. A felső rész $\sigma = \text{állandó}$, az alsó pedig $\sigma = \sqrt{f}$ esetre vonatkozik.

Az ábrából kitűnik, hogy a $t_1 = t_2$ egyenes mentén az információs érték nulla. Ez várható is, hiszen ha mindkét mérés egyazon t -értéknél történik,



1. ábra. Izoinformációs görbék egytagú exponenciális függvény esetén, $\lambda = 1$
 Fig. 1. Isoinformational curves in case of the one-term exponential function, $\lambda = 1$

akkor a mért adatokból a λ paraméter nem számolható. Másrészt az is látszik, hogy $\sigma = \text{áll.}$ esetén az optimális pontok $t_1 = 0$ és $t_2 = 1$, $1/\lambda$ időegységben mérve. Ez megegyezik az I. táblázatban található eredménnyel. Az ábra alapján összehasonlítható az optimális ($t_1 = 0$ és $t_2 = 1$) és egy másik (pl. a $t_1 = 0,5$ és $t_2 = 2,0$) pont információértéke. Az utóbbi pontnál a determináns értéke kb. 10%-a az optimális értéknek. Figyelembe véve, hogy az információs mátrix determinánsa a paraméterek szórásnégyzetével fordítva arányos, a nem optimális ($t_1 = 0,5$ és $t_2 = 2,0$) mérésnél kb. 3-szor nagyobb lesz a paraméterek szórása.



2. ábra. Kéttagú exponenciális függvény esetén kapható D-optimális pontok (t_1, t_2, t_3 és t_4) elhelyezkedése

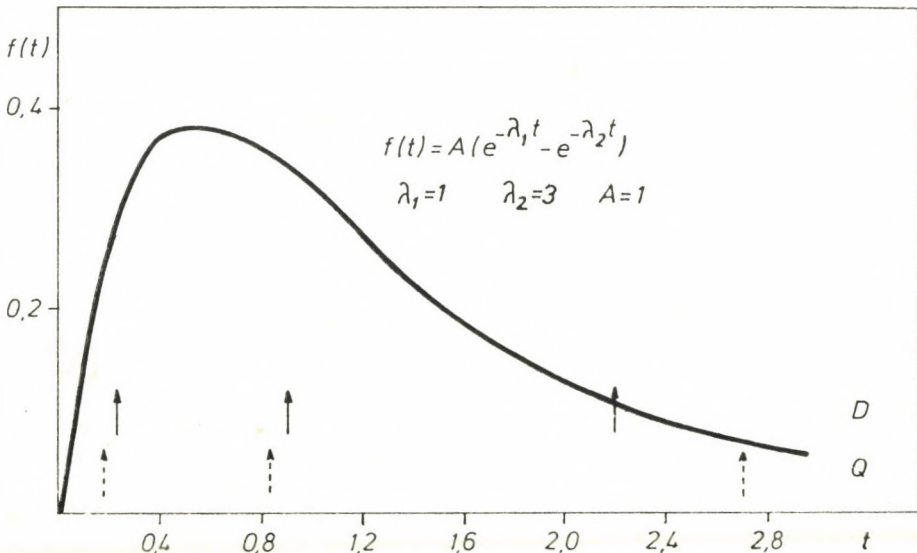
Fig. 2. The four D-optimal points (t_1, t_2, t_3 and t_4) of the two-terms exponential response function

Az egytagú exponenciális kifejezésnél az optimális mérési pontokat egyszerű kifejezéssel tudtuk megadni. Várható, hogy a paraméterek számának növelésével már nehezebb az explicit megadás. Az $f(t) = B_1 \exp(-\lambda t) + B_2$ mérési függvény esetén a három paraméternek (B_1 , λ és B_2) megfelelően a három optimális t -érték állandó σ hiba mellett a következő: $t_1 = 0$, $t_2 = 1/\lambda$ és $t_3 = \max(t)$. Viszont más jellegű hibánál az optimális értékek már nemcsak λ -tól, hanem a B_1 és B_2 értékektől is függenek. Bonyolultabbak a viszonyok az $f(t) = B_1 \exp(-\lambda_1 t) + B_2 \exp(-\lambda_2 t)$ kéttagú függvény esetén. Itt explicit formában nem tudjuk megadni az optimális helyeket, hanem csak adott B_i és λ_i értékek mellett készített izoinformációs görbék alapján tudjuk meghatározni az optimális viszonyokat.

A 2. ábra kéttagú, végig csökkenő exponenciális mérési függvény esetén mutatja az optimális pontokat. Az ábrán a függvénygörbe látható különböző λ_2 (0,25, ill. 0,1) értékek mellett, miközben az optimális pontokat nyíllal jelöltük. Látható, hogy optimális viszonyokat akkor kapunk, ha a görbe kezdeti, meredekebb szakaszán sűrítjük a pontokat. A pontok elhelyezkedését elsősorban a λ_1 és λ_2 viszonya határozza meg, a B_1 és B_2 aránya a szóba jöhető (0,1–3) tartományban csak néhány százalékos változást eredményez. A $\sigma =$ állandó esetén a pontok elhelyezkedésére a következő mondható: $t_1 = 0$ (pontosabban a minimális t -érték); $t_2 \approx 0,8/\lambda_1$;

$$t_3 \approx t_2 + \frac{1}{2} \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{\lambda_1 \lambda_2} \text{ és } t_4 \approx t_3 + 1,2/\lambda_2, \text{ ahol } \lambda_1 > \lambda_2.$$

A 3. ábra $f(t) = A(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t})$ alakú, kezdetben növekvő, majd csökkenő függvény esetén kapott optimális mérési pontokat mutatja. Ilyen görbék



3. ábra. A D- és Q-optimális pontok eloszlása a felszívódást és eliminációt leíró gyógyszerkinetikai függvény esetén

Fig. 3. The D- and Q-optimal points for a type of absorption-elimination drug kinetic function

vel írható le számos gyógyszerfelszívódási és -kiürülési görbe. Mivel a gyógyszerhatás szempontjából fontos lehet a görbe alatti terület s így a mérési görbe legkisebb hibájú becslése, ebben az esetben meghatároztuk a Q -optimális mérési pontokat is. Látható, hogy a két különböző kritérium szerint számolt optimális t -értékek lényegesen nem különböznek. (A D -, ill. Q -optimális pontok: 0,23, 0,88 és 2,3, valamint 0,18, 0,83 és 2,7.)

Az egytagú, végig csökkenő exponenciális kifejezésnél belátható, hogy állandó mérési hiba mellett a D - és Q -optimális pontok egybeesnek [5].

Hiperbola és szigmoid alakú függvények

Kötéskinetikai, enzimkinetikai vizsgálatok során a reakció sebessége vagy a kötött anyag mennyisége gyakran leírható az $y(x) = Vx/(K + x)$ hiperbola alakú — a MICHAELIS—MENTEN-féle — összefüggéssel. (A kifejezésben V maximális sebességet, x a szubsztrát koncentrációt és K az ún. MICHAELIS állandót jelöli.) Szigmoid alakú görbék leírására használatos az

$$f(x) = \frac{V \cdot x^n}{K + x^n} \quad (5)$$

alakú kifejezés, ami az ún. HILL-féle kinetika esetén alkalmazható. Itt n a reakcióban részt vevő „egységek” közötti kooperativitásra jellemző paraméter. Az (5) összefüggés speciális ($n = 1$) esetben éppen a MICHAELIS—MENTEN-féle egyszerű kinetika hiperbola összefüggését adja. Ezért, ha n nem paraméter, hanem egy megadott állandó, akkor az (5) kifejezés alkalmazása során kapott eredmények tartalmazzák a hiperbola esetét is, $n = 1$ mellett.

Pozitív V és K paraméterek esetén a két D -optimális pont x értékei a II. táblázatban találhatóak. Pl. állandó hiba ($\sigma = \text{áll.}$) és $n = 1$ mellett a két

II. táblázat

D-optimális pontok az $y(x) = V \cdot x^n / (K + x^n)$ alakú függvény esetén
Table 2. D-optimal points of the sigmoid function: $y(x) = Vx^n/(K + x^n)$

$y = \frac{Vx^n}{K + x^n}$	$\sigma = \text{áll.}$		$\sigma \sim \sqrt[n]{y}$		$\sigma \sim y$	
	x_1	x_2	x_1	x_2	x_1	x_2
K és V is fontos	$\frac{n}{\sqrt[n]{K}}$	$\max(x)$	$\frac{n}{\sqrt[n]{K/2}}$	$\max(x)$	$\min(x)$	$\max(x)$
Csak K fontos	$0,8 \sqrt[n]{K}$	$\max(x)$	$0,4 \sqrt[n]{K}$	$\max(x)$	$\min(x)$	$\max(x)$

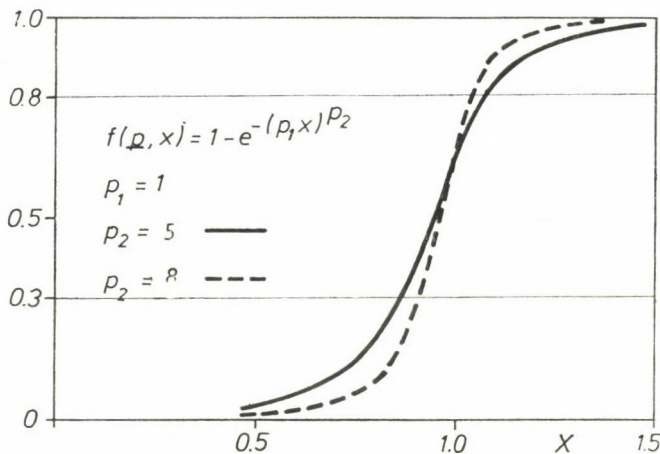
optimális koncentráció $x_1 = K$ és x_2 a lehető legnagyobb. Amennyiben nincs kitüntetett paraméter, akkor állandó hiba és $n = 1$ esetén a két optimális pont helyét az $x_1 = K \cdot x_2 / (2K + x_2)$ összefüggés határozza meg. Ennek segítségével bármely véges $x_2 = \max(x)$ értékhez az optimális x_1 értéke számolható, pl. $x_2 = 2K$ esetén $x_1 = K/2$. (A függelék c) pontja $\sigma \sim \sqrt[n]{f}$ hibafüggés mellett tartalmazza az optimális pontok számolási menetét.)

Az (5) mérési függvényben a K , V és n mennyiségeket paraméternek tekintve legalább három pont szükséges a paraméterbecsléshez. Számolásaink alapján $K = V = 1$ és $n = 2$ esetén a három optimális pont a következő: $x_1 = 0,55$; $x_2 = 1,9$ és $x_3 = \max(x)$. Amennyiben a maximális x értéke 3–10 között van, úgy $x_1 \approx 0,5$ és $x_2 \approx 1,6$ az optimális értékek.

Szigmoid alakú görbe leírható a WEIBULL-féle egyszerű eloszlásfüggvény-nel a következőképpen:

$$f(x) = 1 - \exp [-(p_1 x)^{p_2}], \quad (6)$$

ahol p_1 és p_2 paraméterek és x a független változó. A függvény alakja $p_1 = 1$ és $p_2 = 5$, ill. $p_2 = 8$ esetén a 4. ábrán látható. Állandó mérési hibát feltételezve, a D -optimális x értékek a maximális függvényérték 30 és 80%-os értékénél vannak. Ez esetben az izoinformációs görbék az 5. ábrán találhatóak.



4. ábra. A Weibull-féle eloszlásfüggvény alakja $p_1 = 1$, $p_2 = 5$, ill. $p_2 = 8$ paraméterértékek esetén
Fig. 4. The shape of the Weibull distribution function with parameters $p_1 = 1$, $p_2 = 5$ and $p_2 = 8$

A mérési függvény alakjának szerepe

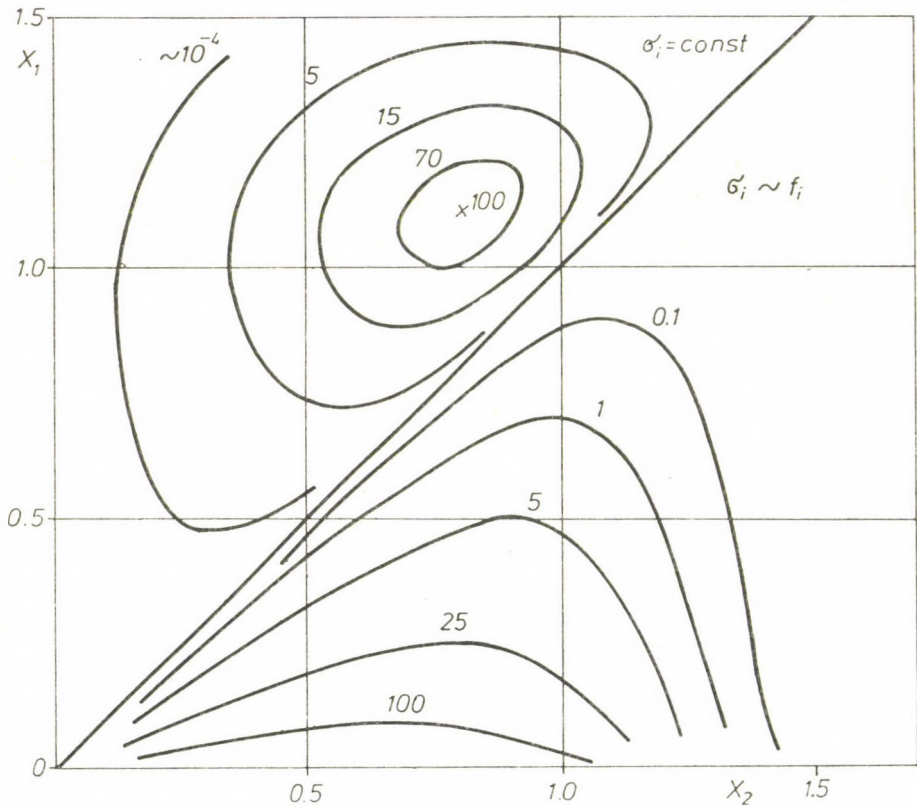
A kísérleti görbék leírásánál előfordul, hogy többféle matematikai kifejezés is alkalmazható. Pl. az $f(x) = Ae^{-\lambda x}$ exponenciálisan csökkenő egytagú kifejezés egy adott tartományban elég jól leírható a $g(x) = B/(K + x)$ alakú hiperbolával is. Mivel a két esetben más-más alakban szerepelnek a paraméterek, várható, hogy az optimális x pontok sem lesznek azonosak. Viszont az eltérés rendszerint kicsi, mégpedig $A = B = K = 1$ és $\lambda = 0,55$ esetén — ekkor közelítőleg egybeesnek az $f(x)$ és $g(x)$ görbék — az exponenciális optimális pontjai: $x_1 = 0$ és $x_2 = 1,82$, a hiperboláé pedig: $x_1 = 0$ és $x_2 = 2$.

Hasonló jó egyezést kapunk, ha a szigmoid görbét törtfüggvénnyel, vagy WEIBULL-féle¹ eloszlásfüggvénnyel írjuk le. A törtfüggvényt $f(x) = \frac{x^n}{K + x^n}$ alakkal leírva (K és n paraméterek), a szóba jöhető n és K értékek esetén a

két optimális pont a maximális függvényértéknek kb. 30, ill. 75%-hoz tartozó x értéknél lesz.

A fenti példák azt valószínűsítik, hogy a mérési függvény matematikai alakja kevésbé befolyásolja az optimális mérési pontok helyét. Ez természetesen nem áll fenn általánosan, és lehetnek olyan extrém paraméterértékek, amelyeknél erősen különböznek a két függvény optimális pontjai. Másrészt egészen más eredményt kapunk akkor is, amikor a két függvényalak a paraméterek számában is eltér. Ekkor ugyanis a minimálisan szükséges pontok száma is különbözik.

Belátható, hogy két, csupán a paraméterek felírásában eltérő matematikai függvény esetén azonos optimális pontokat kapunk, azaz a paraméterek egyértelmű transzformációja nem változtatja meg a D -optimális tervet (bizonyítást l. a Függelék b) pontjában).



5. ábra. Isoinformációs görbék a Weibull-féle eloszlásfüggvény alkalmazása esetén. A paraméterértékek $p_1 = 1$ és $p_2 = 5$

Fig. 5. Isoinformational curves for the response function of Weibull distribution. The values of the parameters are: $p_1 = 1$ and $p_2 = 5$

A kísérlettervezési eredmények alkalmazhatósága

Mivel a biológiában rendszerint paraméterekben nem lineáris függvényekkel találkozunk, az optimális független változó értékek a meghatározandó paraméterek értékétől is függenek. Ezért, ha előzetes információk a paraméterről szegényes, pontatlan, akkor a méréstervezési számolások eredménye kevésbé segít, sőt félrevezethet. Ellenben, ha a kísérletek ismétlésével mind pontosabban kívánjuk meghatározni a paraméterek értékét, akkor a közbenső tervezési eredmények felhasználása lehetővé teszi a kísérletek, a mérések számának csökkentését a kívánt pontosság eléréséhez.

A paraméterek szempontjából optimális tervezés során ismertnek tételezzük fel a mérési függvény alakját. Ellenkező esetben nemcsak az optimális pontokban, hanem a mérési tartomány többi szakaszán is kell mérni, majd függvényillesztéssel eldönteni, hogy melyik függvényvel célszerű tovább dolgozni. Természetesen a méréstervezés elsődleges céljaként szerepelhet az is, hogy két vagy több szóba jöhető függvény közötti döntést — a mérési pontok megválasztásával — elősegítsük. Előfordul, hogy a paraméterek hibáját szeretnénk csökkenteni, de bizonytalan a mérési függvény alakja. Ekkor kompromisszumot kell kötni; pl. az egytagú exponenciális függvény esetén nemcsak a $t_1 = t_{\min}$ és $t_2 = t_1 + 1/\lambda$ pontokban, hanem ezek között is kell néhány mérést végezni.

Amennyiben bizonytalanok vagyunk a paraméter értékében, de a szóba jöhető intervallumot jól be tudjuk határolni, akkor WEISS és DARVEY [13] szerint az intervallumra vonatkozó integrált információ mátrixszal lehet dolgozni. Ekkor egyszerű függvények esetén is igen bonyolult összefüggéseket kapunk az optimális pontok kifejezéseire.

Az izoinformációs görbék alkalmazhatóságát ellenőrizni lehet számítógépes szimulációval. Saját, számítógépes szimulációval kapott eredményeink [10, 12] szerint az egyes pontok információtartalma — pontosabban az információs mátrix determinánsa — fordítva arányos a paraméterek szórásának négyzetével, ami az elmélettől is várható [1, 11]. Hasonló korrelációt figyelünk meg abban az esetben is, amikor a számítógépes szimuláció helyett radioaktív készítmény aktivitásának exponenciális csökkenésére jellemző felezési időt becsültünk, és több minta alapján számoltuk a paraméter szórásnégyzetét.

Méréstervezési számolásaink alátámasztották ENDRÉNYI [4] és FAJSZI [6] azon számítógépes szimulációs eredményeit, melyek szerint egyszerű hiperbola alakú kötéskinetikai függvénynél, állandó relatív mérési hiba mellett, a kisebb koncentrációértékeknél kell sűríteni a mérési pontokat [10].

Összefoglalás

A kísérlettervezés elméleti módszerei segítségével meghatározhatók azok a mérési körülmények, melyek mellett ugyanannyi mérést végezve kisebb hibájú eredményt kapunk, mint a véletlenszerűen beállított mérési feltételek esetén. Görbe vonalakkal leírható mérési adatoknál rendszerint paraméterek értékét becsüljük a függvényillesztés segítségével. A paraméterek kis hibájú becsüléséhez ún. *D*-optimális tervezést használjuk, azaz az információs mátrix determinánsát maximalizáljuk. A görbe vonal, a mérési függvény menti hiba csök-

kentése érdekében ún. Q -optimális tervezési kritériumot lehet alkalmazni. Számos esetben a D - és Q -kritérium közel azonos eredményre vezet.

Az $f(t) = A \exp(-\lambda t)$ exponenciális mérési függvény esetén — négyzetgyökös mérési hiba mellett — a két optimális pont: $t_1 = 0$ és $t_2 = 2/\lambda$. Az $f(x) = \frac{Vx}{K+x}$

MICHAELIS—MENTEN-féle kötéskinetika esetén az optimális koncentrációértékek: $x_1 \approx K$ és $x_2 = \max(x)$. Kétparaméteres szigmoid görbénél az optimális pontok a maximális függvényérték 30 és 80%-os értéke közelében helyezkednek el. Több mint két mérés esetén általában a fenti optimális pontoknál kell ismételni, fele-fele arányban megosztva. Az optimális x értékeket a mérési hiba jellege erősen befolyásolhatja.

Bonyolultabb — pl. három paramétert tartalmazó — mérési függvény esetén az optimális pontok rendszerint már nem adhatók meg egyszerű kifejezéssel, s ezért konkrét paraméterértékek mellett numerikusan kell számolni.

A vizsgált kétparaméteres és csökkenő exponenciális, valamint szigmoid görbe esetén a mérési függvény matematikai alakja kevésbé befolyásolja az optimális pontok helyét, azokat elsősorban a függvényérték határozza meg.

Mivel a biológiában rendszerint paraméterekben nem lineáris mérési függvénnyel találkozunk, a méréstervezési eredmények tartalmazzák a mérésből meghatározandó paraméterértékeket. Nehézséget jelent a hiba jellegének kérdése is. Ezek miatt az eredmények csak közelítően ismert paramétereknél lehetnek reálisak, hasznosak. Viszont az egymás után végzett kísérlet, tervezés, majd ismét kísérlet stb. esetén fokozatosan javíthatók az optimális értékek. Így a szekvenciálisan végzett kísérlet és számolás műveletével sok mérés megkapható.

Az elméletből kapott tervezési eredmények, az izoinformációs görbék realitását számítógépes szimulációval is lehet ellenőrizni. A paraméterek szórására vonatkozó szimulációs és tervezési eredmények jól korrelálnak.

Függelék

a) Kísérletek összehasonlításának lehetőségei

Az E_i -vel jelölt kísérletek összehasonlítására elsősorban a paraméterek hibájára jellemző $D(E_i)$ diszperziós mátrix és a mérési függvény $d(E_i)$ -vel jelölt hibája használatos. (A $D(E)$ diszperziós mátrix az $M(E)$ információs mátrix inverze.) Két — az E_1 és E_2 — kísérlet összehasonlítása esetén annak eldöntésére, hogy E_1 jobb E_2 -nél (azaz $E_1 > E_2$) a következő feltételek léteznek [7]:

1. $D(E_1) < D(E_2)$ — tehát az E_1 kísérleti adatokból számolható diszperziós mátrix minden eleme kisebb az E_2 mátrixának megfelelő eleménél.
2. $\det D(E_1) < \det D(E_2)$ — az E_1 -hez tartozó determináns kisebb.
3. $\text{Sp}D(E_1) < \text{Sp}D(E_2)$ — a mátrixok nyomát (spur) vesszük figyelembe.
4. $\max_j D_{jj}(E_1) < \max_j D_{jj}(E_2)$ — a mátrix főátlójában levő elemek összehasonlítása.
5. $\max_{x \in Z} d(x, E_1) < \max_{x \in Z} d(x, E_2)$ — az $f(x, p)$ mérési függvény $d(x)$ hibabecslésének maximumát figyeljük a z mérési tartományban.

6. $\int_z d(x, E_1)dx < \int_z d(x, E_2)dx$ — a kritérium a $d(x)$ hiba adott z tartományra vett integrálja.

A gyakran használatos D -optimális feltétel a 2. pontnak felel meg.

Amennyiben az összes paraméter közül csupán q számú elsődleges, r számú pedig kevésbé fontos, akkor a D -optimális számítások céljából az M információs mátrixot a következőképpen kell felbontani, particionálni:

$$M = \begin{bmatrix} M_{qq} & M_{qr} \\ M_{rq} & M_{rr} \end{bmatrix}.$$

Itt az M_{qq} , M_{qr} , M_{rq} és M_{rr} részmatrixok rendre qxq , qxr , rxq és rxr dimenziójúak lesznek. A felbontás után az $M_{qq} - M_{qr}M_{rr}^{-1}M_{rq}$ mátrix determinánsát kell számolni, ahol M_{rr}^{-1} az M_{rr} inverze [8].

b) A paraméter-transzformáció hatása a D -optimális tervezésre

Az $F_{ij} = \partial f_i / \partial p_j$ ($i = 1, \dots, N$ és $j = 1, \dots, n$) elemekkel definiált F mátrix bevezetésével az M információs mátrix a következőképpen írható fel:

$$M = F'WF,$$

ahol F' az F -nek transzponáltja, és W a súlytényezőket tartalmazó mátrix. Térjünk át az $f(x, p)$ mérési függvényben a p paraméterek helyett ugyanolyan számú, de más, mégpedig az $r = R(p)$ paraméterekre, ahol R a p paraméterek teréből az r paraméterek terébe képező invertálható függvény. Ekkor az r paraméterekre jellemző F mátrix eleme:

$$\tilde{F}_{ij} = \frac{\partial f_i}{\partial r_j} = \frac{\partial f_i}{\partial p_j} \cdot \frac{\partial p(r)}{\partial r_j}$$

alakban írható, ahol $P(r)$ az $R(p)$ inverze. Ennek felhasználásával az r paraméterekre jellemző információs mátrix a következő lesz:

$$\tilde{M} = \tilde{F}'W\tilde{F} = S'F'WF S,$$

ahol S mátrix a $P(r)$ függvény r szerinti parciális deriváltjait tartalmazza. Mivel az S mátrix csak a p , ill. r paraméterektől függ, az \tilde{M} információs mátrix determinánsának maximuma — az x_i független változó értékek terében — egybeesik az $M = F'WF$ mátrix determinánsának maximumával.

Paraméter-transzformáció révén különböznek pl. az

$$f(x, p) = p_1 e^{-p_2 x} \quad \text{és} \quad f(x, r) = \frac{r_1}{r_1 + r_2} e^{-(r_1 + r_2)x} + \frac{r_2}{r_1 + r_2}$$

függvények. Az utóbbi két-kompartmentes anyagcsere-vizsgálatoknál használatos. Az eredmények szerint, akár a p , akár az r paramétereket kívánjuk becsülni, az optimális x_i értékek nem különböznek.

c) A *D*-optimális pontok számolása a MICHAELIS—MENTEN-féle kötéskinetikai függvény és $\sigma \sim \sqrt{f}$ hibafüggés esetén

A mérési függvény, a kezdeti reakciósebesség kifejezése

$$f(x) = \frac{Vx}{K + x},$$

ahol *V*: a maximális sebesség, *K*: A MICHAELIS-féle állandó és *x*: a szubsztrát koncentráció.

Az *M* információs mátrix számolásához szükséges parciális deriváltak: $\partial f/\partial V = x/(K + x)$ és $\partial f/\partial K = -Vx/(K + x)^2$. A (3) összefüggés alapján $-w_i = 1/f_i$ súlyozást feltételezve — a 2×2 -es mátrix elemei a következők lesznek:

$$M_{11} = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^N \frac{x_i}{K + x_i}; \quad M_{12} = - \sum_{i=1}^N \frac{x_i}{(K + x_i)^2}; \quad M_{22} = V \sum_{i=1}^N \frac{x_i}{(K + x_i)^3},$$

ahol *N* a mérési pontok száma.

Mivel $M_{21} = M_{12}$ (azaz az információs mátrix szimmetrikus), a determináns a $\Delta = M_{11}M_{22} - M_{12}^2$ alapján két mérési pont (x_1 és x_2) esetén a következő alakot veszi fel:

$$\Delta = \frac{x_1 x_2}{(K + x_1)^3 (K + x_2)^3} (x_1 - x_2)^2.$$

Most azt a két x_i értéket kell meghatározni, melynél a Δ értéke maximális. A pozitív koncentrációértékek miatt természetesen csak az $x_i > 0$ megoldások érdekelhetnek bennünket. A szélsőérték számítások szerint a $\partial \Delta/\partial x_k = 0$ feltételből

$$x_1 = \frac{Kx_2}{3K + 2x_2}$$

kapcsolat adódik. Ezt behelyettesítve a Δ kifejezésébe, a Δ -ra olyan összefüggést kapunk, mely x_2 függvényében szigorúan monoton növekvő és $x_2 = \infty$ -nél véges határértéket vesz fel. Az $x_2 = \infty$ határértéknél a Δ kifejezése pedig $x_1 = K/2$ mellett veszi fel maximumát. Tehát a két optimális mérési pont: $x_1 = K/2$ és $x_2 = \infty$. Véges x_2 esetén pedig a fenti képletből számolható az optimális x_1 -érték.

IRODALOM

1. BARD, Y. (1974) *Nonlinear parameter estimation*. Academic Press, New York
2. BOX, G. E. P. and LUCAS, M. L. (1959) Design of experiments in nonlinear situations. *Biometrika*, **46**, 77—90.
3. DRAPER, N. R. and SMITH, H. (1966) *Applied regression analysis*. Wiley, New York
4. ENDRÉNYI, L. and KWONG, F. M. (1972) Design and analysis of hyperbolic kinetic and binding experiments. In: HEMKER and HESS (eds.): *Analysis and simulation of biochemical systems*. North-Holland, Amsterdam, 125—142.
5. ENDRÉNYI, L. (1981) Design of tracer kinetic experiments for precise parameter estimation. In: FEDINA, KANYÁR, KOCSIS, KOLLAI (eds.): *Mathematical and computational methods in physiology*. Adv. Physiol. Sci. Vol. **34**., Akadémiai Kiadó—Pergamon Press, 169—184.

6. FAJSZI, Cs. (1975) *Kinetikai módszerek alkalmazása egyes biológiai rendszerek analizésére*. Kandidátusi disszertáció, Szeged
7. FEDOROV, V. V. (1972) *Theory of optimal experiments*. Academic Press, New York
8. HILL, W. J. and HUNTER, W. G. (1975) Design of experiments for subsets of parameters. *Technometrics*, **16**, 425–434.
9. JOHN, R. C. S. and DRAPER, N. R. (1975) D-optimality for regression designs: a review. *Technometrics*, **17**, 15–23.
10. KANYÁR, B. (1979) *Nyomjelzőkinetikai mérések tervezése és értékelése*. Kandidátusi disszertáció, Budapest.
11. KÖNIG, P. and NASZÓDI, L. (1978) *Kémiai kinetikai kísérletek tervezése*. (Kézirat)
12. TORNÓCI, L. and KANYÁR, B. (1981) D-optimal design in case of exponential and sigmoid response functions. In: FEDINA, KANYÁR, KOCSIS and KOLLAI (eds.): *Mathematical and computational methods in physiology*. Adv. Physiol. Sci. Vol. **34**., Akadémiai Kiadó—Pergamon Press, 185–192.
13. WEISS, G. H. and DARVEY, I. G. (1981) A note on the choice of substrate concentration in enzyme kinetic experiments. *J. theor. Biol.*, **90**, 437–439.

DESIGN OF REGRESSION EXPERIMENTS IN BIOLOGY

B. Kanyár and L. Tornóci

Semmelweis University of Medicine, Computing Group, Budapest, Hungary

Using the theoretical methods of the design of experiments it is possible to determine the experimental conditions, which yield smaller error of the results, than those of an arbitrary experiment, having taken the same number of readings each time. When dealing with data that can be described by curves, the values of parameters are usually estimated, using a function-fitting procedure. In order to get an estimation of the parameters with small error, the so-called D-optimal design is used. Here the determinant of the information matrix is maximized. To lessen the error of the response function itself, the so-called Q-optimal design criteria can be used. In many cases the D- and Q-optimal designs give almost the same results.

In case of exponential functions: $f(t) = A \cdot e^{-\lambda t}$ — if the measuring error is proportional to the square root of the function — the two D-optimal points are $t_1 = 0$ and $t_2 = 2/\lambda$. For the Michaelis—Menten kinetics the optimal concentrations are $x_1 = K$ and $x_2 = \max(x)$ (if K is great enough). In case of sigmoid-shaped curves with two parameters the optimal points are approximately those, where the dependent variable takes the 30% and 80% of the maximum, respectively. If more than two measurements are to be taken, they should be repeated at the above mentioned optimal points, at equal frequency. The optimal x values may be highly dependent on the type of the measuring error.

For more complicated response functions (such as those having three parameters) usually there is no way of giving the optimal points explicitly by simple expressions, so they must be numerically computed for the given parameter values.

In case of the studied one-term exponential and sigmoid curves, the mathematical description of the response function has only a limited effect on the distribution of the optimal points; these points are mainly determined by the shape of the curve, by the data themselves.

Since in biology, as a rule, those functions are predominant, that are nonlinear in parameters, when designing the experiment one needs to know at least a good estimation of the parameter values. Determining the experimental error may also involve difficulties. Because of these, the results can be right and useful only, if the parameters are approximately known. But if experiment, design, experiment and so on are successively performed, the optimal values can be improved step by step. Thus, experimenting and computing in a sequential manner, a great number of measurements can be saved.

The correctness of theoretical designs and that of the isoinformational curves can be checked by simulation on computer, as well. Our simulation and design results concerning the parameter variances are in good correlation.

HIDROXIL SZABAD GYÖKFOGÓK HATÁSA BACILLUS MEGATERIUM SPÓRÁK SUGÁRREZISZTENCIÁJÁRA

GAZSÓ LAJOS és ALAN TALLENTIRE*

Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet,
Budapest és *University of Manchester, Department of Pharmacy, Manchester

Beérkezett: 1982. január 18-án

Kulcsszavak: sugérrezisztencia, oxigén, spóra, ^{60}Co , gyökfogó, OER

Bevezetés

Számos olyan vegyületet ismerünk, amelyek befolyásolni képesek a mikroorganizmusok sugárérzékenységét. Az egyik ilyen csoportot képezik a hidroxil szabad gyökfogók (scavengerek). A hidroxil szabad gyök fontos szerepet játszik a sugárbiológiai folyamatokban. A víz radiolízisekor keletkezett primér termékek (e_{aq}^- , $\cdot\text{H}$, $\cdot\text{OH}$) közül egyedül a hidroxil szabad gyöknél sikerült bizonyítani, hogy sejtpusztító hatással rendelkezik.

Mikroorganizmusoknál az oxigénfüggő sugárkárosodás több komponensre bontható. Így megkülönböztetnek alacsony és magas oxigénkoncentrációhoz kapcsolt sugárkárosodást, a maximális oxigénhatás (ami 100% oxigént tartalmazó gáz használatával érhető el) 34%-os és 66%-os részarányával, valamint hidroxil szabad gyökfogóval csökkenthető (73%) és nem befolyásolható (27%) komponens [4].

A hidroxil szabad gyök hatásmechanizmusának tanulmányozása hozzájárult a sugárkárosodás természetének jobb megismeréséhez, alkalmazása bevált módszer a sugárszenzitizáló vegyületek hatásának tanulmányozásában.

A hidroxil szabad gyök hatásánál megkülönböztetnek protektív és ún. „deszenzitizáló” reakciót. Erre jó példa a *t*-butanol, mely teljesen megszünteti a NO_3^- [5] és az Ag^+ [6] sugárszenzitizáló hatását, de egymagában nem rendelkezik protektív hatással anoxiás körülmények között [2].

A hidroxil szabad gyök scavengerek hatásmechanizmusa eltérő spórás baktériumoknál, vegetatív baktériumoknál és emlős sejteknél.

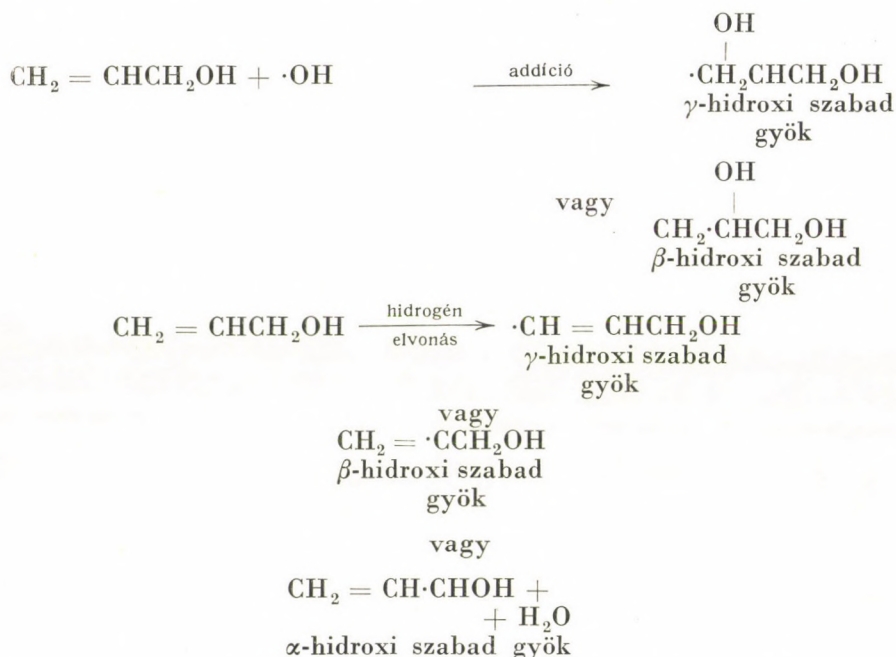
Spórás baktériumoknál a hidroxil szabad gyökfogók hatásmechanizmusa az alábbiak szerint foglalható össze [3]:

- a) Anoxiás körülmények között (amikor más sugárérzékenységet módosító ágens nincs jelen) egyedül a hidroxil szabad gyök elvonása nem eredményez sugárvédő hatást.
- b) Egy meghatározott alacsony oxigén koncentráció intervallumban (kb. 10^{-6} -tól 10^{-4} mol/L-ig) a $\cdot\text{OH}$ elvonás csökkentheti a sugárkárosodást.

G. L. a fenti munkát a Manchesteri Egyetem Gyógyszertani Tanszékén végezte mint a Nemzetközi Atomenergia Ügynökség ösztöndíjasa.

10^{-4} mol/L oxigénkoncentráció felett a hidroxil szabad gyök elvonás nem befolyásolja a sugárérzékenységet.

- c) Néhány vegyület védő hatást képes kifejteni anoxiás körülmények között. Ez valószínűleg egy ún. α -hidroxil szabad gyök képződésével jár, amely aktív sugárvédő. Ilyen redukáló szabad gyököket képező ágensek a formiát-ion, metanol, etanol, alil-alkohol, glicerin, 1-propanol és a 2-propanol. Az alil-alkohol példáján ez a reakció a következő:



A fenti reakciók mintegy 12%-a vezet α -pozíciójú szabad gyök keletkezéséhez [7]. A védőhatás valószínűleg az oxidált sejtkomponens redukációjában rejlik.

Jelen munkában két hidroxil szabad gyök scavenger (*t*-butanol, KSCN) sugárérzékenységre gyakorolt hatását vizsgáltuk különböző oxigénkoncentrációnál, *Bacillus megaterium* spórákon.

Anyag és módszer

A *Bacillus megaterium* (ATCC 8245) spórák tenyésztésére és besugárzására TALLENTIRE módszerét használtuk [8]. A sugárforrás 74 TBq ^{60}Co készülék volt, 170 Gy/min dózisteljesítménnyel. A túlélési görbét négy kísérleti pontból határoztuk meg, és mindegyik ponthoz négy paralel telepszámot használtunk fel. Ezek a görbék lineárisok vagy közel lineárisok voltak, melyek a következő egyenlettel írhatók le:

$$\ln \frac{S}{S_0} = \ln n - kD,$$

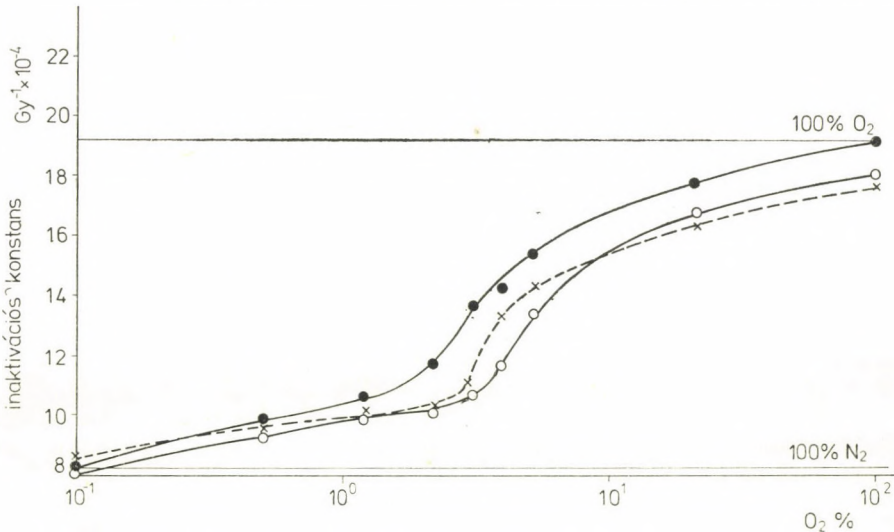
ahol S a spórák száma D dózisznál, S_0 a kiindulási spóraszám, k a görbe meredeksége vagy inaktivációs konstansa, n az extrapolációs szám, mely megadja a görbe vállának a méretét.

Az 5×10^7 spórárt tartalmazó tesztszuspenziót (deszt. vízben) nitrogénnel, oxigénnel, illetve nitrogén-oxigén gázkeverékkel kezeltük, 200 ml/min áramlási sebességgel 30 percig a besugárzás előtt. Az áramoltatást és a keverést a besugárzás alatt is folytattuk. A használt gázkeverékek 0,5, 1,2, 2,2, 3,0, 3,85, 5,1 és 21% oxigént tartalmazó nitrogén, valamint nagy tisztaságú oxigén és nitrogén (British Special Gas) voltak. A számított oxigénkoncentráció a fenti sorrendnek megfelelően 7,3, 15,8, 29,0, 39,0, 50,7, 67,3, 277, 1320 és $0,0066 \mu\text{mol/L}$ -nek adódott. Az alkalmazott t -butanol és KSCN koncentráció az irodalmi adatok összehasonlítása céljából $0,1 \text{ mol/L}$ volt.

Eredmények és megbeszélésük

Megállapítottuk, hogy a két vegyület az alkalmazott koncentrációban nem befolyásolta a spórák túlélését sem aerob, sem anaerob körülmények között.

Az inaktivációs konstans változását az oxigénkoncentráció függvényében az 1. ábra mutatja. $29,0 \mu\text{mol/L}$ O_2 koncentrációig (2,2% oxigént használva) fokozatos növekedés figyelhető meg, melyet hirtelen emelkedés követ. Az oxigénkoncentráció további emelése fokozatos k érték növekedéshez vezet, míg el nem éri az $1320 \mu\text{mol/L}$ maximális koncentrációt (100% O_2). 100%-os nitro-



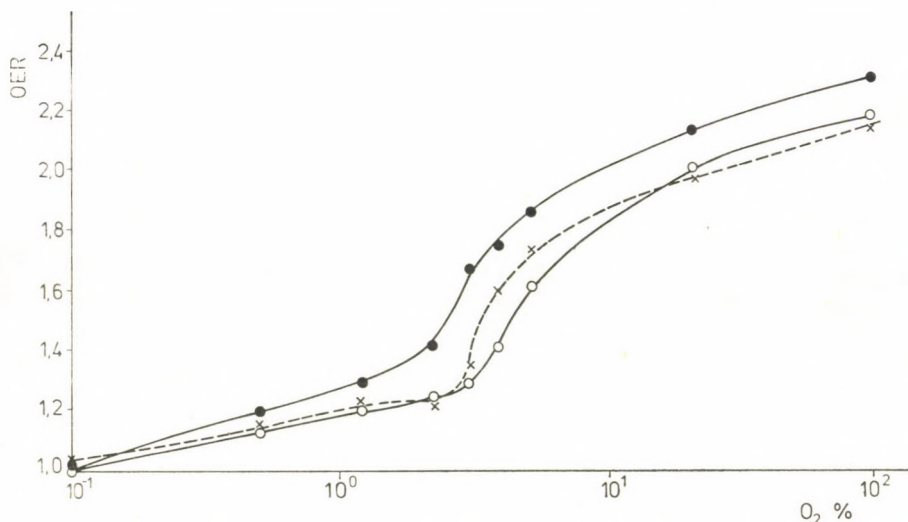
1. ábra. Az inaktivációs konstans alakulása $0,1 \text{ mol}$ KSCN és t -butanol jelenlétében különböző oxigénkoncentráció mellett (●—● gázkeverék, ×—× gázkeverék + KSCN, ○—○ gázkeverék + t -butanol)

Fig. 1. The relationship between the inactivation constant (k) for *Bacillus megaterium* in the presence of $0,1 \text{ mol/L}$ KSCN and t -butanol (●—● gas mixture alone, ×—× gas mixture + KSCN, ○—○ gas mixture + t -butanol)

gént használva az inaktivációs konstans $8,25 \text{ Gy}^{-1} \times 10^{-4}$. A maximális oxigénkoncentrációnál kapott k érték $19,09 \text{ Gy}^{-1} \times 10^{-4}$.

A plató elhelyezkedését összevetve POWERS [4] adataival eltérést tapasztalunk. Míg nála a plató a maximális oxigéneffektus 30%-nál, addig nálunk a 70%-nál jelenik meg. A különbség adódhat a használt sugárzás eltérő minőségéből (kemény röntgen, míg nálunk gamma), valamint a szuszpendáló közeg különbözőségéből (foszfát puffer, míg nálunk desztillált víz).

0,1 mol/L KSCN-ot és *t*-butanolt használva a görbék párhuzamosan követik az oxigén vonalát. Eltérést a KSCN-nál tapasztaltunk 3,85 és 5,1% oxigén használatakor (1. és 2. ábra).



2. ábra. *Bacillus megaterium* relatív sugárérzékenysége különböző oxigénkoncentráció mellett, 0,1 mol KSCN és *t*-butanol jelenlétében (●—● gázkeverék, ×—× gázkeverék + KSCN, ○—○ gázkeverék + *t*-butanol)

Fig. 2. The relationship between relative sensitivity for *Bacillus megaterium* in the presence of 0,1 mol/L KSCN and *t*-butanol. (●—● gas mixture alone, ×—× gas mixture + KSCN, ○—○ gas mixture + *t*-butanol)

Anoxiás körülmények között a két hidroxil szabad gyök scavenger használatával nem tudtunk szignifikáns hatást kimutatni. A protektív hatás a kiindulási ponttól fokozatosan növekszik, és 39,0 $\mu\text{mol/L}$ oxigénkoncentrációtól (3,0% O₂-t használva) a hatás már nem erősödik. A KSCN védő hatása 50,7 és 67,3 $\mu\text{mol/L}$ (3,85 és 5,1% O₂) oxigénkoncentrációknál a *t*-butanolnál kisebb. A fenti koncentrációknál a két gyökfogónál kapott OER (oxygen enhancement ratio) különbségei 0,19, illetve 0,12 (1. táblázat).

A protektív hatás jellemzésére megállapíthatjuk, hogy a két vegyület használatával a 2,2%-os oxigénnél kapott OER értékek (1,22 és 1,24) megfelelnek az 1,2%-os (1,28) oxigénnél kapott effektusnak (1. táblázat). Magasabb oxigénkoncentrációnál hasonló elemzés szerint a 100%-os oxigénnél kapott OER értékek (2,15 és 2,18) a 21%-os oxigénnél megfelelő szintet mutatják.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy anoxiás körülmények között a 0,1 mol/L koncentrációban alkalmazott KSCN és *t*-butanol nem befolyásolja a

I. táblázat

Bacillus megateriumnál kapott OER értékek különböző gázkörnyezetben 0,1 Mol/L t-butanol és KSCN jelenlétében

Table I. OER values for Bacillus megaterium in the presence of 0,1 mol/L KSCN and t-butanol at various oxygen concentrations

Gázkörnyezet		OER		
Gázkeverék tf% O ₂	Oxigénkoncentráció a szuszpenzióban μmol	Oxigén	Oxigén + KSCN	Oxigén + t-butanol
Nitrogén	0,0066	1,00	1,03	0,97
0,5	7,3	1,19	1,14	1,13
1,2	15,8	1,28	1,21	1,20
2,2	29,0	1,41	1,22	1,24
3,0	39,0	1,66	1,34	1,29
3,85	50,7	1,73	1,60	1,41
5,1	67,3	1,86	1,74	1,62
21	277	2,14	1,98	2,01
100	1320	2,31	2,15	2,18

Bacillus megaterium spórák sugárérzékenységet. Növelve az oxigénkoncentrációt protektív hatást tapasztalunk, mely 39,0 μmol/L-ig növekszik, majd a relatív védőhatás nem változik. Lényeges különbséget a KSCN és a t-butanol hatásánál nem tapasztaltunk. Eredményeink nincsenek összhangban POWERS korábbi megállapításaival [4]. Szerinte a t-butanolnak nincs hatása 5%-nál magasabb oxigén koncentrációknál.

Véleményünk szerint az általunk kimutatott protektív hatás az alábbi feltételezésekkel magyarázható:

– a $\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2$ reakció nem általános érvényű, melynek egyszerűsített sémája a következő:



– a hidroxil szabad gyök egymagában nem károsító komponens.

E feltételezések igazolására meg kell állapítani az aktuális H_2O_2 mennyiségét különböző oxigénkoncentrációknál, scavengerrel és anélkül.

A tiocianát ion viselkedése nagymértékben függ a környezeti feltételektől. ADAMS lizozim enzimaktivitását vizsgálva nem tudott védőhatást kimutatni [1]. Feltételezése szerint a tiocianát ion reagál a hidroxil szabad gyökkel, és a képződött radikál ion a $\cdot\text{OH}$ -lal megegyező effektivitással rendelkezik, így védőhatást nem hozhat létre.



Eredményeink alapján az általunk alkalmazott gázkörnyezetben ettől eltérő reakciók játszódhatnak le.

Végezetül hangsúlyozni kívánjuk, hogy a hidroxil szabad gyökfogók hatása nagymértékben függ a környezeti feltételektől (gázkörnyezet, koncentráció, tesztorganizmus), ezért általános érvényű törvényszerűségek levonása igen bonyolult feladat.

Összefoglalás

KSCN és *t*-butanol sugárérzékenységre gyakorolt hatását vizsgáltuk különböző oxigénkoncentrációknál, *Bacillus megaterium* spórákon. Megállapítottuk, hogy anoxiás körülmények között e két vegyület 0,1 mol koncentrációban nem befolyásolta a sugárérzékenységet. Növekvő oxigénkoncentrációnál protektív hatást tapasztaltunk, mely 39 μ mol O₂-ig erősödik, majd a relatív védőhatás nem változik. Lényeges különbséget a KSCN és a *t*-butanol hatásánál nem tapasztaltunk.

IRODALOM

1. ADAMS, G. E., WILLSON, R. L., ALDRICH, J. E. and CUNDAL, R. B. (1969) On the mechanism of the radiation-induced inactivation of lysozyme in dilute aqueous solution. *Int. J. Radiat. Biol.*, **16**, 333–342.
2. EWING, D. (1975) Two components in the radiation sensitization of bacterial spores by p-nitroacetophenone: The OH component. *Int. J. Radiat. Biol.*, **23**, 165–176.
3. EWING, D. and POWERS, E. L. (1980) Oxygen-dependent sensitization of irradiated cells. In: MEYN, R. E. and WITHERS, H. R. (ed.): *Radiation biology in cancer research*. Raven Press, New York, 143–168.
4. EWING, D. and POWERS, E. L. (1976) Irradiation of bacterial spores in water: Three classes of oxygen dependent damage. *Science*, **194**, 1049–1050.
5. POWERS, E. L. (1972) The hydrated electron, the hydroxyl radical, and hydrogen peroxide in radiation damage in cells. *Isr. J. Chem.*, **10**, 1199–1211.
6. RICHMOND, R. C. and POWERS, E. L. (1974) Modification of radiation sensitivity of bacterial spores by silver salts. *Radiat. Res.*, **58**, 470–480.
7. SIMIC, M., NETA, P. and HAYON, E. (1973) Reactions of hydroxyl radicals with unsaturated aliphatic alcohols in aqueous solution. A spectroscopic and electron spin resonance study. *J. Phys. Chem.*, **77**, 2662–2667.
8. TALLENTIRE, A. and JACOBS, G. P. (1972) Radiosensitization of bacterial spores by ketonic agents of differing electron-affinities. *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 205–213.

THE EFFECT OF HYDROXYL RADICAL SCAVENGERS ON THE RADIOSENSITIVITY OF *BACILLUS MEGATERIUM* SPORES

Gazsó, L. G. and *Tallentire, A.

National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest, Hungary, and
* University of Manchester, Department of Pharmacy, Manchester, U. K.

Radiation modifying action of KSCN and *t*-butanol was studied on *Bacillus megaterium* spores at different oxygen concentrations. No effect of these agents was observed spores in anoxia. Increasing concentration in oxygen, these compounds protect spores to a small extent against lethal damage. Similar effect was obtained with both hydroxyl radical scavengers.

DIVERZITÁSI INDEXEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA MORTALITÁSI ADATOKON

IZSÁK JÁNOS

Pénzügyi és Számviteli Főiskola Zalaegerszegi Intézete, Zalaegerszeg

Beérkezett: 1982. január 5-én

Kulcsszavak: diverzitási indexek, diverzitás komponensei, életkori változások, halálóki struktúra

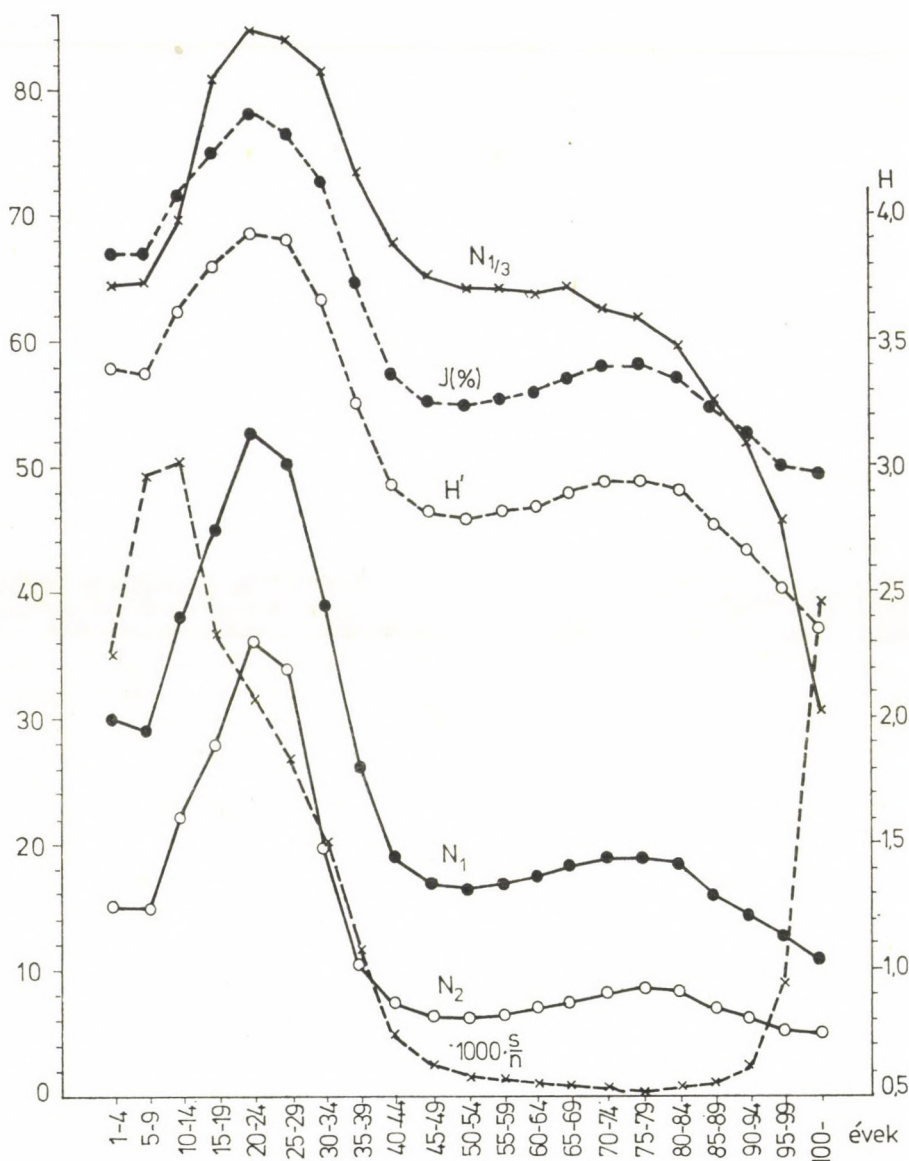
Bevezetés

Elsősorban talán ökológusok a megmondható, milyen nagy számban jelennek meg manapság a szakirodalomban diverzitási kérdésekkel foglalkozó közlemények. Az ökológia mellett a cönológia és a környezetvédelmi kutatások terén is igen elterjedtek a diverzitási vizsgálatok. Felvethető a vizsgálati apparátus epidemiológiai adaptációja is [12]. Mint egy kitűnő bibliográfiából kiderül [6], a nemzetközi szakirodalomban már 1979-ig ezernél több cikk foglalkozott a diverzitás kérdéseivel. A problémakör a hazai biológusok körében sem egészen ismeretlen; a különféle diverzitási indexek számítása és vizsgálata itthon is terjedőben van. A diverzitási vizsgálatok matematikai alapjai és a felmerülő statisztikai problémák azonban a felhasználó biológusok számára gyakran távoliak. A kérdéskör matematikus művelőinek „jövöltábol” az egyre nagyobb mértékű absztrakció miatt némi közvetítés nélkül szinte elérhetetlenek, esetleg érdektelenek is a legújabb matematikai fejlemények, melyek biológiai interpretálása a diverzitási kutatások gyenge láncszeme.

Azok a biológus kutatók, akik a diverzitás kérdéskörének nem specialistái, leggyakrabban a SHANNON—WEAVER-féle $H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log p_i$ információs index használatára szorítkoznak (jelöléseket 1. alább). Minthogy azonban a különféle diverzitási mutatók némileg eltérő következtetésekre vezethetnek, ajánlatos a diverzitás változásait többféle diverzitási index tükrében vizsgálni. Abban bízva ismertetjük a diverzitási indexek statisztikai viselkedésére vonatkozó tapasztalatainkat, hogy ez a diverzitási kérdésekkel most ismerkedő biológusok számára hasznos lehet.

Vizsgálati anyag és módszer

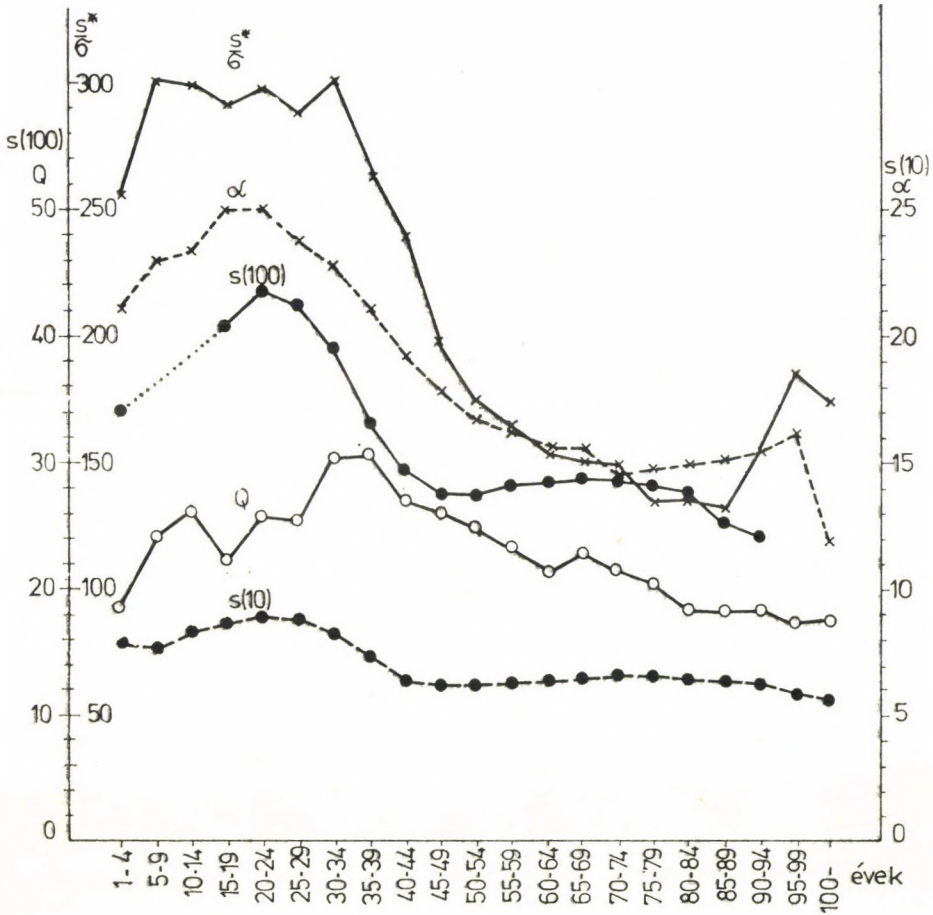
A vizsgálat alapját képező 1974-es és 1975-ös halálóki statisztika az Egyesült Államok Egészségügyi Évkönyvéből származik [25, 26]. Ebben a Betegségek Nemzetközi Osztályozásának (BNO) háromjegyű kategóriáiba sorolt halálesetek 5 éves korcsoportok, nemek és rasszok szerint szerepelnek. A diverzitási értékeket is ezen bontás szerint számoltuk a két évfolyam fehér férfiakra



1. ábra. Diverzitási indexek életkor szerinti változása halálóki statisztikán. $N_{1/3}$, N_1 és N_2 : az 1/3, 1, ill. 2 paraméterű HILL-index, H' : SHANNON-index, J : relatív BRILLOUIN-index, s/n : nem-üres kategóriák és összelemszám hányadosa

Fig. 1. Change of diversity indices according to age groups on cause of death statistics. $N_{1/3}$, N_1 , N_2 : 1/3, 1, 2 parameter HILL's index, H' : SHANNON index, J : relative BRILLOUIN index, s/n : quotient of non-empty categories and total number of death-cases. Except for s/n , the changes in the indices according to age are practically equal. Diversity grows up to the 20th–24th year of age, after the maximum here, it decreases. The hollowing for the middle age groups is characteristic

vonatkozó haláloki frekvenciáinak összevonása után. A vizsgálatba az I., II., III., VI., VII., VIII., IX., X. és XIV. betegség főcsoport mindazon BNO kategóriáját bevontuk, melyeket az említett epidemiológiai statisztika nem egyéb kategóriákkal összevonva közöl. Ily módon azon halálesetek összességének diverzitását vizsgáltuk, melyeket a haláloki diagnózis a vizsgálatba bevont 161 BNO-kategória valamelyikébe sorolt. A diverzitási grafikonok (1. és 2. ábra) az egymást követő 5 éves korcsoportok diverzitási index értékeit ábrázolják. Az első korcsoport (1–4 évesek) a többitől eltérően csak 4 életévet fog át, mert a 0 évesek (csecsemők) csoportját leválasztottuk a 0–4 évesek csoportjából.



2. ábra. További diverzitási indexek életkor szerinti változásai. s(10) és s(100) a 10, ill. 100 paraméterű HURLBERT-index, Q, α és s*/σ értelmezését l. a szövegben

Fig. 2. Changes of the other diversity indices according to age. s(10) and s(100) are the 10 and 100 parameter HURLBERT index, the interpretation of Q, α and s*/σ see in the text. In case of s(10), s(100) and α the characteristics outlined in Fig. 1. are totally, in case of s*/σ and Q they are partially valid

Tekintsük elemeknek valamely (nem feltétlenül véges) halmazát és s számú kategóriát úgy, hogy minden elem pontosan egy kategóriához tartozzék. Jelöljük p_i -vel ($i = 1, 2, \dots, s$) annak valószínűségét, hogy egy találmásra választott elem az i -edik kategóriába esik. Valamely diverzitási index ezen valószínűségek halmazához rendel olyan mérőszámot, mely a megoszlás valamilyen értelemben vett egyenletességét hivatott mérni. Ha a halmazból n elemű mintát veszünk és a kategóriákba rendre n_1, n_2, \dots, n_s elem esik ($n_1 + n_2 + \dots + n_s = n$), akkor ezen sorozat révén a diverzitási index becsléséhez juthatunk. A becslés legkézenfekvőbb, bár nem minden esetben legszerencsésebb módja az, hogy a p_i valószínűségeket az n_i/n relatív gyakoriságokkal helyettesítjük.

Az utóbbi évtizedekben diverzitási indexek tucatjait írták le, ill. használták — elsősorban az ökológiában [1, 4, 7, 8, 15, 18, 19, 23, 27]. Nem vállalkozhatunk sem a részletes történeti áttekintésre, sem a metodikai problémák teljes áttekintésére. Az alábbi „diverzitási index” esete azonban talán jól illusztrálja megfelelő diverzitási indexek keresésének szükségességét. Első pillantásra az s/n hányados a lehető legkézenfekvőbb diverzitási indexnek tűnhet. Használata mégis egyértelműen elvethető! Ha ugyanis az esetszám n -ről pl. $2n$ -re nő, akkor a nem üres kategóriák száma s -ről nyilván aligha növekszik kétszeresére. Emiatt n növelésekor s/n egyre kisebb lesz, tehát s/n a teljes populációra nézve nem informatív mérőszám. Az 1. ábrán bemutatjuk az s/n értékek grafikonját (l. még a Diskussziót).

A korábban említett SHANNON-index már jól használható diverzitási index, azonban minden igényt egymagában — csakúgy, mint a többi diverzitási index — nem elégíti ki. Például H' nem kellően érzékeny a kis frekvenciákra [16, 17], ami több probléma forrása lehet. Az is ismeretes, hogy H' -nek leggyakrabban használt $\check{H}' = - \sum_{i=1}^s n_i/n \ln n_i/n$ becslése lefelé torzít, azaz átlagosan kisebb az értéke a valóságos H' értéknél [2].

A fentebb leírt epidemiológiai statisztikán korábban vizsgáltuk már a diverzitás életkor szerinti változásait és nemek szerinti eltérését [11]. Erre a célra és hasonló tárgyú morbiditási vizsgálatainkra [9, 10] minden esetben az ún. relatív BRILLOUIN-indexet használtuk a diverzitás mérőszámául. Említettük azonban, hogy sokféle diverzitási index ismeretes az irodalomban. Olyan szempontrendszerrel viszont nem lehet alkotni, melynek alapján konkrét vizsgálati anyagra nézve valamely index egyértelműen előnyösebbnek mutatkoznék az összes többinél. Számítani kell arra, hogy egyazon vizsgálati anyag esetében különböző diverzitási indexek más és más jellegzetességet domborítanak ki. Közölt vizsgálataink eredeti célja éppen az volt, hogy képet nyerjünk a halálózási diverzitás életkor szerinti, ill. nemek szerinti változásának a diverzitási index választásától való függéséről.

Vizsgálati anyagunkra az alábbi diverzitási indexeket számítottuk ki:

a) A H' SHANNON-indexet a $\check{H}' = - \sum_{i=1}^s n_i/n \ln n_i/n$ becsléssel. A becslés (lefelé) torzításáról és a kis frekvenciák háttérbe kerüléséről fentebb szoltunk.

b) A HILL-féle N_a indexcsalád indexeit $a = 1/3, 1$ és 2 paraméterrel. N_a képlete [7]:

$$\left(\sum_{i=1}^s p_i^a \right)^{\frac{1}{1-a}}, \text{ ha } a \neq 1, \text{ és } N_1 (= \lim_{a \rightarrow 1} N_a) = \exp \left(- \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i \right).$$

Rögzített p_1, p_2, \dots, p_s valószínűségek mellett N_a értéke a növekedtével csökken. Nevezetes továbbá, hogy minél nagyobb az a paraméter, annál inkább hangsúlyozza N_a a domináns frekvenciákat. A HILL-indexek bevezetése RÉNYI általánosított entrópia-fogalmán [22] alapult. Az N_a indexek használt \hat{N}_a becslései:

$$\hat{N}_{1/3} = \left(\sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{n} \right)^{1/3} \right)^{\frac{1}{1-1/3}}, \quad \hat{N}_1 = \exp \left(- \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n} \right) \text{ és } \hat{N}_2 = \frac{n(n-1)}{\sum_{i=1}^s n_i(n_i-1)}.$$

A becslések sajnos nem torzítatlanok; $\hat{N}_{1/3}$ és \hat{N}_1 lefelé torzít, \hat{N}_2 pedig felfelé. E három index együttese már minden bizonnyal alkalmas arra, hogy a kis frekvenciákra való érzékenységek az a paramétertől függését konkrét anyagunkon megvizsgáljuk.

c) A HURLBERT-féle $s(m)$ indexeket a

$$\sum_{i=1}^s [1 - (1 - p_i)^m] \quad (m = 1, 2, \dots)$$

képlet definiálja [8]. m növekedtével $s(m)$ egyre érzékenyebb lesz a kis frekvenciákra. Adatainkra $s(10)$ és $s(100)$ értékeit számoltuk ki. $s(m)$ jelentése: taláalomra választva a sokaságból m számú elemet, az általuk képviselt kategóriák száma várhatóan $s(m)$. Becslése:

$$\hat{s}(m) = \sum_{i=1}^s \left(\left(1 - \binom{n-n_i}{m} \right) / \binom{n}{m} \right) \quad (m \leq n),$$

ahol $(:)$ a binomiális együttható jele. Ez minimális szórású torzítatlan — tehát igen előnyös tulajdonságú — becslése $s(m)$ -nek [24].

d) Relatív BRILLOUIN-index. Képlete: $J = H/H_{\max}$, ahol

$$H = \frac{1}{n} \ln \frac{n!}{\prod_{i=1}^s n_i!}$$

a BRILLOUIN-index, H_{\max} pedig H -nak az adott n és s mellett lehetséges maximális értéke [21]. Alapvetően eltér a fentiektől és a továbbiaktól is abban, hogy a H_{\max} -mal való normalálás megoldja a szokásos skálázási problémát. J kifejezetten az eloszlás egyenletességét (evenness) méri. Erre a kérdésre még visszatérünk. A BRILLOUIN-index alkalmazása azon felfogás jegyében történhet, hogy adatainkat nem valamely nagyobb populációból származó mintának tekintjük, hanem a teljes vizsgálandó sokaságnak (ún. fully censored population) [20, 21]. Itt tehát a mintavétel és becslés kérdése fel sem merül. (A többi

indextől eltérően J értékei nem az összevont 1974—1975-ös adatokra, hanem a fehér férfiak 1975-ös halálói adataira vonatkoznak.)

e) A logaritmikus sor α paramétere. A frekvenciákhoz illesztett

$$\frac{\alpha x^r}{r} \quad (r = 1, 2, \dots)$$

logaritmikus sor α paramétere a diverzitás klasszikus mérőszáma akkor, ha az illeszkedés megfelelő [5, 27]. A vizsgált halálói frekvenciák esetében ez nem mondható el [13], azonban α -t gyakran ilyen esetben is ajánlják diverzitási indexként [14].

f) A Q diverzitási index. A p_i valószínűségek alsó, ill. felső kvartiliséit $p_{s/4}$ -gyel, ill. $p_{3s/4}$ -gyel jelölve, a

$$Q = s/2 \log (p_{s/4}/p_{3s/4})$$

mennyiség a diverzitásnak újabban többek által javasolt mérőszáma [15]. Használt becslése:

$$\hat{Q} = s/2 \log (n_1/n_2),$$

ahol n_{s_1} és n_{s_2} a csökkenőleg rendezett frekvenciák közül az $\left[\frac{s}{4} \right]$ -edik, ill. $\left[\frac{3s}{4} \right]$ -edik ([] az egészrész képzés jele).

g) Az s^*/σ index. Korábbi vizsgálataink szerint az adott frekvenciákhoz jól illeszthető csökkentett lognormális eloszlás [13]. Az illesztés kapcsán a teljes (elméleti) populáció kategóriaszámának s^* becslése kapható, ami természetesen soha nem kisebb a tapasztalati s kategóriaszámnál. σ -val jelölve a frekvenciák logaritmusainak szórását, az s^*/σ mennyiség szintén diverzitási mérőszámnak tekinthető [14]. Ha a lognormalitás fennáll, akkor $E(Q) = 0,371 s^*/\sigma$, vagyis az e -beli Q az s^*/σ -nak átlagosan 0,371-szerese [16].

A diverzitási indexek kiszámítása FORTRAN program segítségével történt.

Eredmények és diszkusszió

Az eredmények bemutatásában és diszkussziójában az 1. és 2. ábra grafikonjaira támaszkodunk.

Az 1. ábra grafikonjaival kapcsolatban a vizsgált diverzitási indexek alábbi statisztikai tulajdonságaira hívhatjuk fel a figyelmet: A H' , $N_{1/3}$, N_1 és N_2 indexek grafikonjainak lefutása igen hasonló. Kissé eltér N_1 és N_2 grafikonjától $N_{1/3}$ grafikonja, főképp abban, hogy a másik két görbén a középső korcsoportoknál látható beöblösödés itt eltűnik. Ennek oka az, hogy a vezető halálokok 45—50. év körüli igen nagyfokú dominanciája a vezető frekvenciákra kevésbé érzékeny $N_{1/3}$ index értékét kisebb mértékben csökkenti, mint az N_1 és N_2 index értékét. A három grafikon egymáshoz viszonyított helyzete arra vezethető vissza, hogy az a szerinti monoton csökkenés folytán $N_{1/3} > N_1 > N_2$.

A relatív (!) BRILLOUIN-index (J) grafikonja igen nagy mértékben hasonlít N_1 és N_2 grafikonjára. Ez figyelemre méltó, mondhatni váratlan jelenség.

A diverzitás vizsgálatára aligha alkalmas s/n értékek grafikonja az N_a , H' és J indexek grafikonjaitól egyaránt jelentősen eltér, és az összes halálesetek számának alakulásával van közvetlen kapcsolatban.

A 2. ábra grafikonjairól:

Az $s(100)$ és $s(10)$ indexek grafikonjai igen hasonló természetűek, és nagyon hasonlítanak az 1. ábra H' , N_a és J grafikonjaira. Megállapíthatjuk, hogy az m paraméter 10-ről 100-ra növelése az index érzékenységét nem befolyásolja lényegesen.

Hasonlít az eddig említett grafikonokra α grafikonja is. Az eltérés a 45–50. év körüli beöblösödés hiányában és az utolsó korcsoportokra eső emelkedő szakaszban jelölhető meg.

Lényegesen eltér az összes eddigi grafikontól Q grafikonja. Először is az igen nagy elemszámokat tekintve váratlanul szeszélyes lefutású. Ennek oka, hogy Q csak az alsó és a felső kvartilist képező két frekvenciára támaszkodik, ellentétben a többi diverzitási indexszel, melyek értékének kialakításában minden frekvenciának van szerepe. Az alapvető eltérés azonban abban van, hogy Q grafikonjának a korábban tárgyalt grafikonokénál 15 élettévvel később van maximuma. Másrészt az előző grafikonokkal rokon vonásokat is megfigyelhetünk.

s^*/σ grafikonja a többieknél jobban emlékeztet Q grafikonjára. Ez a Q és s^*/σ között fennálló korábban említett összefüggéssel lehet kapcsolatban.

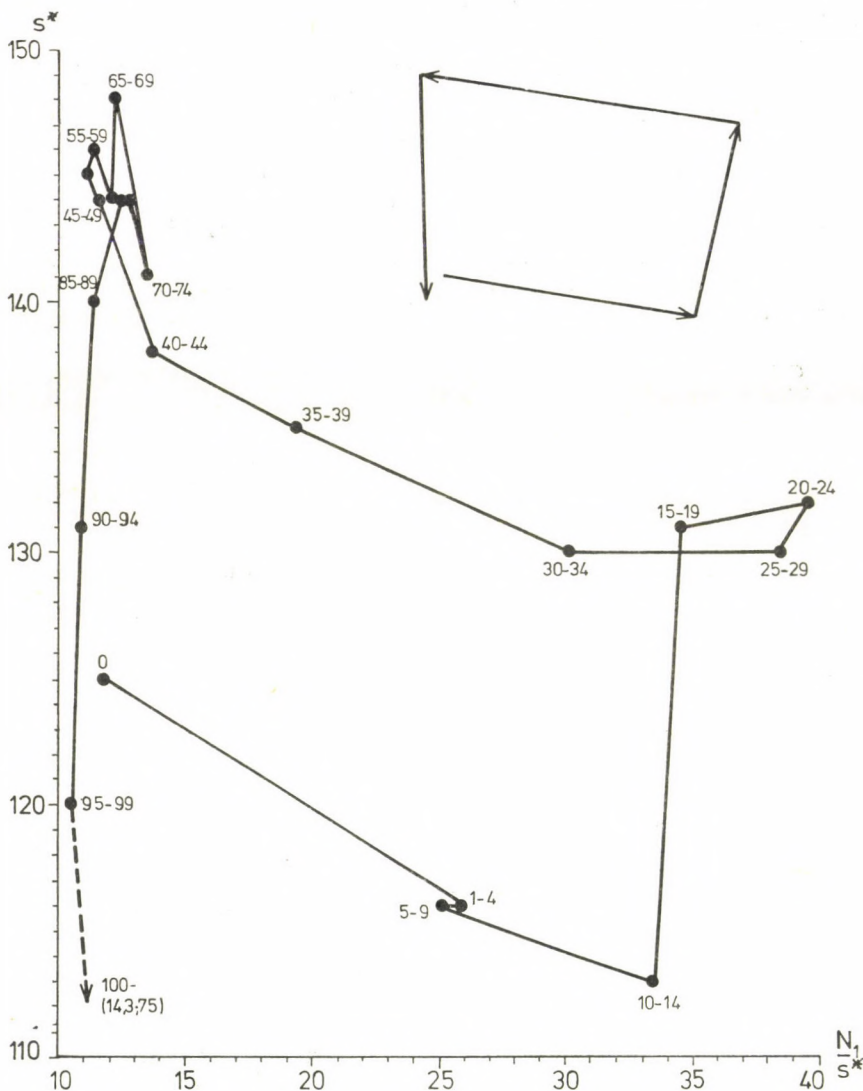
A diverzitási fázisgörbe

A diverzitásnak két komponense van: az előforduló minőségi kategóriák száma és az elemek megoszlásának egyenletessége ezen kategóriák körében. Az irodalomban ezek megnevezésére a „richness” (bőség) és az „evenness” (egyenletesség) kifejezés használatos. A diverzitási indexek egy része (az ún. richness, ill. evenness indexek) az előbbi komponensek valamelyikét méri, az ún. összetett indexek értékét viszont mindkét komponens befolyásolja. Richness index például a lognormális illesztés kapcsán számítható s^* elméleti kategóriaszám, evenness index például — mint korábban említettük — a J relatív BRILLOUIN-index. Az evenness indexek széles köre J -hez hasonlóan Δ/Δ_{\max} alakú, ahol Δ valamely összetett diverzitási index, Δ_{\max} pedig az adott összelemszámhoz és kategóriaszámhoz tartozó maximális Δ érték. Könnyen beláthatjuk, hogy az N_a indexek esetében $N_{a \max}$ mindig N_a/s vagy N_a/s^* aszerint, hogy a tapasztalati vagy az elméleti kategóriaszámot vesszük-e alapul. Az összetett indexekhez tartoznak például az $s(m)$, N_a , H' , H indexek, minthogy ezeket mind a kategóriák száma, mind a megoszlás egyenletessége befolyásolja.

Az összetett diverzitási indexek kétségtelen előnye, hogy értékük kialakításában a richness és az evenness komponens egyaránt szerepet játszik, továbbá alkalmasak különböző populációk diverzitásának számszerű összevetésére. Újabban azonban egyre gyakrabban vetik fel a kérdést: elegendő-e a diverzitási attributum leírására egyetlen paraméter. Nyilvánvaló, hogy több diverzitási paraméterrel pontosabb leírást adhatunk. Másrészt viszont valószínű, hogy két paraméter — például a (richness, evenness) pár — használata már elégséges [3]. Ha két diverzitási paraméter időbeli változását kívánjuk nyomon követni, akkor igen előnyös lehet a richness — evenness fázisítkban való

megjelenítés [3]. Röviden beszámolunk ezen elemzési móddal nyert tapasztalatainkról.

Adatainkra az $\left(s^*, \frac{\hat{N}_1}{N_{1\max}}\right) = \left(s^*, \frac{\hat{N}_1}{s^*}\right)$ párokat ábráztuk, összekötve az időben egymást követő állapotokat (3. ábra). Eltekintve a kisebb változá-



3. ábra. A diverzitási fázisgörbe az N_1/s^* evenness-index és s^* richness-index együttes változását szemlélteti

Fig. 3. The diversity phase curve shows the simultaneous changes in the N_1/s^* evenness-index and s^* richness-index

sok követésétől — ezek részben amúgy is mintavételi ingadozásokból eredhetnek — a 3. ábrán betétként látható séma szerint karakterizálhatjuk az egyenletesség és kategóriaszám együttes változását. Megállapíthatjuk, hogy a változás természete és mértéke életkoronként egészen eltérő képet mutat. Különösen hasznosnak gondoljuk a fázisokban történő ábrázolást a diverzitás időbeli változásainak modellezésekor a modell alkalmasságának vizsgálatára.

A konkrét eredmények ismertetése után talán célszerű külön is kitérni azon általánosabb kérdésre, hogy milyen esetben melyik diverzitási index használata ajánlható. A válasz a lehetséges körülmények sokrétűsége miatt teljes általánosságban nem előlegezhető meg, azonban elmondható néhány irányelv. Először is, a diverzitási index megválasztásakor két különböző szempontot kell szem előtt tartani: egyrészt tisztázandó, hogy a kis, a közepes vagy a domináns frekvenciáknak szánunk-e nagyobb szerepet a diverzitási index kialakításában. Más oldalról azt kell figyelembe vennünk, hogy kis vagy nagy mintáról van-e szó.

Az első szempont tekintetében a vizsgálati koncepció a meghatározó. Például populációdinamikai diverzitásvizsgálat alkalmával hiba lenne a kis frekvenciák szerepének háttérbe szorítása. A kis frekvenciájú géneknek a diverzitási index kialakításában is célszerű evolúciós szerepükhöz hasonlóan számszerű arányuknál lényegesen nagyobb szerepet adni. Az irodalom és saját tapasztalataink alapján azt mondhatjuk, hogy pl. az $N_{1/3}$ vagy $N_{1/2}$ HILL-féle diverzitási index biztosítja a kis frekvenciák kellő szerepét. (Szélsőséges esetként, N_0 választásával a nem üres kategóriák pusztaszáma is „visszakapható”, mely persze már semmiféle aránystruktúráról nem informál.) Hasonló eredményt érhetünk el az $s(m)$ indexszel, ha az m paramétert nagyoknak (az n összesetszámhoz közelinek) választjuk.

Más esetekben fontosabb lehet a domináns frekvenciák aránystruktúrájának előtérbe helyezése. Például a haláloki struktúra diverzitásának tanulmányozásakor a „nagy” mozgások figyelemmel kísérésére gyakran a vezető 20–30 halálok szerepét hangsúlyozó diverzitási indexet kell választani. Praktikus szempont is szolgálhat a kis frekvenciák háttérbe szorítása mellett: epidemiológiai statisztikák készítésekor például a ritka diagnózisokat legtöbbször „egyéb” kategóriá(k)ba gyűjtik. Ekkor a kis frekvenciák bevonásáról eleve le kell mondanunk. Az ebből adódó torzítás nyilván a kis frekvenciákat nem hangsúlyozó diverzitási indexek esetében csekélyebb. A domináns (és kisebb mértékben a közepes) frekvenciák hangsúlyozására alkalmas diverzitási index lehet N_1 , N_2 , H' vagy $s(2)$.

A kiugróan nagy és az egészen kicsiny frekvenciájú kategóriák szerepének együttes kiiktatására hivatott Q index bizonyos entomológiai és florisztikai statisztikák esetében vált be [15, 16, 17], a mi epidemiológiai anyagon nyert eredményeink óvatosságra készítetnek. Q használata egyébként is csak nagy számú (100 körüli) kategória esetén jöhet szóba.

A mintavételi szempontok vonatkozásában nem a vizsgálati koncepció, hanem a matematikai statisztikai kérdések figyelembevételével kell döntőnk. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy az $\hat{s}(m)$ becslés torzítatlansága a HURLBERT-indexeknek nagy előnyt ad a HILL-indexekkel szemben. Csak hogy ez az előny nem mindig érvényesíthető. Vizsgálataink során ugyanis általában több populáció diverzitását kívánjuk összevetni. Ha a populációk nagysága lényegesen eltérő — mint epidemiológiai vizsgálataink esetében is —,

akkor nem választható olyan közös m paraméter, mely mellett $s(m)$ minden populációra nézve kellő mértékben hangsúlyozná a kis frekvenciákat. A HILL-indexek esetében viszont ilyen problémával nem kell számolnunk. Ezért aztán gyakran nehéz választanunk a torzítatlanságot biztosító $s(m)$ és az egyöntetű érzékenységet nyújtó N_a indexek között.

Végül is a tárgyalat diverzitási indexek használatát illetően tanácsunkat a következőképpen vázolhatjuk:

— ha a kis frekvenciáknak is súlyt akarunk adni, akkor nagy esetszám mellett a diverzitásnak alkalmas mérőszáma lehet az $N_{1/3}$ vagy $N_{1/2}$ index. Kis esetszám és közel azonos populációméret mellett pedig olyan $s(m)$ index ajánlható, ahol m az n összesetszámnál alig kisebb paraméterérték.

— ha a kis frekvenciáknak nem akarunk súlyt adni, akkor nagy esetszám mellett N_1 , N_2 , H' vagy $s(2)$ használata, kis esetszám mellett például $s(2)$ használata javasolható.

— ha a kiugróan nagy és az egészen kicsiny frekvenciákat teljesen mellőzni kívánjuk, akkor Q használata jöhet szóba. (Az α és az s^*/σ diverzitási index használata csak illesztési vizsgálatok után vetődhet fel.)

Összefoglalás

Összefoglalva a grafikonok leírását, megállapíthatjuk, hogy az egészen eltérő természetű diverzitási indexek meglepően hasonló módon tudósítanak a diverzitás életkor szerinti változásairól. Például szinte egységesen a 20–24 évesek csoportjánál mutatják a diverzitás maximumát, melyet többnyire gyorsabb, majd lassúbb ütemű diverzitáscsökkenés követ. Gyakori a 45–50. év körüli beöblösődés is, amit minden bizonnyal civilizációs hatásnak tulajdoníthatunk. (Ez a néger férfiaknál kisebb mértékű, nőknél pedig gyakran el is marad [11].) Konkrét anyagunk esetében tehát a számított diverzitási indexek mindegyike szóba jöhet diverzitási mérőszámként. Egyedül a Q és s^*/σ indexek grafikonjainak helyenként szeszélyes viselkedése kedvezőtlen, és a többiekétől eltérő lefutásuk elgondolkodtató.

Igyekeztünk konkrét vizsgálati anyagunktól némiképpen elvonatkoztatva, általános tanácsokat vázolni az alkalmas diverzitási index választásához. Arra a következtetésre juthattunk, hogy minden szempontból legelőnyösebb diverzitási index nincsen. Másrészt viszont a grafikonok meglehetősen egyöntetű lefutása arra utal, hogy nagy esetszámok mellett egészen különböző diverzitási indexek is hasonló módon tudósíthatnak a diverzitás változásairól. Ami a mindmáig legelterjedtebb H' SHANNON-indexet illeti, diverzitási grafikonjaink hasonlósága arra utal, hogy használata semmiképpen sem elvetendő. Használatakor azonban nem állíthatjuk be a kis frekvenciákra való érzékenységet. Továbbá kis elemszámok mellett zavaró lehet a becslés (lefelé) torzítása. H' helyett az $N_1 = \exp(H')$ index használata mellett szól az N_1 becslés közel normális eloszlása is [16], ami statisztikai szempontból jól kihasználható körülmény.

Végül megállapíthatjuk, hogy az ismertetett fázisgörbe elemzése az időbeli diverzitásváltozások vizsgálatának különösen alkalmas eszközévé válhat.

IRODALOM

1. AUCLAIR, A. N. and GOFF, F. G. (1971) Diversity relations of upland forest in the western Great Lakes area. *American Naturalist*, **105**, 499—528.
2. BASHARIN, G. P. (1959) On a statistical estimate for the entropy of a sequence of independent random variables. *Theory of Probability and Its Applications*, **4**, 333—336.
3. ENGEN, S. (1979) Some basic concepts of ecological equitability. In: *Ecological Diversity in Theory and Practice*. International Co-operative Publishing House, Fairland, Maryland
4. FAGER, E. W. (1972) Diversity: A sampling study. *American Naturalist*, **106**, 293—310.
5. FISHER, R. A., CORBET, A. S. and WILLIAMS, C. B. (1943) The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.*, **12**, 42—58.
6. GRASSLE, J. F., PATIL, G. P., SMITH, W. K. and TAILLIE, C. (eds.) (1979) *Ecological Diversity in Theory and Practice*. International Co-operative Publishing House, Fairland, Maryland
7. HILL, M. O. (1973) Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, **54**, 427—432.
8. HURLBERT, S. H. (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, **52**, 577—586.
9. IZSÁK, J. and JUHÁSZ-NAGY, P. (1979) Morbiditási adatsorok diverzitásának vizsgálata *Biológia*, **27**, 177—183.
10. IZSÁK, J. and JUHÁSZ-NAGY, P. (1980) Diversity studies on Hungarian mortality statistics. *Annales Univ. Sci. Budapest, Sectio Biol.* (in press)
11. IZSÁK, J. and JUHÁSZ-NAGY, P. (1980) Halálozási diverzitás korcsoportok és nemek szerinti vizsgálata. Számítástechnikai és kibernetikai módszerek alkalmazása az orvostudományban és a biológiában. 10. Kollokvium anyaga, Szeged, 127—135.
12. IZSÁK, J. and JUHÁSZ-NAGY, P. (1982) Betegségmintázatok vizsgálatáról. *Magyar Tudomány*, **27**, 39—43.
13. IZSÁK, J. and JUHÁSZ-NAGY, P. (1982) Studies of lognormality on mortality statistics. *Biometrical Journal*, **24**, 731—741.
14. KEMPTON, R. A. and TAYLOR, L. R. (1974) Log-series and log-normal parameters as diversity discriminants for the lepidoptera. *J. Anim. Ecol.*, **43**, 381—399.
15. KEMPTON, R. A. and TAYLOR, L. R. (1976) Models and statistics for species diversity. *Nature*, **262**, 818—820.
16. KEMPTON, R. A. and WEDDERBURN, R. W. M. (1978) A comparison of three measures of species diversity. *Biometrics*, **34**, 25—37.
17. KEMPTON, R. A. (1979) The structure of species abundance and measurement of diversity. *Biometrics*, **35**, 307—321.
18. PATIL, G. P. and TAILLIE, C. (1979) An overview of diversity. In: *Ecological Diversity in Theory and Practice*. International Co-operative Publishing House, Fairland, Maryland
19. PEET, R. K. (1974) The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, 285—307.
20. PIELOU, E. C. (1966) Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J. Theor. Biol.*, **10**, 370—383.
21. PIELOU, E. C. (1975) *Ecological Diversity*. Wiley and Sons, New York
22. RÉNYI, A. (1961) On measures of entropy and information. Proc. 4th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, **1**, 547—561.
23. SIMPSON, E. H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, **163**, 688.
24. SMITH, W. and GRASSLE, J. F. (1977) Sampling properties of a family of diversity measures. *Biometrics*, **33**, 283—292.
25. Vital Statistics of the U. S. 1974, Vol. 2, Mortality (1978) U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Govt. Print. Off., Washington, 1-186—1-251.
26. Vital Statistics of the U. S. 1975, Vol. 2, Mortality (1979) U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Hyattsville, 1-186—1-251.
27. WILLIAMS, C. B. (1964) *Patterns in the Balance of Nature*. Academic Press, New York

COMPARATIVE STUDY OF DIVERSITY INDICES ON MORTALITY DATA

Izsák, J.

College of Finance and Accountancy, Zalaegerszeg Institute, Zalaegerszeg, Hungary

Diversity studies have been used for a long time in several fields of biology — especially in ecology — as a means of statistical analysis. The analysis of the diversity indices can be useful in epidemiology, too. Besides the numerous publications related to mathematics, a lot of people have dealt with the empirical characteristics of the different diversity indices, but mainly on zoological and botanical materials. Therefore, after the first epidemiological diversity studies carried out by the so-called relative BRILLOUIN index, we thought in necessary to carry out the diversity studies by other diversity indices. Our studies have been based on the 1974 and 1975 United States mortality statistics so that the number of death cases of the white males for the two years were combined. The categories were made up by 161 ICD categories included in the study. The diversity indices were calculated for 5-year age groups. The change of diversity according to age was shown on *diversity graphs*. The discussion is based primarily on these diversity graphs. The following diversity indices were calculated: SHANNON information index (H'), HILL's diversity index with $\alpha = 1/3, 1$ and 2 parameters ($N_{1/3}, N_1, N_2$), HURLBERT's diversity index with $m = 10$ and 100 parameters [$s(10), s(100)$], the Q index based on the interquartile range, relative BRILLOUIN index (I), and the s^*/σ diversity index related to the fitted lognormal distribution. It can be stated that the curves of the majority of the graphs are rather similar. The diversity peak around the 20th–24th year of age is characteristic, which is usually followed by a monotonous decrease in diversity. In the middle age groups a hollowing is added, which could be due to civilizational influence, and which is emphasized more by the indices more sensitive to greater frequencies. The biggest deviation from the general graph curve can be seen in case of the Q-graph. It is quite noticeable that the curve of the Q-graph in spite of the great number of cases is erratic.

According to the graphs, even nowadays the most used Shannon index calculations could be appropriate in epidemiological statistics, in spite of its limitations. As a summary of our experiences we suggest concrete diversity indices for the different cases of sensitivity to small frequency and of sample size.

Finally, we describe how the simultaneous examination of the richness and evenness components of diversity is possible by the so called diversity phase curve.

KÖNYVISMERTETÉS

Etológiai Szemináriumok 1979. (Szerk.: CSÁNYI VILMOS) Biológiai Tanulmányok c. sorozat (MTA Biológiai Osztálya kiadásában) 8. kötet. Akadémiai Kiadó Bp. 1982.

A viselkedéstan kutatások — ahogy világszerte — így hazánkban is elismerésre és figyelemre méltó előretörésének lehettünk tanúi az utóbbi évtizedben, s ezt bizonyítja az MTA Etológiai Munkabizottsága által kétévenként megrendezésre kerülő konferenciák vitaanyaga is. Az 1979 őszi Szegeden lezajlott vitatülés elméleti témájú előadásainak gyűjteményes köteteként jelent meg a fenti kiadvány. Az ott elhangzott referátumokból válogatva 6 összefoglaló jellegű dolgozatot köt csokorba, ezek az etológia néhány fontos elméleti alapkérdésének legújabb szintézisét tárják az olvasó elé.

Az első dolgozat (SZÉKELY SÁNDOR) a magatartás variabilitását elemzi; ennek során az inter- és intraspecifikus viselkedésbeli eltéréseket, ill. az individuális viselkedés variabilitását külön-külön is taglalja.

HAVAS ISTVÁN és KABAI PÉTER a magatartás struktúrájáról írt összefoglaló áttekintést elsősorban módszertani szempontok alapján (a magatartás-szekvenciák tesztelési módjairól és a magatartás dinamikájáról eddig készült modellekről).

BUZSÁKI GYÖRGY az eddigi klasszikus (pavlovi) és instrumentális tanuláseméletet új megvilágításba helyezve az egységes tanulási törvény szükségességét hangsúlyozza, amely mind az öröklött, mind a szerzett viselkedés elemzésére felhasználható.

CSÁNYI VILMOS is egy új tanuláseméletre irányítja a figyelmet, visszanyúl a magatartásnak az első dolgozatban már tárgyalt variabilitására (ennek fiziológiai, genetikai, evolúciós és ontogenetikus tényezőire), és továbblép a magatartást szabályozó modellek terén, kiemelve a tanulás folyamatának azt a leglényegesebb tulajdonságát, amely a magatartás variabilitásának fokozatos csökkentésében jut kifejeződésre.

NAGY ANDRÁS a magatartásgenetika néhány elméleti kérdését taglalva, kvantitatív genetikai megközelítésben főleg az irányított dominancia meghatározása, a magatartás genetikai felbontása és az egyedi génhatások terén mond sok újat.

Végül a társas magatartás evolúciója témakörében SASVÁRI MÁRIA főleg a mai etológia egyik legvitatottabb területén, az altruizmus evolúcióját, továbbá a HAMILTON-törvényt, a rokonsági teoriát, valamint a szülő és utódai közötti kapcsolatot elemző elméleteket (szülői ráfordítás-, konfliktus-elmélet) teszi vizsgálat tárgyává szociobiológiai alkalmazhatóságuk szempontjából.

Összegezve megállapítható, hogy a válogatott tanulmányok újszerű mondanivalói a legújabb irodalmi adatokra támaszkodó (és irodalomjegyzék segítségével tovább elemezhető) magasszintű, saját, hazai kutatómunkákról tanúskodnak, ezek elméleti eredményeit tárják az olvasó elé. Bár a szerzők érthetőségre törekedtek, a kiadvány jellegénél fogva nem könnyű olvasmány, csak kellő felkészültségűek és az etológia elméleti kérdései iránt fokozott érdeklődést mutatók számára ajánlható.

Széky Pál

PALKOVITS MIKLÓS: *Útmutató és atlasz patkányagy sejtcsoportjainak izolált kivételére.* (Guide and map for the isolated removal of individual cell groups from the rat brain.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980.

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztályának Biológiai tanulmányok sorozatában jelent meg PALKOVITS dr. tanulmánya.

PALKOVITS dr. 1973-ban közölt (*Brain Research*, 59, 449—450, 1973) komoly nemzetközi sikert kiváltott módszerének részletes magyar leírása. Először kerül magyar nyelven e módszer leírásra, amelyet ma már nagyon sokan punching technikának neveznek. A neurokémiai mérő-

módszerek finomodásának következtében a központi idegrendszeri kutatásokban igényként jelentkezett az agy különböző területeinek izolált vizsgálata. A könyv érthetőségét nagymértékben növeli, hogy a módszer egyszerű leírása mellett (lásd 13—22. oldal) a patkányagy különböző régióinak és magvainak topográfiai leírásához (lásd 2. fejezet) 72 frontális síkú metszetet is tartalmaz, amely a kutató, az érdeklődő számára rendkívüli segítséget jelent. A bulbus olfacto-roiustól a gerinevelőig egymástól 300 μm távolságban készített 72 frontális síkú metszetet mutat be a szerző tizenkétszeres nagyításban. Követendő példának tartom, hogy a kötetben helyenként az anyag értelmezésénél angol nyelvű leírás is megjelenik. PALKOVITS dr.-t egyébként is világos, könnyen érthető szöveg jellemzi.

A kötet kiadása hézagpótló jellegű, neurokémikusok, neuroanatómusok, neurofarmakológusok és általában a központi idegrendszerrel foglalkozó kutatók számára elengedhetetlen mindennapi segítséget fog nyújtani, ha a kötetet laborjuk polcáról levehetik.

Vizi E. Szilveszter

A sejtosztódás szabályozása és befolyásolása. LAPIS KÁROLY és JENEY ANDRÁS (szerk.) Akadémiai Kiadó Budapest, 1981.

A kötetben négy ország nemzetközileg elismert szakemberei alapvető kritikai összefoglalást adnak a kísérletes orvostudomány egyes alapvető kérdéseiről. Változatos az egyes fejezetek anyagkiválasztása és változatos a feldolgozás módja is. A szerzők a választott fejezetben a legújabb eredményeket is megfelelő perspektívába tudták helyezni.

A könyv három fő részében mintegy 18 fejezetben tárgyalja a sejtproliferáció lehetséges módjait és ezzel összefüggésben a sejt differenciáció lehetséges terápiás befolyásolását.

A sejtosztódás általános törvényszerűségeit tárgyaló rész keretében a szerző (LAPIS KÁROLY) a sejtszisztémák növekedésének általános jellemzését és a sejtpopulációk kinetikai tanulmányozásának jelentőségét értékeli. Részletesen elemzi a növekedés és a sejtproliferáció közötti összefüggést. Megállapítja, hogy a sejtpopulációs kinetika ma olyan multidiszciplináris tudományág, amely a molekuláris szinten folyó kutatásoktól a szervezet szintjéig terjedő kutatásokat egyaránt igényli. Elemzi az ép szövetekben előforduló sejtproliferáció 3 típusát a) gyorsan megújuló sejtpopulációk, b) lassan megújuló sejtpopulációk, c) proliferációra képtelen populációk — ez utóbbi csoportba az erősen differenciált specializált sejtek tartoznak, pl. a központi idegrendszer sejtjei, a perifériás idegek neuronjai, valamint az epidermisz elszarusodott sejtjei és a polimorf magvú leukociták.

Foglalkozik a sejtproliferáció szabályozásának különböző szintjeivel is. A sejtpopulációs kinetikai ismeretek elméleti és klinikopatológiai jelentőségével kapcsolatban többek között említi ezen ismeretek fontosságát a daganat-kemoterápiában elsősorban, mivel a gyógyszerek nem szelektívek, hanem ilyen vagy olyan módon általában gátolják a sejtproliferációt. A terápiás beavatkozás legfontosabb célja, hogy a lehető legnagyobb mértékben csökkentse a daganatos őssejt állományt, meggátolja a megújulását úgy, hogy eközben minél kisebb mértékben károsodjék a normális szövetek őssejt állománya, ill. felépülése minél zavartalanabb legyen. Összegzésül megállapítja, nagyon fontos a kis metasztatizisok növekedési sajátosságainak alapos ismerete. Ki kell fejleszteni olyan technikákat, amelyekkel lehetővé válik a betegnek a sejtpopulációs paraméterek — köztük az őssejtfrakciók mindenkori nagyságának gyors és kezelés közben történő ismételt meghatározása.

Az őssejtek természetéről és szabályozásáról írva az általános definíción túl a szerző, LAJTHA LÁSZLÓ részletesen elemzi a hemopoietikus rendszer őssejtjeit, az epithelialis őssejtet és az őssejtek patológiáját. Ez utóbbi keretében kiemeli, hogy itt inkább a növekedésszabályozás hatékonyságának mennyiségi változásáról kell beszélnünk, mint az osztódás szabályozásának hiányáról.

A sejtosztódás mechanizmusának és szabályozásának molekuláris alapja c. fejezet tárgyalja azokat az extra- és intracelluláris regulátor anyagokat, amelyek hatásmódjának ismerete a lehetséges út arra, hogy a sejt proliferáció-szabályozás megváltoztatására irányuló törekvéseinket realizáljuk.

A nyugvó és proliferáló sejt ultrastruktúrája fejezetben imponálóan gazdag és szép képnyaggal alátámasztva értékes új adatokat találunk a sejtciklus során megfigyelhető morfológiai változások citokémiailag is jól kimutatható alapjairól.

A sejtosztódás az egyes szövetekben fő cím alatt kerülnek tárgyalásra a hemopoietikus sejtpopuláció osztódásának és differenciálódásának szabályozása, továbbá a bélhámsejtek osztódása és differenciálódása, valamint a májszövet sejtproliferációs kinetikai állapota.

A sejtosztódás néhány kérdése az orvosi gyakorlatban címszó fejezeteiben a sejtproliferáció néhány klinikai vonatkozását, valamint a humán limfociták fiziologiás és patologiás proli-



ferációját elemzik a szerzők. Megállapítják, hogy az autoimmun és a malignus limfociták proliferációk között az összefüggés gyakran átmeneti, ennek kapcsán hosszan tartó immunproliferáció malignus proliferációba mehet át. A sejtosztódás és malignitás témakörben *in vitro* vizsgálódásokat írnak le a kémiai karcinogenezisről, részletesen elemzik a malignus átalakulás folyamatát. Foglalkoznak az *in vivo* karcinogenezisben történő sejtproliferációval.

A kísérletes daganatok sejtkinetikája és az emberi daganatok sejtkinetikája fejezetben módot adnak az olvasónak az experimentálisan kialakított és az emberben megfigyelhető daganatok biológiai viselkedésére vonatkozó számos új megfigyelést igen érdekes összehasonlításban áttekinteni.

A sejtosztódás befolyásolása témakörben öt fejezet található. Ezekben a szerzők vizsgálódásuk tárgyává teszik a sejtproliferáció endogén serkentő és gátló anyagait, a sejtproliferáció exogén stimulálását, az ionizáló sugárzás és a sejtkinetika kapcsolatát. A proliferáló és nyugvó sejtek daganattellesszerezekkel szembeni eltérő érzékenységének lehetséges okait és a sejtproliferáció vegyszerez gátlásának kérdését vizsgálva fontos gyakorlati útmutatásokat is adnak a szerzők, így pl. táblázatban foglalják össze a citosztatikumokat támadási helyük szerint. Szempontjaik a racionális daganatkemoterapiás kezelésnek jelentős törekvéseit és lépéseit jelentik.

A könyvben a fejezetek végén az adott kérdéskör legfontosabb irodalmi forrásmunkáit találjuk. Az ábrák kitűnően illusztrálják a szöveget, a táblázatok külön kiemelik a lényegét.

A könyvvel végeredményben anyagában tömör, részleteiben csaknem teljes képet kap kézhez az olvasó, egyúttal új oldaláról foglalja össze és egészíti ki ismereteinket.

Kapa Eszter

R. KNIPPERS: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart—New York 1982, 444., DM 54.—

A molekuláris genetika tárgykörének meghatározása sohasem volt könnyű feladat. Ma azonban különösen nehéz, mert a tárgy szinte elnyeléssel fenyegeti az egész klasszikus genetikát. Az elmúlt években megjelent összefoglaló genetikai tankönyvek többsége nem a formális genetikával, hanem a DNS szerkezetével kezdi a tárgyalást, és anyaguknak nagy része nyugodtan nevezhető molekuláris genetikának. Megfordítva a gondolatot: KNIPPERS új, átdolgozott tankönyve szinte teljes értékű genetikai mű. Nincs tehát sok értelme a diszciplína körülhatárolásának vagy a polémianak, hogy ez vagy az a határterület miért került bele vagy maradt ki a könyvből. Egyértelműen örömmel kell üdvözölni, hogy olyan mű született, amely korszerűen, széles látókörrel, közérthető nyelven, kitűnő lényegmegragadó képességgel foglalja össze a tárgyat. A tárgyalás szintje és az előadás módja sokban emlékeztet WATSON klasszikus könyvére (*A gén molekuláris biológiája*), de annál tankönyvszerűbb, azaz jobban ügyel arra, hogy a szükséges tényanyagot ismertesse még akkor is, ha az nem szolgál nyilvánvaló didaktikai célt. Ezt a tankönyvszerűséget hangsúlyozza a kitűnő metodikai zárófejezet, amely rövid ismertetést ad a legfontosabb molekuláris biológiai módszerekről (szándékosan írok molekuláris biológiát genetikai helyett, mert ez a módszertani fejezet szinte kizárólag DNS-biokémiai technikákat ismerteti, genetikai alig van benne). Természetesen e fejezet (nagyon helyesen!) csak eligazító, megértető jellegű, és nem pótolja a technikák alaposabb megtanulását.

KNIPPERS könyve melegen ajánlható leendő molekuláris biológus kutatóknak a tárgyba való első bevezetésként és valamennyi biológus szakembernek, aki a molekuláris genetikai területén fel akarja frissíteni rendkívül gyorsan avuló alapkultúráját. Nagyon kívánatos volna egy gyorsan elkészülő magyar fordítás is (a „gyors” jelző fontos!).

Tökéletes volna tehát ez a kis könyv? Természetesen nem. Hibáért azonban elsősorban nem a szerző, hanem a tárgy a felelős. Elsősorban azon lehet vitatkozni, hogy az eukarióták molekuláris biológiájából mit és mennyit szükséges tárgyalni egy ilyen típusú összefoglalóban. Szinte mindenki, saját érdeklődési területének megfelelően vitathatja egyik-másik fejezet indokoltságát, vagy reklamálhat hiányokat. Ugyancsak a tárgyból, pontosabban annak jelenlegi helyzetéből következik, hogy számos olyan tény kerül említésre, amelynek jelenleg még hiányzik a magyarázata, de a szintézis a közeljövőben várható. Ilyen esetekben vitatható, hogy helyes volt-e a tárgyalás.

Végül az utolsó kifogás: A fejezetek sorrendje, illetve a tárgyalás logikája sok esetben önkényesnek tűnik, nem eléggé épülnek egymásra az egyes részek. Ez természetesen maximalista igény; e sorok írója nem tudná megmondani, hogy lehetséges-e a tárgy szigorúan logikus, lineáris vonalvezetésű ismertetése; mindenesetre az ismert hasonló profilú tankönyvekben ez sehol sem sikerült.

KNIPPERS könyve a műfaj kiváló darabja. Az előszó tanúsága szerint a szerző nehezen szánta el magát a teljes átdolgozásra (a könyv első kiadása 1971-ben jelent meg), vonakodását

tanítványai győzték le azzal az érveléssel, hogy e terület valóban korszerű tárgyalása hiányzik mind a biokémia, mind a genetika tankönyvekből, és a könyv hézagpótló lesz. Igazuk volt.

Venetianer Pál

EMIL MÜLLER—WOLFGANG LOEFFLER: *Mykologie*. Grundriss für Naturwissenschaftler und Mediziner. Georg Thieme Verl., Stuttgart—New York, 1982., DM 34.—

E gondosan kimunkált, világos és tömör stílusú könyv — melynek korábbi kiadásai sem ismeretlenek a hazai szakemberek körében — hasznos vezérfonal az általános mikológia alapjainak elsajátításához. A mű a valódi gombák (*Eumycota*) mellett foglalkozik a nyálkagombákkal (*Myxomycota*), melyek a Protista országba tartoznak, valamint a *Mastigomycotina*-ba sorolt, a valódi gombák közül zömmel szintén kizárható fajokkal is. Rövid és világos áttekintést ad — többek között — a gombák ökológiájáról, makro- és mikromorfológiájáról, finomszerkezetéről, élettanáról, rendszerezéséről. Ezeket túlmenően, ill. belül a gombagenetika, conidium-ontogenia, paraszexualitás lényegével is megismerteti mind a humán-, mind az állatorvostudományok különböző ágaiban tevékenykedő szakembereket. A természettudományok egyéb területein bújváradok is haszonnal forgathatják e zsebkönyvet, melynek éppen nagysága, formátuma zárja ki, hogy a teljesség igényével lépjen fel. Ezért igen röviden szól — az alkalmazott mikológia fejezetben — a növényi, állati, valamint emberi gombás megbetegedésekről és ezek terápiajáról. Az emberi (ill. állati) betegségek c. fejezetben a mycetismus, mycotoxicosis, mycosis, allergia is sorban bemutatásra kerül. A rövid irodalmi összeállítás a mikológia különböző területein való eligazodást segíti elő.

Semmit nem von le a mű értékéből, ha megemlíjtük, hogy az emberpatogén gombákkal foglalkozó szakembert zavarhatja a *Microsporium* genusnév helyenkénti felcserélése a taxonómiailag helytelen *Microsporon*-nal. A *Trichophyton (T) mentagrophytes* var. *mentagrophytes* helyett a *T. mentagrophytes* szerepeltetés kissé régiesnek tűnik.

A 366 oldal terjedelmű, 188 igen finoman, minuciózusan kidolgozott vonalas ábrát, valamint 31 táblázatot tartalmazó zsebkönyv negyedik kiadása is ügyes eszköz lesz az e terület iránt érdeklődők mindennapi munkájában.

Galgóczy József

FRIEDRICH G. BARTH: *Biologie einer Begegnung*. — Die Partnerschaft der Insekten und Blumen. Deutsche Verlags-Anstalt GmbH, Stuttgart, 1982.

A virágos növények jelentős részének idegen megporzásában — a víz és a szél sodró hatása mellett — a rovaroknak (trópikusokon ezenkívül a madaraknak és az emlősök közül a denevéreknek is) fontos, aktív szerepük van. Ez a növény és állat közötti egymásra utaltság — amely az élővilág evolúciója során rendkívül változatos formában, szinte csodálatos összecsiszoltságban és viselkedésbeli gazdagságban alakult ki — a biológia egyik igen érdekes témaköre; ezt századunk eleje óta már több önálló, összefoglaló munka választotta mondanivalójával, sőt nemrégén nálunk is készült ilyen (ez a *Biológia Aktuális Problémái* c. sorozat 24. kötetében a 145—245. oldalakon olvasható; Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1982).

Legújabbán a stuttgarter Deutsche Verlags-Anstalt kiadásában G. BARTH zoológus tollából jelent meg a fenti címmel egy ilyen témájú, korszerű, 304 oldalas, 24 gyönyörű színes képpel és 110 fekete-fehér ábrával illusztrált, ízléses könyvkiadvány, amely a virágos növény és a megporzó rovar kapcsolatát sokoldalúan, igényesen, de ugyanakkor előtanulmányok nélkül is könnyen érthető nyelvezettel tárgyalja.

Bevezetőül a partnerkapcsolatok érdekes példájaként a füge és a fügefémadarazsak egymásra utaltságát, az ön- és idegen-megporzás lényegét, utóbbinál a megporzó rovarok szerepét tárgyalja (amit az itt olvasható idézetek tanúsága szerint KONRAD SPRENGEL, majd CHARLES DARWIN már oly éles szemmel felismert). Ezután a Szerző sorra veszi a virágot látogató rovarcsoportokat (poszméheket, méheket, egyéb hártvány szárnyú rovarokat, legyeket, bogarakat, lepkeket, poloskákat), és vázolja a megporzás szempontjából kiemelkedő jelentőségű méhek társas életét.

Külön fejezet szól a virágporról, a nektárról, a virágszerkezet és a megporzást végző rovarok testfelépítésének összehangoltságáról. A virág és rovar találkozása szempontjából döntő fontosságú a rovar tájékozódóképessége, színlátása, a növény részéről pedig a virágszín és rajzolat, valamint a formabeli sajátosság, amely a megporzó rovar számára csalogató és útjelző jellegű információkat szolgáltat. Mindezeket a legújabb ökofiziológiai kutatási eredmények fel-

használásával tárgyalja a könyv. Ezután a virág és rovar kapcsolata számára szintén fontos virágillat és rovar-szaglász viszonyát elemzi a szerző, részletezve a rovar szaglászervének anatómiáját és fiziológiáját, a rovarnak a szagtérben való tájékozódóképességét, az ide vonatkozó kísérletes vizsgálatokat, a rovarcsoportok között e téren mindmáig ismert viselkedésbeli eltéréseket.

Külön is tárgyalja a könyv a tanulás és a felejtés szerepét a rovar megporzó tevékenységében, az időtényezőt, a társas életet élő rovarok egymást informáló viselkedésének számos érdekes részletét, majd záró témaként a kölcsönkapcsolat evolúciós kialakulását ismerhetjük meg a könyvből. A kiadványt a fejezetek szerint taglalt, bőséges irodalomjegyzék és tárgymutató teszi teljessé.

A könyv tartalmának vázlatos áttekintése azt sugallja, hogy ezt a sokoldalú, összetett, interdiszciplináris témakört feldolgozó kiadványt botanikus és zoológus, ökológus és fiziológus, etológus és környezetvédő szakember egyaránt haszonnal tanulmányozhatja, sőt a szép és gazdag ábraanyag segítségével a német nyelvben kevésbé járatos laikus is sok érdekes ismeretet szerezhet.

Széky Pál

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Sándor István

A kézirat a nyomdába érkezett: 1982. V. 13.

Terjedelem: 9,45 (A/5) ív

83. 10868 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

83. 10868
NYOMDÁBA ÉRKEZETT
1982. V. 13.

TARTALOM

CSÁNYI VILMOS: Neurokémiai genetika	121
ARÁNYI PÉTER: A szteroid hormonok hatásainak szerkezeti alapjai	145
KANYÁR BÉLA és TORNÓCI LÁSZLÓ: Kísérletek tervezése regressziós mérések esetén	171
GAZSÓ LAJOS és ALAN TALLENTIRE: Hidroxil szabad gyökfogók hatása <i>Bacillus megaterium</i> spórák sugárrezisztenciájára	187
IZSÁK JÁNOS: Diverzitási indexek összehasonlító vizsgálata mortalitási adatokon	193

Könyvismertetés

CSÁNYI V. (szerk.): Etológiai tanulmányok (<i>Székely Pál</i>)	205
PALKOVITS M.: Útmutató és atlasz patkányagy sejtesoportjainak izolált kivételére (<i>Vizi E. Szilveszter</i>)	205
LAPIS K. és JENEY A. (szerk.): A sejtosztódás szabályozása és befolyásolása (<i>Kapa Eszter</i>)	206
KNIPPERS, R.: Molekulare Genetik (<i>Venetianer Pál</i>)	207
MÜLLER, E. and LOEFFLER, W.: Mykologie (<i>Galgóczy József</i>)	208
BARTH, G. F.: Biologie einer Begegnung (<i>Székely Pál</i>)	208

Terjeszti a Magyar Posta

Előfizethető a hírlapkézbesítő postahivataloknál és a Posta Központi Hírlap Irodánál (PKHI 1900 Budapest V., József nádor tér 1.) közvetlenül vagy postautalványon, valamint átutalással a PKHI 215-96162 pénzforgalmi jelzőszámra. Előfizetés bejelenthető az Akadémiai Kiadónál (1363 Budapest V., Alkotmány utca 21. Telefon: 111-010).

Példányonként beszerezhető: az Akadémiai Könyvesboltban (1368 Budapest V., Váci utca 22. Telefon: 185-881), a PKHI Hírlapboltjában (1055 Budapest V., Bajcsy-Zsilinszky út 76. Telefon: 116-269) és minden nagyobb árusítóhelyen.

Előfizetési díj egy évre: 52, – Ft

1 szám ára: 26, – Ft

Index szám: 25104

Külföldön terjeszti a KULTURA Külkereskedelmi Vállalat,
H-1389 Budapest, Pf. 149.

Ára: 26 Ft
Előfizetés egy évre: 52 Ft

INDEX: 26073
ISSN: 0133-3844

INDEX

BIOLÓGIA (Budapest)
30/2 (1982)

CSÁNYI, V.: Neurochemical Genetics	121
ARÁNYI, P.: Relation of Steroid Structure to Hormone Effects	145
KANYÁR, B. and TORNÓCI, L.: Design of Regression Experiments in Biology	171
GAZSÓ, L. G. and TALLENTIRE, A.: The Effect of Hydroxyl Radical Scavengers on the Radiosensitivity of <i>Bacillus Megaterium</i> Spores	187
IZSÁK, J.: Comparative Study of Diversity Indices on Mortality Data	193