

BIOKÉMIA

1995 YIKO

A Magyar Biokémiai Egyesület
tájékoztatója

Quarterly Review of the
Hungarian Biochemical Society

Szerkesztő bizottság : Alkonyi István, Bagdy Dániel, Bánfalvi
Gáspár, Elődi Pál, Falus András, Fésüs
László, Gergely Pál, Hudecz Ferenc,
Nyeste László és Sarkadi Balázs

Felelős szerkesztő : Bagdy Dániel
Technikai szerkesztő : Bölöni Erzsébet

A tartalomból : Amit mindig tudni akartál a fehérjékről...
(Tömegspektrometria a fehérjeszerkezet-
kutatás szolgálatában)

A neuronális differenciáció génaktivációs
jelenségei

A progesteron-függő immunmoduláció szerepe
a terhesség alatt

Fehérje-szintézis humán trombocitákban

Napjaink - lapjainkban
IMPAKT - Tények a tudományos alap kutatásról
A tudósok gazdagságra vagy hírnévre
vágynak ?
Az idézetelemzéses értékelés határai

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai
Intézet

FEBS Advanced Courses 1996

Contents

What You Always Wanted to Know About Proteins
(Mass Spectrometry as a Tool for Protein Chemists)

Gene-Activating Phenomena of the Neuronal
Differentiation

Role of the Progesteron-Dependent Immun-
Modulation During Pregnancy

Protein Synthesis in Human Platelets

Limits of the Evaluation by Citation Context
Analysis

FEBS Advanced Courses 1996

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1372 Budapest, Pf.451

Felelős kiadó : dr.Guba Ferenc

Készült a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Házinyomdájában
1089 Budapest, Diószeghy Sámuel u.21

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

Amit mindig tudni akartál a fehérjékről.... (Tömegspektrometria a fehérjeszerkezet kutatás szolgálatában)

Medzihradszky-Fölkl Katalin

University of California at San Francisco, Department of Pharmaceutical Chemistry
513 Parnassus, San Francisco, CA 94143-0446, USA

Medzihradszky Dénes

Biorex Kutató és Fejlesztő Rt, Protein Labor
1027 Budapest, Medve u. 25-29

Bár a tömegspektrometria egyre jelentősebb szerepet tölt be a fehérje-analitikában és kivételes lehetőségeket kínál a kutatóknak, mégis mostohagyerek. Az orvos-biológus kutatók sokszor gyanakodva tekintenek a szuperműszereket igénylő technikákra, míg a tömegspektrometria fejlesztésén elsősorban munkálkodó fizikusok és fizikokémikusok érdeklődési területén kívül esnek a biokémiai makromolekulák.

A tömegspektrometria gyors és rendkívüli pontosságú tömegmérés. Nagyon sokszor használunk különböző elektroforetikus technikákat anyagaink nagyság (tömeg) szerinti jellemzésére, bizonyos változások kimutatására. De jó lenne tudni, pontosan mekkora is az a körülbelül 45 kDa fehérje, történt-e foszforiláció, glikoziláció vagy bármi más változás! Milyen peptidekre bontható enzimesen? és még rengeteg kérdés van, amit a tömegspektrometria könnyen és elegánsan meg tud válaszolni.

Hogyan történik ez a tömegmérés?

A klasszikus tömegspektrometriai analízis során a vizsgálandó anyagot először nagyvákumban elpárologtatták, majd elektronsugárral ionizálták, és az így képződött ionokat választották szét előbb energiájuk szerint (elektrosztatikus analizátor), majd az egységnyi töltésre jutó tömegnek megfelelően (mágneses analizátor) és az így kétszeresen "fókuszált" ionokat detektálták. Ez az eljárás nem tette lehetővé biológiai minták vizsgálatát, a peptidek, fehérjék, szénhidrátok túlságosan nagyméretűek és polárosak, már a minta gőztérbe juttatása megoldhatatlan feladatnak bizonyult egy jó ideig. Az utóbbi évtizedben azonban a tömegspektrometria ugrásszerű fejlődésnek indult. Megjelentek a kíméletes ionizációs (soft ionization) technikák: Fast Atom Bombardment (FAB)* és Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS), amelyek lehetővé tették poláros vagy hőre érzékenyebb vegyületek vizsgálatát. Ezeknél a vizsgálandó vegyületeket folyadék mátrixban (pl. tioglicerin, glicerin, m-nitrobenzilalkohol) feloldjuk, az oldatot vékony rétegben a céltárgy felületére visszük, ahol fókuszált nagyenergiájú atom- (Xe) vagy ionsugárral (Cs⁺) bombázzuk. Fontos megjegyezni, mert általánosan igaz a tömegspektrometriás módszerekre, hogy az analízisre kerülő minta nem tartalmazhat sót (hacsak nem illékony, mint pl. az

* Az 1995. május 4-én e témában tartott tudományos műhelyre egy Tömegspektrometriai Értelmező Szótárt állítottunk össze, ami tartalmazza a fontosabb rövidítéseket, magyarázatokkal. Ezt kérésre bárkinek eljuttatjuk.

NH_4HCO_3 , vagy LC/MS kísérletről van szó, amikor a legtöbb só úgyis eluálódik az oszlop-térfogattal) és detergenset (hacsak nem azok molekulásúlyát akarjuk meghatározni). Az ionképződés egyik előfeltétele, hogy a vizsgálandó molekulák feldúsuljanak a mátrix felületi rétegében. Ha az analizálandó elegy olyan komponenseket tartalmaz, melyeknek hidrofóbicitása jelentősen eltér, ún. szupressziós jelenséget tapasztalhatunk, a hidrofilabb alkotórész esetenként nem is detektálható. A molekulák felületaktivitásának megnövelése többnyire segíti az analízist, pl. peptidek észtereszítők¹, oligoszacharidok redukív aminálással derivatizálhatók², és így már jól detektálhatók. A soft ionizációs módszerek hátránya, hogy a spektrumban a protonált molekulaion mellett többnyire csak elenyésző számú fragmension figyelhető meg, így kevés szerkezeti információt nyerhetünk. (Jó áttekintést ad a tömegspektrometriai módszerekről és biológiai használatukról a *Methods in Enzymology* **193.** kötete (ed. J.A. McCloskey) 1990).

“Biológia-barát” technikák a tömegspektrometriában

Újabb ionizációs módszerek az ún. ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS) és a Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, amely ionizációs módszert többnyire repülési idő analizátorral (Time-Of-Flight) kombinálják, és így az egyik elfogadott jelölés erre a módszerre: MALDI-TOF. Az ESIMS módszer esetében a fehérje oldatot (a koncentráció általában néhány pmol/μl, az oldószer víz-metanol-ecetsav) egy kapillárison keresztül injektáljuk a tömegspektrométerbe. A belépő oldatot nagy feszültség (kb. 4-6 kV) és a szárító gáz (N_2) fogadja. Töltött cseppek képződnek, amelyekből az oldószer elpárolog, és visszamarad az analizálandó fehérje illetve peptid, többszörösen protonált állapotban. Így a fehérje- és peptidmolekulák jellegzetes ionklasterként jelennek meg a tömegspektrumban, az ionok tömeg-töltés (m/z) aránya függetlenül mérhető. Az ionok töltésszáma egyszerű algoritmussal meghatározható és a molekulásúly többnyire 0.01% pontossággal kiszámítható, azaz egy 100 kDa molekulásúlyú fehérje esetében egy aminosav jelenléte vagy hiánya már detektálható. A módszer előnye, hogy sokkal kevésbé lép fel szupressziós hatás, szektoros készülékkel jó felbontás érhető el, így viszonylag kis molekulásúly különbségek is meghatározhatók. A tömegspektrométerhez közvetlenül csatlakoztatható HPLC készülék, így egy fehérje tripszines emésztési elegye on-line feltérképezhető molekulásúly szerint, mindössze néhány pmol fehérjét használva. Az eljárás hátránya, hogy mindazok a fehérjék, amelyek valamilyen okból nem oldhatók az általánosan használt oldószerkeverékben, pillanatnyilag így nem analizálhatók, bár néhányan már sikerrel próbálkoztak hidrofób fehérjék ESIMS analízisével³.

A MALDI-TOF módszer esetében a mátrix egy olyan vegyület, mely elnyeli a lézer által kibocsátott UV vagy IR sugárzást és ezzel elősegíti a benne “feloldott” fehérje- vagy cukormolekulák ionizálódását. A módszer hihetetlenül érzékeny, általában kevesebb, mint egy pikomol minta is elegendő az analízisre. Erősen hidrofil vagy hidrofób anyagok egyaránt vizsgálhatók evvel a módszerrel. A leggyakrabban használt UV mátrixok a következők: 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav, 2,5-dihidroxi-benzoésav és α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav. Sajnos, a módszer diszkriminatív, pillanatnyilag nem tudjuk megjósolni, mely komponensek detektálhatók egy keverékből. Lineár üzemmódban a pontos tömegmérés alapkövetelménye egy belső

¹ A.M. Falick, D.A. Maltby (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 165-169.

² J.W. Webb, K. Jiang, B.L. Gillette-Castro, A.L. Tarentino, T.H. Plummer, J.C. Byrd, S.J. Fisher, A.L. Burlingame, (1988) *Anal. Biochem.*, **169**, 337-349.

³ P.A. Schindler, A. Van Dorsselaer, A.M. Falick (1993) *Anal. Biochem.* **213**, 256-263.

standard és a felbontás is igen alacsony (250-500), amely megakadályozhatja, hogy különbséget tegyünk egy keverék egyes komponensei között. Az ún. reflektromos készülékek sokkal nagyobb felbontással rendelkeznek (3000-5000) és a tömegmérés pontossága külső standarddal is kielégítő (0,5 Da-on belül van kb. 4000 Da-ig). A MALDI-TOF technika többnyire protonált molekulaionokat produkál, ám ez az ionizációs mechanizmus erős fragmentációval is jár. A jelentős többletenergiával rendelkező ionok repülés közben szétesnek és ez a fragmentáció a reflektromos készülékekben nyomon követhető. Így kapjuk az ún. Post Source Decay (PSD) spektrumokat.

A tandem tömegspektrometria kifejlesztése lehetővé tette, hogy bőséges szerkezet információt nyerjünk az előbb említett soft ionizációs módszerekkel (FAB, LSIMS, ESIMS) gerjesztett ionokból is. Ezek az ionok az első tömegspektrométer után beiktatott ütközési cellában inert gázzal (többnyire He vagy Ar) ütköztetve elegendő energiára tesznek szert, hogy darabokra hulljanak szét, és ez a fragmentációs folyamat jellemző a molekula szerkezetére. A fragmens ionok analizálhatók és detektálhatók a második tömegspektrométer segítségével. Így nyerjük az ún. CID (Collision-Induced Dissociation) spektrumokat. Kötéshasadás bekövetkezhet a peptidlánc bármelyik kötésében, az oldalláncokban, bár a peptidkötés gyakran preferált. Mindegyik “újszülött” hordozhatja a töltést. Az azonos típusú ionok egy aminosav gyöksúlyával különböznek egymástól. Az ionok elnevezésére ma már nemzetközileg elfogadott nomenklatura létezik⁴. Amennyiben ún. szektoros (az előbb említett elektrosztatikus és mágneses analizátorral működő) készülékkel dolgozunk, az első tömegspektrométer felbontása beállítható úgy, hogy csak és kizárólag a számunkra érdekes molekulaion ¹²C izotópióját ütköztessük és a továbbiakban egy ún. monoizotópos spektrumot értékeljünk. Könnyen működtethetők és olcsóbbak, ezért széles körben elterjedtek a quadropole analizátorok, bár ezek nem képesek nagy felbontást biztosítani és az ütközési energia is jóval alacsonyabb (50-100 eV vs. 4-8 keV), mint a mágneses készülékek esetében, ami azt jelenti, hogy minőségileg más, esetleg kevésbé informatív fragmentációt figyelhetünk meg.

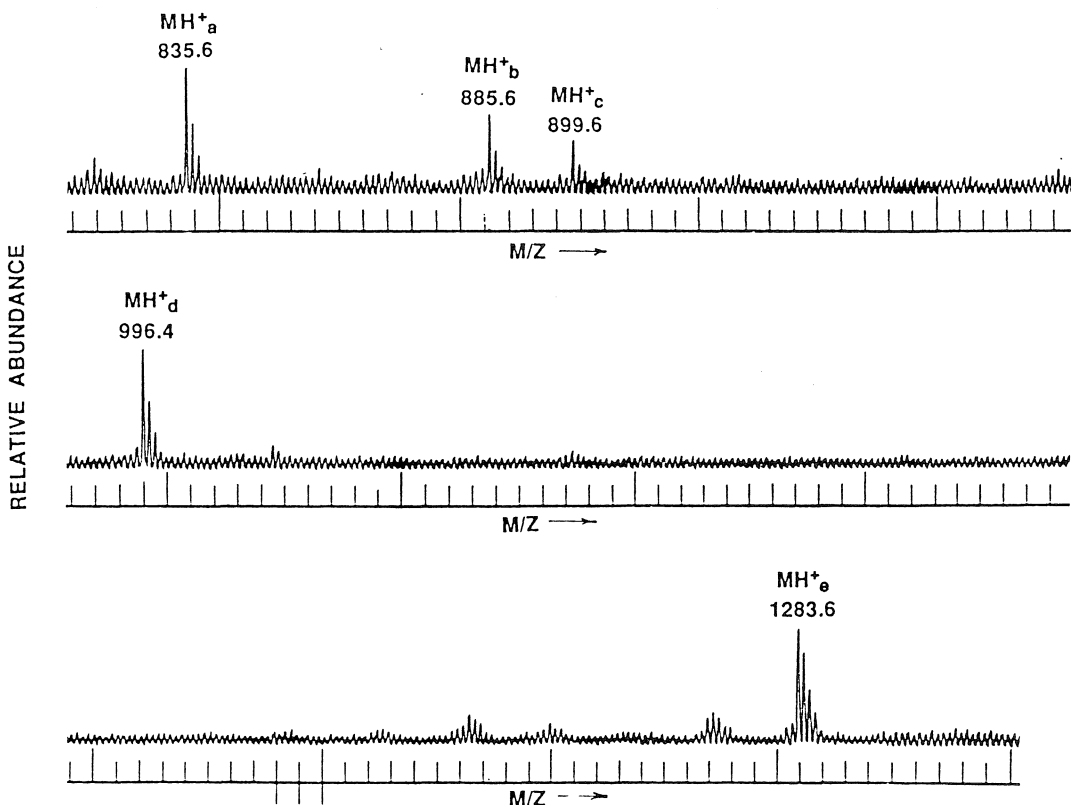
Mire használjuk a tömegspektrometriát a fehérje analitikában?

Például szekvenálásra! A fehérjék primer struktúrájának megismerése alapfeltétele a további vizsgálatoknak, amelyek arra irányulnak, hogy megértsük ezen molekulák funkcióját, működésük mechanizmusát. Az aminosavsorrend ismeretében, számítógépes eljárások segítségével a fehérje térszerkezete valószínűsíthető, a megtervezett mutánsok, kémiailag módosított molekulák pedig további fényt deríthetnek a kémiai szerkezet és biológiai hatás összefüggéseire. A fehérjék aminosavsorrendjének közvetlen megállapítására az Edman degradáción alapuló szekvenálási eljárások használatosak, ugyanakkor az indirekt módszer, a kódoló DNS szakasz szekvenálása és a bázissorrend “lefordítása” ugrásszerűen megnövelte az ismert fehérjeszekvenciákat. A szekvencia ellenőrzésében, vagy a megfelelő oligonukleotid próba előállításához a direkt szekvenálás nélkülözhetetlen. Az Edman kémián alapuló szekvenálások mindig N-terminális szekvenciát szolgáltatnak, a blokkolt N-terminus komoly akadályt jelent. Nem elemezhetők elegyek sem, ha a komponensek összemérhető mennyiségben vannak jelen. A poszt-transzlációs vagy kémiai módosítások detektálása nem megoldott, többnyire csupán egy “üres” ciklus jelzi, hogy nem a szokásos aminosavakkal van dolgunk. A poszt-transzlációs módosításokra nem lehet következtetni a bázissorrend lefordításakor sem, ezek felderítésére más módszerhez kell folyamodnunk. Gyakran szükséges a hagyományos

⁴ K. Biemann (1990) *Methods Enzymol.*, **193**, 886-887.

fehérjeszekvenálás, hogy egy független módszerrel igazoljuk a már meghatározott szekvenciát, vagy éppen, hogy kiinduló pontot biztosítsunk a klónozás számára. A szilárd fázison vagy biotechnológiai úton előállított nagy mennyiségű polipeptid és fehérje szerkezet-ellenőrzésére is egyre gyakrabban van igény. Szükség van hát gyors, megbízható, reprodukálható és nagy érzékenységgű szekvencia meghatározó módszerekre.

A klasszikus Edman-módszeren alapuló szekvenálás nagy fejlődésen ment keresztül az elmúlt 10 évben. Az automata készülékek 1-20 pmol anyagot szekvenálnak rutinszerűen. Az Applied Biosystems, Inc. (ABI) és más cégek jelentős eredményt értek el a ciklusidő lerövidítésében is. A fehérje-szekvenálásról, a fehérje-analitikában jelenleg használatos mikrotechnikákról jó áttekintést nyerhetünk a *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* hatodik kötetéből. Az Edman szekvenálási módszer vetélytársa a tandem tömegspektrometria. A CID spektrumokban található fragmensionok segítségével és némi intuícióval az aminosavsorrend meghatározható. A tömegspektrometria előnye, hogy N-terminálisan blokkolt peptidok szekvenálására is alkalmas, keverékek is analizálhatók, (1. ábra) és a poszt-transzlációs módosítás helye és szerkezete is meghatározható az analízis folyamán.

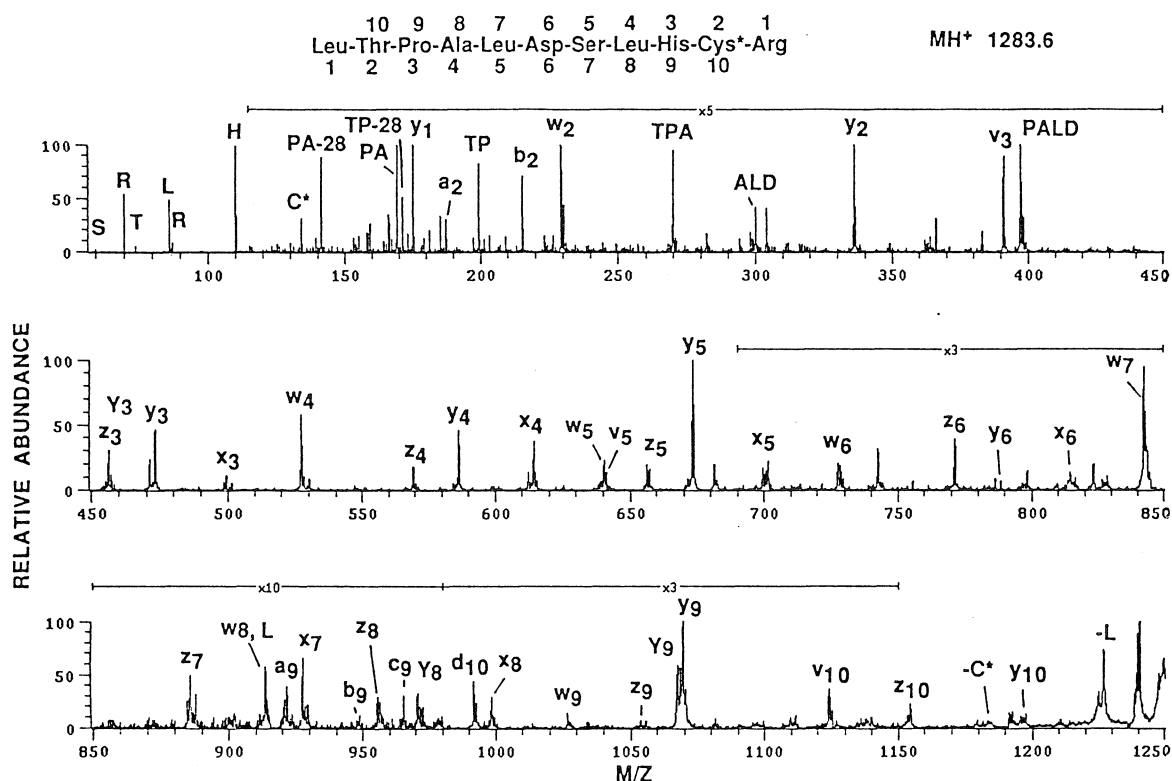


1. ábra. Az LSIMS analízis tanúsága szerint legalább öt peptid található ebben a HPLC frakcióban, amelyet a Gal β 1,3(4)G1cNAc α 2,3 szialil-transzferáz triptikus emésztési elegyéből izoláltunk. (engedéllyel reprodukálva: A.L. Burlingame (1993) in *Techniques in Protein Chemistry IV* (ed. R.H. Angeletti) Academic Press, San Diego, pp. 3-21.)

Ismeretlen fehérjék esetén a tömegspektrometriás szekvenálás stratégiája megegyezik a hagyományos módszereknél előírttal. Az egységes, lehetőleg redukált és szulfhidril-blokkolt (pl. karboximetilezett) fehérjét egy szelektív enzimmal vagy valamilyen kémiai módszerrel hasítjuk. A keletkezett peptideket RP-HPLC-vel

elválasztjuk. A frakciókat analizálva (on-line LC-ESIMS vagy off-line LSIMS, MALDI-TOF) megkapjuk az egyes komponensek molekulásúlyát és ezután következik a tandem tömegspektrometria vagyis CID analízis, esetleg PSD analízis, amely biztosítja majd az adatokat a szekvencia meghatározásra. Általában tripszint használunk első enzimmént, ezt indokolja nagy specificitása; továbbá az, hogy az így keletkező peptidek C-terminusa bázikus, irányítja a fragmentációt (ti. a plusz proton nagyobb valószínűséggel kötődik a bázikus csoportokhoz) és egyértelműbbé teszi a CID adatok értelmezését. Az első ilyen kísérletek még néhány nanomól anyagot igényeltek^{5,6}. Miután a DNS szekvenálás sok szempontból előnyösebb, manapság jobbra csak annyi elsődleges szekvenciát igyekezünk meghatározni, amely biztosítja a sikeres klónozást, így 50-300 pmol fehérje gyakran elegendő^{7,8}.

Az 1. ábrán látható HPLC frakció legalább öt különböző triptikus peptidjéből a két legnagyobb molekulásúlyú komponenst szekvenáltuk tandem tömegspektrometriával a Gal β 1,3(4)G1cNAc α 2,3 szialil-transzferáz szerkezet felderítéséhez⁷. A 2. ábra mutatja be az egyik CID spektrumot.



2. ábra. Az 1. ábrán bemutatott HPLC frakció egyik komponensének (MH^+ 1283,6 Da) nagy energiájú CID spektruma. A peptid szekvenciája ismeretlen volt, ebből a spektrumból határoztuk meg. (engedéllyel reprodukálva: A.L. Burlingame (1993) in *Techniques in Protein Chemistry IV* (ed. R.H. Angeletti) Academic Press, San Diego, pp. 3-21.)

⁵ D.F. Hunt, J.R. Yates III, J. Shabanowitz, S. Winston, C.R. Hauer, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6233-6237.

⁶ R.S. Johnson, K. Biemann, (1987) *Biochemistry*, **26**, 1209-1214.

⁷ D.X. Wen, B.D. Livingston, K.F. Medzihradsky, S. Kelm, A.L. Burlingame, J.C. Paulson, (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 21011-21019.

⁸ J.D. Brown, B.C. Hann, K.F. Medzihradsky, M. Niwa, A.L. Burlingame, P. Walter, (1994) *EMBO J.* **13**, 4390-4400.

Egy sokat ígérő felhasználás

Rendkívüli horderejű az LC/ESIMS/MS technika alkalmazása az immunológiában. Donald F. Hunt és kutatócsoportja sikeresen szekvenált peptideket, melyek csupán néhány száz femtomol mennyiségben lehettek jelen egy rendkívül sok komponensű elegyben. Ezen elegy azon peptidek összessége volt, amelyet a Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I vagy Class II fehérjéi prezentálnak a sejt felszínén a T-sejteknek. Hunt és munkatársai nemcsak meghatározták bizonyos allél rendszerek kötő motívumait^{9,10}, de szekvenáltak egy nonapeptidet is, amely minden általuk eddig vizsgált melanómás páciens MHC Class I fehérjéje által prezentált és szerepet játszhat egy melanoma elleni immunválasz kiváltásában¹¹.

Fehérjék gyors azonosítása

A tömegspektrometria egy másik, immár széleskörben elterjedt alkalmazása: fehérjék azonosítása két dimenziós (2-D) gélekből^{12,13,14,15,16,17}. A sejtek fehérje összetétele, annak megváltozása talán a legjobban ezekkel a 2-D gélekkel jellemezhető. A fehérjéket az első dimenzióban töltés szerint (izoelektromos fókuszálás) választjuk el, míg a második dimenzióban molekulásúly szerint (SDS poliakrilamid gélelektroforézis, SDS-PAGE). Bizonyos sejt vonalak 2-D fehérjeterképe ma már számítógépen is hozzáférhető, információval mindazokról a fehérjékről, amelyeket már azonosítottak (Swiss-2DPAGE). De ezen a területen is még rengeteg a tennivaló. A fehérje-szintézis nyilvánvalóan más a különböző fajokban, szervezetben, a fejlődés különböző stádiumaiban, rákos és normál sejtekben, stb. A jelenleg legérzékenyebb módszer szerint a bennünket érdeklő foltokat (egy helyen megjelenő fehérjéket) kivágjuk, magában a gélben tripszinnel hasítjuk, a peptideket microbore (ID 1 mm) vagy kapillaris (ID 180 µm) RP-HPLC-vel (grádiens elúció, 0.1% TFA/víz - 0.08% TFA/acetonitril) szétválogatjuk. A frakciókat kézzel gyűjtjük, 500 µl-es polipropilén Eppendorf-csővekbe. Az oldatokat vákum-centrifugán óvatosan koncentrálnak, mert az oldószer tökéletes elpárologtatása a minta tökéletes elvesztését vonhatja maga után, másfajta szárítási módszerek (pl. nitrogénes lefúvatás) pedig a minta szennyeződését. A frakciók egy-egy részét azután MALDI-TOF módszerrel analizáljuk. Így meghatározzuk fehérjénk triptikus peptidjeinek (legalábbis egy részüknek) a molekulásúlyát. Léteznek, és a számítógépes hálózaton keresztül díjmentesen hozzáférhetőek olyan programok (MOWSE), amelyek néhány perc alatt "megemésztik" tripszinnel (ill. tetszés szerinti enzimmel) az összes fehérjét,

⁹ D.F. Hunt, R.A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sagakuchi, H. Michel, N. Sevilir, A. Cox, E. Appella, V.H. Engelhard, (1992) *Science*, **255**, 1261-1263.

¹⁰ E.L. Huczko, W.M. Bodnar, D. Benjamin, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, R.A. Henderson, E. Appella, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, (1993) *J. Immunol.* **151**, 2572-2587.

¹¹ A.L. Cox, J. Skipper, Y. Chen, R.A. Henderson, T.L. Darrow, J. Shabanowitz, V.H. Engelhard, D.F. Hunt, C.L. Slingsluff, Jr., (1994) *Science*, **264**, 716-719.

¹² S.C. Hall, D.M. Smith, F.R. Masiarz, V.W. Soo, H.M. Tran, L.B. Epstein, A.L. Burlingame (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1927-1931.

¹³ W.J. Henzel, T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011-5015.

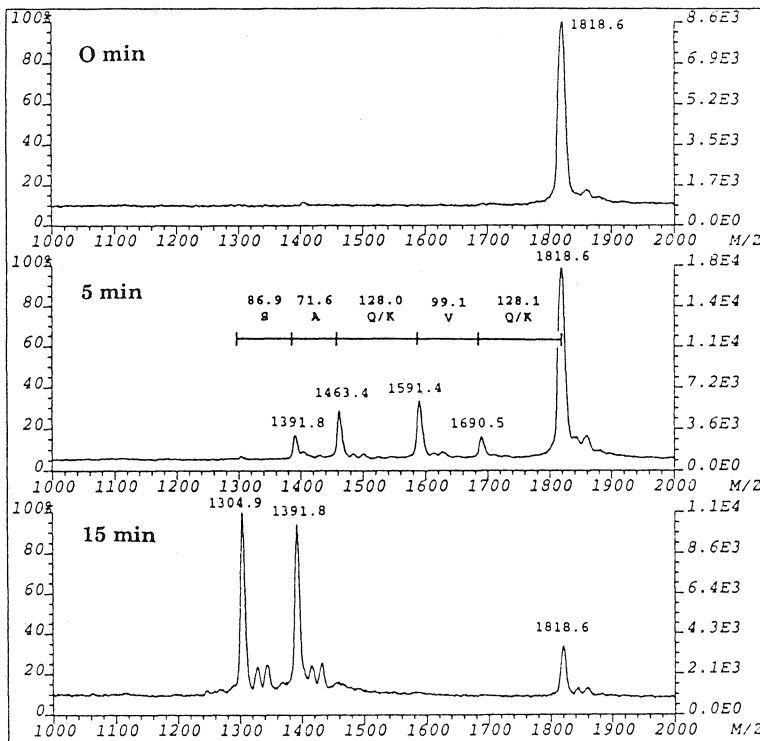
¹⁴ M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff (1993) *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 338-345.

¹⁵ D.J.C. Pappin, P. Hojrup, A.J. Bleasby (1993) *Current Biology* **3**, 327-332.

¹⁶ H. Ji, R. Whitehead, G.E. Reid, R.L. Moritz, L.D. Ward, R.J. Simpson (1994) *Electrophoresis*, **15**, 391-405.

¹⁷ H.H. Rasmussen, E. Mortz, M. Mann, P. Roepstorff, J.E. Celis (1994) *Electrophoresis*, **15**, 406-416.

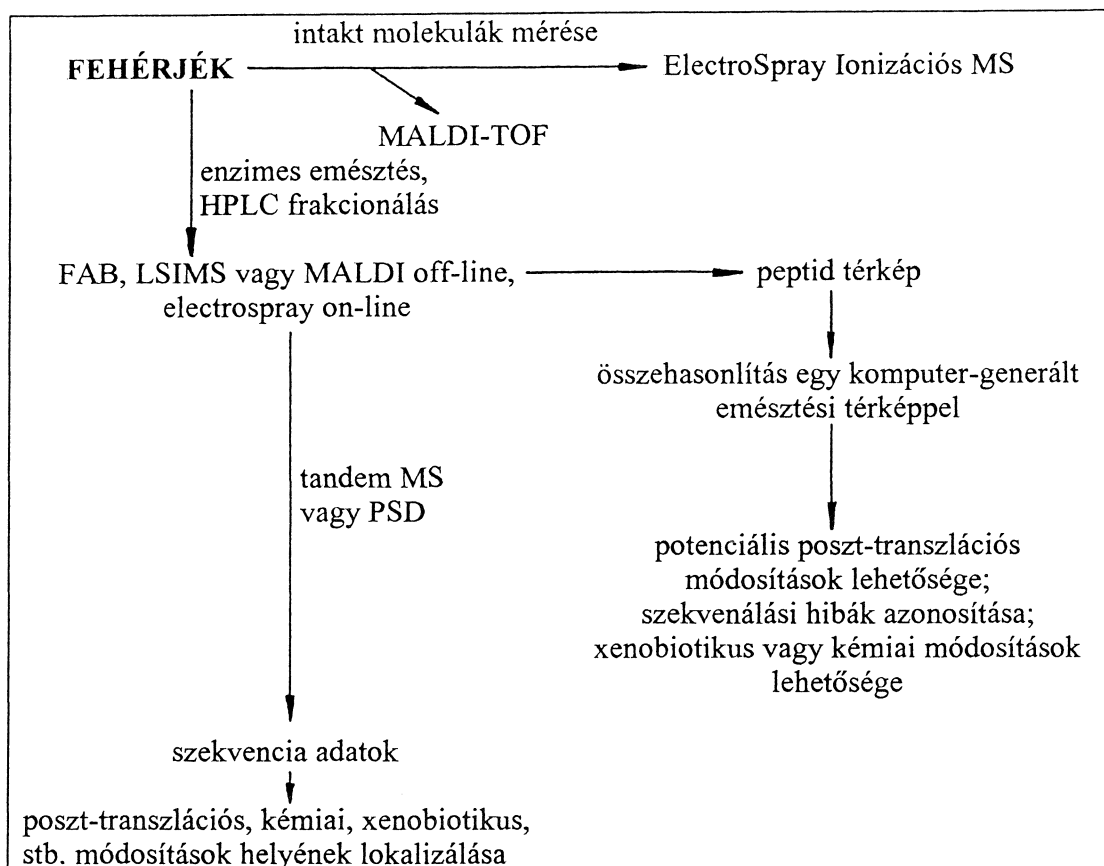
amely pillanatnyilag a SwissProt adatbázisban nyilvántartott, és összehasonlítják az eredményt az általunk mért tömegekkel¹⁵. Szerencsés esetben már ennyi is elegendő a fehérje azonosítására, amit később egy Western-blottal még meg is erősíthetünk. Bonyolítja a képet, hogy a 2-D analízis során, vagy később a fehérjék oxidálódhatnak (Met, Cys), reagálhatnak a gélben mindig jelenlévő akrilammiddal (Cys), a hasító enzimek a gélben esetleg nem férnek hozzá mindenütt a fehérjéhez, így ún. részlegesen hasított peptidek lehetnek jelen, és az is megesik, hogy az enzim ott hasít, ahol nem szabadna! Például, minden tripszin preparátum (még a TPCK kezelt, vagy a *sequencing grade* is) mutat valamennyi kimotripszin aktivitást, és a tripszin természetesen emésztí önmagát is¹⁸. Ha mindezekhez hozzá tesszük még azt, hogy igen különböző fehérjék is produkálhatnak közel azonos molekulásúlyú peptideket, és a MALDI-TOF tömegmérés sem feltétlenül pontos, nyilvánvalóvá válik, hogy muszáj megszekenálni legalább egy-két frakciót. Ez történhet tandem tömegspektrometriával, esetleg Edman szekvenálással. A ma elérhető talán legérzékenyebb módszer viszont on-target (a minta bevitelére szolgáló fémlemezkén történő) emésztés karboxipeptidáz-Y-nal, vagy aminopeptidázzal, MALDI-TOF tömegspektrometriával kombinálva. Néhány perc alatt a karboxipeptidáz részlegesen lehasít 4-6 aminosavat a peptid C-terminálisáról, a minta analizálható, a szekvencia gyakorlatilag leolvasható (3. ábra). Természetesen így csak szekvencia-részletet tudunk meghatározni, nem tudjuk megkülönböztetni az azonos gyöksúlyú Gln/Lys és Ile/Leu aminosavakat, de mindez figyelembe vehető, amikor most már a szekvenciával hasonlítjuk össze a fehérje-adatbázist. Probléma persze az is, hogy az aminopeptidáz nem hasítja le az N-terminális Pro-t, míg a karboxipeptidáz Y lelassul bizonyos szekvenciáknál.



3. ábra. “On-target” szekvenálás karboxipeptidáz Y emésztés és MALDI-TOF kombinálásával. A felvitt minta (nem standard fehérje!) ~250 fmol! az egyik HPLC frakció fél mikroliterében.

¹⁸ M.M. Vestling, C.M. Murphy, C. Fenselau, (1990), *Anal. Chem.* **62**, 2391-2394.

A 4. ábra nagy vonalakban bemutatja, mit is kínál még a tömegspektrometria egy fehérjeanalitikus számára.



4. ábra. Fehérjeszerkezet analízis menete tömegspektrometriával.

Az itt következő táblázatok pedig összefoglalják, hogy milyen problémákat milyen módszerekkel célszerű megoldani.

Módszer	Minta igény	Tömeg tartomány	Pontosság	Felbontás	Megjegyzések
LSIMS szektoros készülékkel	~100 pmol	<4000 Da	0,5 Da	~2000 esetleg magasabb	erős szupresszió
ESIMS kvadrupol készülékkel szektoros készülékkel	<100 pmol	<100 kDa	0,01 %	~500	gyenge szupresszió ua.
	<100 pmol	<100 kDa	0,01 %	2-5000	ua.
LC/ESIMS kvadrupol készülékkel szektoros készülékkel	0,5-50 pmol	<20 kDa	1-2 Da	~500	ua.
	0,5-50 pmol	<20 kDa	0,5 Da	2000	ua.
MALDI-TOF lineáris módban reflektronnal	<1 pmol	<100 kDa	~0,2 %	<500	diszkriminatív ua.
	~1 pmol	<100 kDa	~0,01 %	~2000	ua.

Mikor mit ajánlatos használni?

fehérje molekulásúly meghatározás
szintetikus peptidok analitikája
mass mapping
2-D gélekből mass mapping

ESIMS vagy MALDI-TOF
LSIMS vagy ESIMS
LC/ESIMS
MALDI-TOF vagy LC/ESIMS

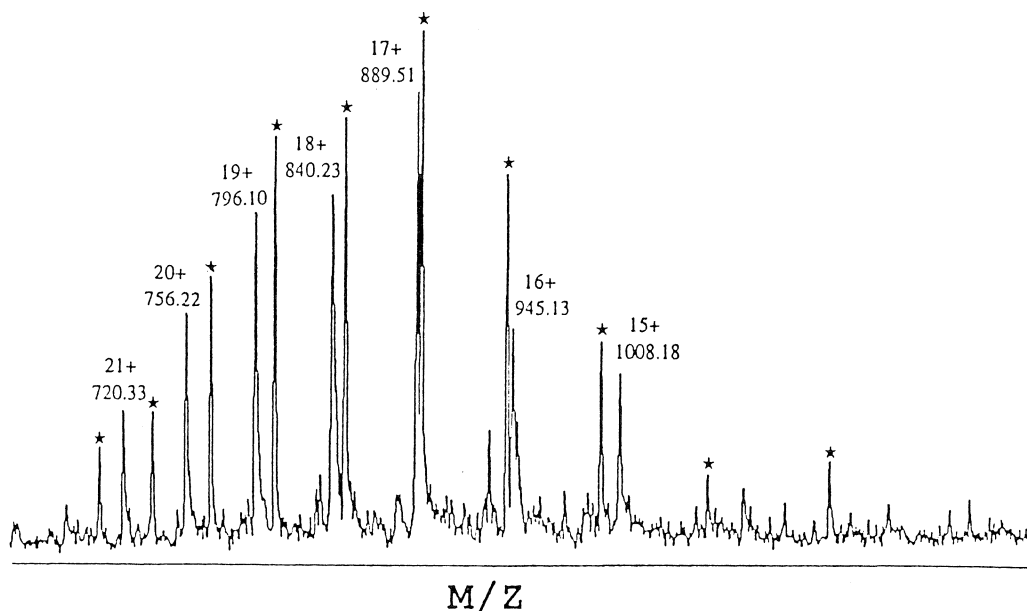
szekvenálásra

MS/MS: LSIMS nagyenergiájú CID-vel vagy
LC/ESIMS/MS, illetve:
MALDI-TOF reflektoros módban,
karboxipeptidáz Y emésztés

Kövessük csak a felkínált lehetőségeket:

Intakt fehérjék molekulásúlyának meghatározása. Lehetőleg szennyezésmentes preparátumra van szükség. Az ESIMS viszonylag pontos adatokat szolgáltat de hidrofób vagy nagyobb (>100 kDa) fehérjék analizésére a MALDI-TOF technika alkalmasabb.

a. Szekvencia-igazolás. Tömegméréssel valószínűsíthető, hogy a kívánt aminosavsorrendű fehérjét termeltettük, izoláltuk; hogy a szekvenálás során (ha eddig ismeretlen fehérjéről van szó), nem veszítettünk el kisebb-nagyobb darabokat. Amikor egy cípamájából izolált zsírsavkötő fehérje szekvenciáját meghatároztuk, ezzel a módszerrel igazoltuk, hogy a szekvencia teljes (5. ábra)¹⁹.



5. ábra. Egy cípamájából izolált zsírsavkötő fehérje ESIMS spektruma. Kb. 100 pmol fehérjét injektáltunk. A csillaggal jelölt csúcsok a belső standardként alkalmazott miogloblin ionjai. Az általunk meghatározott szekvencia alapján a számított molekulásúly 15.121,3 Da, míg a kísérletben meghatározott érték $15.124 \pm 2,5$ Da. (Engedéllyel reprodukálva [ref. 19])

¹⁹ K.F. Medzihradsky, B.W. Gibson, S. Kaur, Z. Yu, D. Medzihradsky, A.L. Burlingame, N.M. Bass (1992) *Eur. J. Biochem.* 203, 327-339.

A tömegmérés jelezheti, hogy a fehérje nem kívánatos helyeken hasadt, akár egy specifikus enzim működése következtében, akár valamelyik terminusa "rágott". A humán PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor), amelyet a Chiron Corporation élesztőben termeltet, 109 aminosavból áll és diszulfid-hidakkal homodimert képez. A diszulfid-hidak miatt a molekula kompakt, ESIMS módszerrel csak redukálás és az így felszabaduló SH csoportok alkilezése után analizálható. Ez az analízis többek között kimutatta, hogy a peptidláncok jelentős részét egy tripszin-szerű enzim hasította a Arg³²-nél, és a preparátum egy részénél a C-terminális Thr hiányzott. A tömegmérés jelezhet mutációt, azaz aminosav-cserét természetes fehérjékben. Például, a californiai Oakland Children's Hospital egyik kutatócsoportja rendszeresen vizsgálja az újszülöttek hemoglobinját, így szűrik ki a mutáns fehérjéket. A globinok molekulásúlya viszonylag egyszerűen mérhető, a rendellenesség típusa általában már ennek alapján azonosítható²⁰.

b. Poszt-transzlációs módosítások kimutathatók. 80 Da tömegnövekedés foszfát- vagy szulfátcsoportot jelezhet. Smith et al. így detektáltak foszforilációt egy marhaszemből izolált fehérjén, az α B-crystalline-on²¹. Japán orvosok egy örökletes betegségben szenvedő család vizsgálata közben elektroforetikus vizsgálatokkal bizonyos szérumfehérjék rendellenes viselkedését mutatták ki. Mint ez később bebizonyosodott, a családtagok az ún. Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome áldozatai. Tömegspektrometriás vizsgálatok kimutatták, hogy a normálisan kétszeresen glikozilált transferrin például keverékként jelenik meg a betegek vérében, natív formában, egy cukor-szerkezettel vagy mindenfajta szénhidrát nélkül. Későbbi vizsgálatok azt is jelezték, hogy valószínűleg a kívánt szerkezet található meg a glikozilált fehérjén (- komplex, disialo biantennary -) a jelenlegi hipotézis szerint talán nem áll rendelkezésre elegendő "alapanyag" mikor az Asn-hoz kapcsolódó szénhidrát beépítésre kerül²².

c. Egyéb kovalens módosítások is kimutathatók. A fehérje-analitikában gyakran használunk különféle kis molekulákat annak tesztelésére, mely aminosavak hozzáférhetőek, reaktívak, részei az ún. aktív centrumnak. A szelektív inhibitorok valószínűleg olyan aminosavakhoz kötődnek, amelyek vagy aktívan részt vesznek a katalizált reakcióban, vagy ilyen aminosavak közelében helyezkednek el. A HIV proteáz nélkülözhetetlen a *gag/pol* gének által kódolt vírusfehérjék processzáálásában. Tanszékünkön régóta kutatják a HIV proteáz hatásmechanizmusát, hogy szelektív inhibitorokat fejlesszenek ki. Ha sikerülne olyan vegyületet kifejleszteni, amely a gazdaszervezet enzimeit nem gátolja, sikeresen elejét vehetnének a betegség kifejlődésének. Pillanatnyilag igyekszünk minél többet kideríteni az enzim aktív centrumáról. Első lépésként az ESIMS tömegmérés bizonyította, hogy egy Asp proteáz inhibitor (AEPNP, azaz 1,2-epoxi-3-(paranitro-phenoxi)-propán), kovalensen módosítja az enzimet, de csupán a dimer egyik tagját és ez tökéletes inaktiválódáshoz vezet²³. Alább majd bemutatjuk, hogyan deríthető fel, pontosan hol és hogyan kötött az inhibitor.

²⁰ A.M. Falick, C.H.L. Shackleton, B.N. Green, H.E. Witkowska, (1990) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 396-400.

²¹ J.B. Smith, Y. Sun, D.L. Smith, B. Green (1992) *Protein Science*, **1**, 601-608.

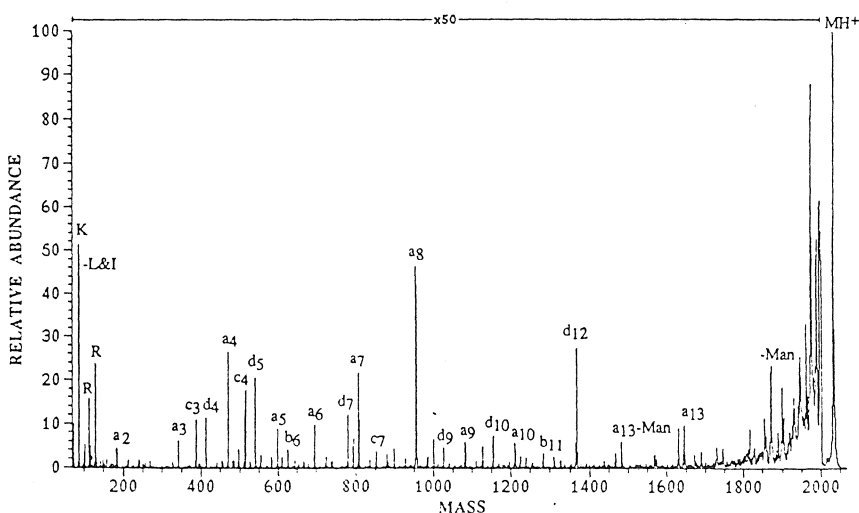
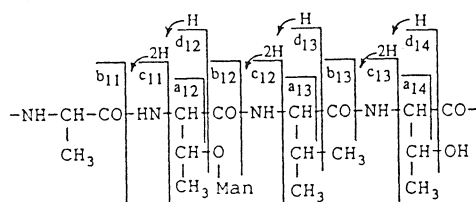
²² Y. Wada, A. Nishikawa, N. Okamoto, K. Inui, H. Tsukamoto, S. Okada, N. Taniguchi, (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 832-836.

²³ R. Salto, L.M. Babe, J. Li, J.R. Rose, Z. Yu, A.L. Burlingame, J.J. De Voss, Z. Sui, P. Ortiz de Montellano, C.S. Craik (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 10691-10698.

Mass mapping

Míg az intakt fehérje tömegmérése jelezheti kovalens módosítások jelenlétét, esetleges változásokat a szekvenciában, stb., ezen változások pontosabb helyét az analízis további lépése, az ún. mass mapping fogja majd felfedni. A módosított fehérje enzimés emésztési elegyét vizsgáljuk, lehetőleg LC-ESIMS technikával. Ennek az on-line módszernek az a legnagyobb előnye, hogy ami a HPLC oszlopról eluálódik, azt automatikusan analizáljuk. Az így nyert adatok újra és újra megvizsgálhatók, ún. selected ion monitoring segítségével (azaz a komputert utasítva, hogy nyomtassa ki bizonyos ionok intenzitásának időbeli változását) nyomozhatunk a bennünket érdeklő komponens után. Az analízis általános menete szerint összehasonlítjuk az ismert szekvencia és a használt enzim specificitása alapján megjósolt molekulasúlyokat az emésztési elegyben detektált molekulasúlyokkal. A megfigyelt különbségek jelzik az esetleges szerkezeti különbségeket (6. ábra).

	Ile	Val	Arg	Lys	Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Glu
a	86	185	341	469	597	694	807	955	1083	1211	1282	1545	1644	1745	1858	
b		213	369	497	625		835	983	1111	1239	1310	1573	1672	1773	1886	
c			386	514			852	1000	1128	1256	1327	1590	1689	1790	1903	
d				412	540		779	879	1026	1154		1367	1630	1729	1816	



6. ábra. Egy *O*-glikozilált peptid nagy energiájú CID spektruma. Ezt a glikopeptidet élesztőben termeltetett humán PDGF-B endoproteáz Glu-C emésztési elegyéből izoláltuk. Egy mannóz csoport (ezzel *O*-glikozilál az élesztő) 162 Daltonnal növeli meg egy peptid molekulaszúlyát. A CID analízis során többek között a peptidkötések hasadnak. Ha a töltés az N-terminálison lokalizálódik, ún. b-ionok képződnek. Ezen ionok tömegkülönbsége egy-egy aminosav gyöksúlyának felel meg. Ha az aminosav valamilyen módon derivatizálva van, a tömegdifferencia ennek megfelelően megnövekszik. A fragmensionok ilyen "elcsúszásából" határozható meg a módosítás helye a szekvenciában. A szerkezet-részlet azokat az ionokat mutatja, amelyek jelezték, melyik Thr van módosítva. (Engedéllyel reprodukálva: K.F. Medzihradszky et al. (1990) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 777-781.)

Ha egy emésztési elegyben nem találtunk meg egy megjósolt peptidet, de helyette megfigyeltünk egy másik komponenst, aminek a molekulásúlya 80 Da-nal több, elképzelhető, hogy peptidünk foszforilált. Egy 162 Da-os súlynövekedés egy hexóz jelenlétét mutathatja, 365 Da viszont egy hexozil-N-acetil-hexózamin cukorszerkezetet jelenthet, egy szialsav még 291 Da-nal növeli a molekulásúlyt. Az N-terminális acetilezése 42 Da növekedést jelent a molekulásúlyban, hogy csak néhány gyakori poszt-transzlációs módosítást említsünk. A molekulásúly-különbség természetesen csak valószínűsíti egy kovalens módosítás létét. Miután rengeteg különféle peptid produkálhatja ugyanazt a molekulásúlyt és szennyeződések, mellékreakciók és aspecifikus hasítások is sűrűn előfordulnak, tandem tömegspektrometria vagy Edman szekvenálás, esetleg más, a módosító csoport szerkezetétől függő módszer szükséges még, hogy biztonsággal állíthassuk, mely peptid és azon belül melyik aminosav van módosítva. Miután az Edman szekvenálás rendszerint csak egy üres ciklussal jelzi egy szokatlan aminosav jelenlétét, és bizonyos módosulások pl. foszforiláció, nem is élnek túl a ciklusokban használatos kémiai reakciókat, a tandem tömegspektrometria használata erősen kívánatos.

Az intakt tömegmérésnél említett valamennyi fehérje eljutott erre az analízis-szintre. Nézzük csak, mi is történt velük. A Carbohydrate Deficient Protein Syndrome-ban szenvedőktől és egészséges emberektől vett vérből izolált transferrint tripszinnel emésztették, és összehasonlították a kapott peptideket mass mapping módszerrel²⁴. A módosítás helyét ebben az esetben nem kellett külön igazolni, mivel a nitrogénhez kapcsolódó cukorszerkezetek csak olyan Asn-on fordulhatnak elő, amely kielégíti az Asn-Xxx-Ser/Thr/Cys szekvencia-követelményt, ahol Xxx nem lehet Pro. Természetesen a szénhidrát-analízist külön el kellett végezni, a mass mapping csak a cukorszerkezet nagyságát árulja el. A cukorrész lépésenkénti hasítása erősen specifikus exoglikozidázokkal történik, és minden egyes hasítás után LC-ESIMS vagy MALDI-TOF analízis segíthet azonosítani a láncalkotó szialsavakat, hexózokat, N-acetil-hexózaminokat stb. Szerencsés esetben még a glikozid-kötések pozíciójáról és sztereokémiájáról is kaphatunk némi információt^{25,26}. Az élesztőben termeltetett humán PDGF-B esetében a MALDI-TOF eredmények nyilvánvalóvá tették a termék heterogenitását. A redukált és alkilezett (karboximetilezett) fehérjét tripszinnel vagy Glu-C endoproteázzal emésztettük, a peptideket analitikai HPLC-n választottuk szét és LSIMS technikával analizáltuk. A fent említett problémákon túl a mass mapping kovalens módosításokat is sugallt. A későbbi MS/MS kísérletek kimutatták, hogy a szekvenciában szereplő egyetlen metionin oxidálódott (szulfoxiddá), továbbá az élesztősejtek hexózokat raktak egyes hidroxil-aminosavakra (6. ábra). Az élesztő glikozilációs mechanizmusának ismeretében igen valószínű volt, hogy mannóz csoportokról van szó, amit később a cukrok lehasításával, és direkt analízisével igazoltunk is²⁷. Poszt-transzlációs módosítások egész sorát mutatták ki hasonlóképpen, tömegspektrometria segítségével, foszforilációt^{28,29}, N-terminális

²⁴ M. Kanai, K. Yamashita, H. Ideo, T. Ohkura, K. Fukushima (1993) *Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, CA, p.371.

²⁵ C.A. Settineri, A.L. Burlingame, (1994) in: *Techniques in Protein Chemistry V* (J.W. Crabb ed.), Academic Press, Inc., San Diego, 97-104.

²⁶ C.W. Sutton, J.A. O'Neill, J.S. Cottrell (1994) *Anal. Biochem.*, **218**, 34-46.

²⁷ C.A. Settineri, K.F. Medzihradsky, F.R. Masiaz, C. Chu, C. George-Nascimento, A.L. Burlingame, (1990) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **19**, 665-676.

²⁸ A. K. Erickson, D.M. Payne, P.A. Martino, A.J. Rossomando, J. Shabanowitz, M.J. Weber, D.F. Hunt, T.W. Sturgill (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 19728-19735.

²⁹ D.A. Sanders, B.L. Gillece-Castro, A.M. Stock, A.L. Burlingame, D. E. Koshland, Jr. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 21770-21778.

acetilezést^{8,19}, N- és O-glikozilációt^{30,31,32,33}, palmitilációt³⁴, hogy csak néhányat említsek.

Az analízis menete pontosan ugyanez akkor is, ha más (pl. általunk beépített) kovalens módosításra vadászunk. Így azonosítottuk a Asp²⁵-t, mint az inhibitor kötőhelyét a HIV proteáz enzimben²³. Ugyanígy mass mapping és tandem tömegspektrometria segített meghatározni aminosavakat a kreatinkináz³⁵ és dopamine β-hidroxiláz aktív centrumában³⁶. Bizonyos gyógyszer-metabolitok immunogén adduktokat képezhetnek pl. szérum albuminnal. Tolmetin (1-metil-5-(4-metilbenzoi)-1H-pirrol-2-ecetsav), egy gyulladásgátló gyógyszer metabolitjainak kötőhelyét sikerült kimutatni mass mapping és MS/MS segítségével³⁷. Hasonlóképpen, a hemoglobin klinikai markerként szolgálhat, ha valaki túl sok veszélyes vegyszernek kitéve dolgozott. Sztírol-epoxid kötődését sikerült kimutatni hemoglobin fehérje részén tömegspektrometria segítségével³⁸.

Az itthoni helyzet

Ebben az összefoglalásban távolról sem törekedünk a teljességre. A tömegspektrometria orvosbiológiai alkalmazásai igen szerteágazó területet ölelnek fel és jelenleg olyan gyorsan fejlődnek, hogy minden hét új meglepetéseket hozhat, soha nem sejtett távlatokat nyithat meg. Cikkünk megírásával két célunk is volt:

Mint gyakorló fehérjeanalitikusok, kiemeltük a legfontosabbnak tartott eredményeket és a biokémikus szemszögéből igyekeztünk felvázolni a lehetőségeket ezen a területen.

Tudjuk, hogy az olvasóban felmerült a kérdés: ez mind nagyon szép San Franciscoból nézve, de mit tudunk mi itthon tenni, mi az, ami ebből rendelkezésre áll vagy reálisan beszerezhető. Nos a válasz az, nagyon is sok! Tandem készülék rendelkezésre áll az MTA KKKI-ban, LC-MS triplequadropole készülék van az EGIS-ben, továbbá a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetemen is most állítottak fel egy LC-MS Electrospray készüléket. A lézerkészülékek nem túl drágák a hagyományos tömegspektrométerekhez viszonyítva és reflektronnal felszerelve a legtöbb célra tökéletesen megfelelnek. Akit a téma érdekel, a bőséges irodalomjegyzékből tovább tájékozódhat és mi is szívesen állunk az érdeklődők rendelkezésére.

³⁰ A.J. Reason, H.R. Morris, M. Panico, R. Marais, R.H. Treiman, R.S. Haltiwanger, G.W. Hart, W.G. Kelly, A. Dell, (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16911-16921.

³¹ R.J. Harris, H. van Halbeck, J. Glushka, L.J. Basa, V.T. Ling, K.J. Smith, M.W. Spelmann (1993) *Biochemistry*, **32**, 6539-6547.

³² V. Ling, A.W. Guzzetta, E. Canova-Davis, J. Stults, T.R. Covey, B.I. Shushan, W.S. Hancock, (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 2909-2915.

³³ M.C. Huberty, J.E. Vath, W. Yu, S.A. Martin (1993) *Anal. Chem.*, **65**, 2791-2800.

³⁴ D.I. Papac, K.R. Thornburg, E.E. Bullesbach, R.K. Crouch, D.R. Knapp, (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16889-16894.

³⁵ D.D. Buchter, K.F. Medzihradzky, A.L. Burlingame, G.L. Kenyon (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 2173-2178.

³⁶ W.E. De Wolf, Jr., S.A. Carr, A. Varrichio, P.J. Goodhart, M.A. Mentzer, G.D. Roberts, C. Sothan, R.E. Dolle, L.I. Kruse (1988) *Biochemistry*, **27**, 9093-9101.

³⁷ A. Ding, J.C. Ojingwa, A.F. McDonagh, A.L. Burlingame, L.Z. Benet (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3797-3801.

³⁸ S. Kaur, D. Hollander, R. Haas, A.L. Burlingame (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 16981-16984.

A NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓ GÉNAKTIVÁCIÓS JELENSÉGEI*

Szeberényi József

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Biológiai Intézet

Munkacsoportunk érdeklődési területe az idegsejt növekedési faktor (NGF) génregulációs hatásának vizsgálata. A PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonal kitűnő modell rendszert szolgáltat az NGF-indukálta neuronális differenciációt kísérő biokémiai változások tanulmányozására (1): ezek a sejtek könnyen tenyésztethetők, NGF nélkül is életben maradnak és NGF-kezelés hatására könnyen értékelhető morfológiai változásokon (neuritnövekedés) mennek keresztül.

Proto-onkogén Ras fehérjék jelentősége az NGF jelátviteli útjaiban

A PC12 sejtek fő szignál transzdukciós komponensei lineáris rendben helyezhetők el (1. ábra). Az NGF sejtfelszíni receptoraként a proto-onkogén TrkA fehérje és egy p75^{NGFR} polipeptid szerepel; előbbi látszik közvetíteni a biológiai hatást, utóbbi pontos szerepe még nem tisztázott (2). Az NGF-kötés a TrkA fehérje tirozin-autofoszforylációját váltja ki, majd a jel az aktivált TrkA által megkötött és tirozin-foszforylált különböző szignál transzdukciós fehérjékre továbbítódik. Ezen fehérjék egy része a Ras fehérjét GTP-kötő állapotba hozva aktiválja, majd a stimuláció citoplazmatikus fehérjekinázokra tevődik át (3, 4). A fehérjekináz kaszkád percek alatt indukál egy géncsoportot (elsődlegesen reagáló vagy korai válasz gé-

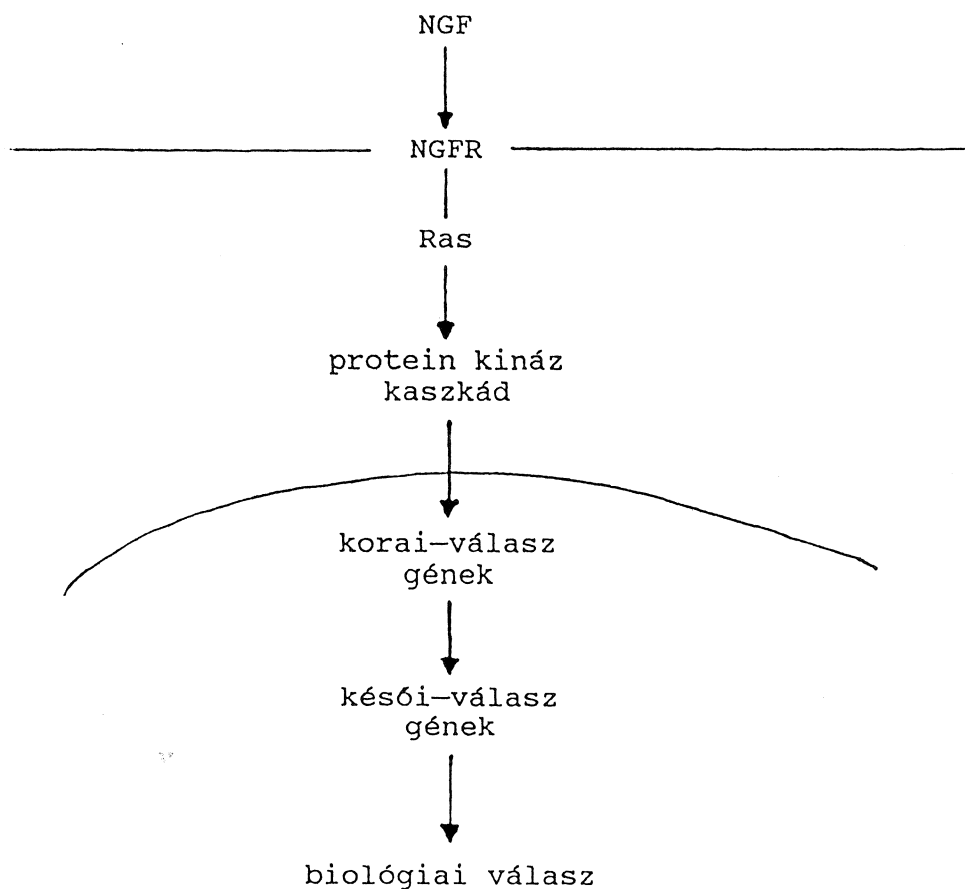
* A cikk anyaga előadásként szerepelt a 3. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napokon (Pécs, 1995. jan. 23-25.). Az összefoglalóban szereplő saját munka részben az OTKA (T 012925), az ETT (T-04615/93) és a Magyar-Amerikai Közös Alap (93a-319) támogatásával folyik.

** Rövidítések: NGF, nerve growth factor; NGFR, nerve growth factor receptor; AP-1, activator protein-1; SRE, serum response element; SRF, serum response factor; TCF, ternary complex factor; CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; JNK/SAPK, c-Jun N-terminus kinase/stress-activated protein kinase; TNF α , tumor necrosis factor α ; EGF, epidermal growth factor; SEK, SAPK/ERK kinase; MEKK, MEK kinase; CREBK, CREB kinase; FRK, c-Fos-regulating kinase.

nek), amelynek számos tagja transzkripciós faktorok termelésén keresztül szabályoz egy másik géncsaládot (másodlagosan reagáló vagy késői válasz gének; 5). A késői válasz gének termékei (pl. a metalloproteináz tranzin, neurofilament fehérjék, stb.) feltehetően közvetlenül vesznek részt a morfológiai differenciációhoz vezető fenotípus változásokban.

A jelátviteli folyamatoknak ez a lineáris értelmezése nyilvánvalóan túlzott leegyszerűsítése a tényleges helyzetnek.

A valóságban a szignál transzdukciós molekulák egy komplex, párhuzamos ösvényekből álló, de gyakran kommunikáló jelátviteli hálózatot hoznak létre. Ennek a bonyolult rendszernek egy példáját a Ras fehérjék jelátviteli szerepének vizsgálata szolgáltatja. Az endogén Ras fehérjék működésével interferáló mutánst



1. ábra: Az NGF-jelátvitel fő komponensei.

(Ha-Ras Asn-17; 6, 7) expresszálo PC12 sejtvonalak tanulmányozásával erősen Ras-függő (pl. NGF-indukált neuritnövekedés, tranzin indukció), gyengén Ras-függő (pl. c-fos és c-jun indukció) és Ras-független (pl. foszfatidil-inozitol hidrolízis) jelátviteli eseményeket tudunk azonosítani (8-10). A gátló Ras fehérjét különböző szinten expresszálo PC12-sejtvonalakban az NGF által stimulált korai válasz gén expresszió, illetve a késői válasz gének indukciója és a fenotípus-változás egymástól elkülöníthető (I. táblázat):

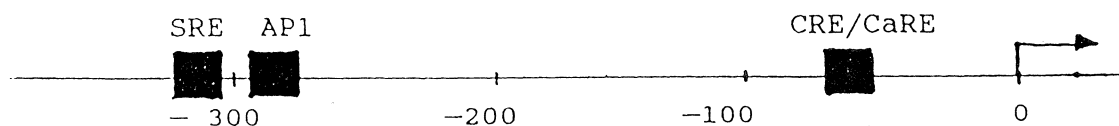
NGF HATÁS	M17-SZUBKLÓNOK	
	gyenge Ras-Asn17 expresszió	erős Ras-Asn17 expresszió
Korai válasz gének indukciója (c-fos, c-jun, zif268, junB, pip92)	+++	+
Késői válasz gének indukciója (tranzin, SCG10)	–	–
Biológiai válasz (neuritnövekedés)	–	–

I. táblázat: Ras fehérjék szerepe az NGF génexpressziós és biológiai hatásának közvetítésében.

az utóbbiak teljes gátlása elérhető, anélkül, hogy a jelközvetítésben fontosnak tartott korai válasz gének (c-fos, c-jun, stb.) aktivációja csökkenne.

A komplex génszabályozás iskolapéldája: a c-fos promoter

Számos gén promoter régiójának szabályozó szekvenciáiról készült részletes térkép (11). A legalaposabban vizsgált példa a korai válasz gének osztályába tartozó c-fos gén promotere (2. ábra). Ez a proto-onkogén az AP-1 transzkripció faktor egyik

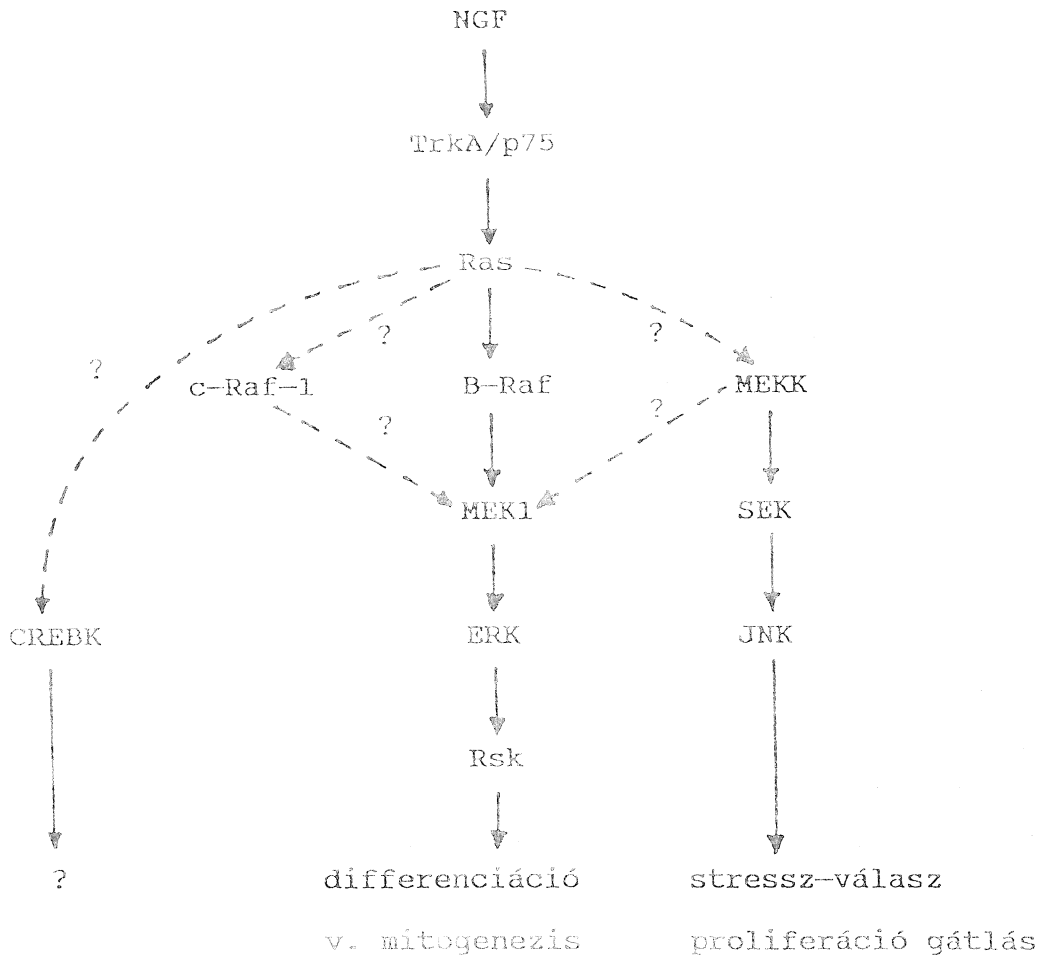


2. ábra: A c-fos gén promotere

alkotórészét kódolja; az AP-1 számos cél-gén expressziójának szabályozásában vesz részt. A c-fos promoter régiójában legalább 3 fő enhancer-elemet azonosítottak. A **szérum reszponzív elemet (SRE)**, a szérum reszponzív faktor (SRF) és az ún. ternary komplex faktor (TCF) ismeri fel, szérum és polipeptid növekedési faktorok stimuláló hatását közvetíti és a c-fos promoter fő Ras-reszponzív elemének tekintik. Az **AP-1 helyet** Fos/Jun heterodimerek vagy Jun/Jun homodimerek (AP-1 faktorok) kötődése aktiválja és eredetileg forbolészter-indukálható elemként írták le. PC12 sejtekben azonban ezt az elemet NGF is aktiválja, méghozzá Ras-függő és protein kináz C-független módon, szabályozása tehát sokkal bonyolultabb, mint azt eredetileg gondolták (9). A **cAMP-reszponzív elemet (CRE)** a CREB fehérje kötődése stimulálja, ezt viszont a protein kináz A (cAMP-út), a kalmodulin-függő kinázok (Ca⁺⁺-út) és a CREB kináz (NGF-stimulált, Ras-függő út) egyaránt képesek aktiválni (12). A c-fos promoter példája kitűnően mutatja, hogy az ugyanarról a jelátviteli fehérjéről (pl. a TrkA receptorról) divergáló szignál transzdukciós utak ugyanazon promoter különböző enhancer elemeit képesek szabályozni, (pl. SRE, AP-1, CRE), és fordítva: konvergáló utak végződhetnek ugyanazon a ciszhatású szekvencia-elemen (pl. a CRE szabályozása). A jelátviteli utaknak ez a bonyolult hálózata rendkívül finom szabályozást tesz lehetővé, ugyanakkor igen nehezé teszi az egyes utak azonosítását és jelentőségük tisztázását.

Ras-függő transzcitoplazmatikus fehérjekináz kaszkádok PC12 sejtekben

Az elmúlt 3 évben rendkívül gyors haladás történt a növekedési faktorok receptorairól a sejtmagba történő jelátviteli lánc egyes komponenseinek azonosításában. Az erőfeszítések jelentős része a folyamatban részt vevő citoplazmatikus fehérjekináz rendszerek vizsgálatára koncentrált: e témában számos közlemény és több kitűnő összefoglaló készült (közülük az egyik legutolsó Marshall review-cikke /13/). A lassan összeálló kép egymással párhuzamosan futó, de több ponton kapcsolódó, nagyszámú komponensből álló fehérjekináz kaszkádokat mutat, melyek legtöbb elemét PC12 sejtekben is megtalálták. A foszforilációs kaszkád mellett ezeknek a párhuzamos szignalizációs rendszereknek másik közös jellemzője, hogy központi helyet foglal el bennük egy fontos és növekedő tagszámú fehérjekináz-család, a MAPK (azaz mitogén-aktivált protein kináz) család, egyik tagja. A MAPK izozimek jelentős szekvenciahomológiát mutatnak egymással és foszforilációs helyük a célfehérjékben S/T-P motívumot tartalmaz: a MAPK-ok tehát a prolin által irányított szerin/treonin kinázok közé tartoznak (14). PC12 sejtekben jelen pillanatban 3 fő MAPK izozim expressziójáról és NGF-jelátvitelben való részvételéről tudunk: az ERK (extracelluláris szignál által regulált kináz), a JNK (c-Jun N-terminális kináz) és a CREBK (CREB kináz) (3. ábra).



3. ábra: NGF-stimulált fehérjekináz kaszkádok

A fehérjekináz kaszkádok közül az időrendben először leírt Ras/Raf/MEK/ERK utat tekintik ma a mitogén és differenciációs

jelátvitel fő közvetítőjének (3, 4). Az NGF-receptor ligandstimulációjának eredményeképpen a Ras GTP-kötő formába kerülve aktiválódik és a citoplazmából a sejtmembrán belső felszínére vonzza a szerin/treonin-specifikus Raf fehérjekináz család egyik tagját. A mitogén választ adó sejtekben ez a széleskörű expressziót mutató c-Raf-1 fehérje, PC12-ben azonban a család másik tagja, a B-Raf, amelynek expressziója néhány neurontípusra korlátozódik (15). Az aktivált B-Raf szerinfoszforilációval stimulálja a MEK-(MAPK/ERK kináz)-család PC12 sejtekben expresszálódó izozimét (MEK1; 16). Ez az enzim, mint az egész út, kritikus az NGF-jelátvitel szempontjából: konstitutív mutánsa neuritnövekedést indukál, interferáló mutánsa viszont blokkolja az NGF-indukált differenciációt (17). A MEK1 kettős specifikitású kináz: szubsztrátumát, az ERK-t treonin és tirozin oldalláncokon foszforilálva aktiválja. Az ERK-k számos célfehérjét foszforilálnak, köztük transzkripciós

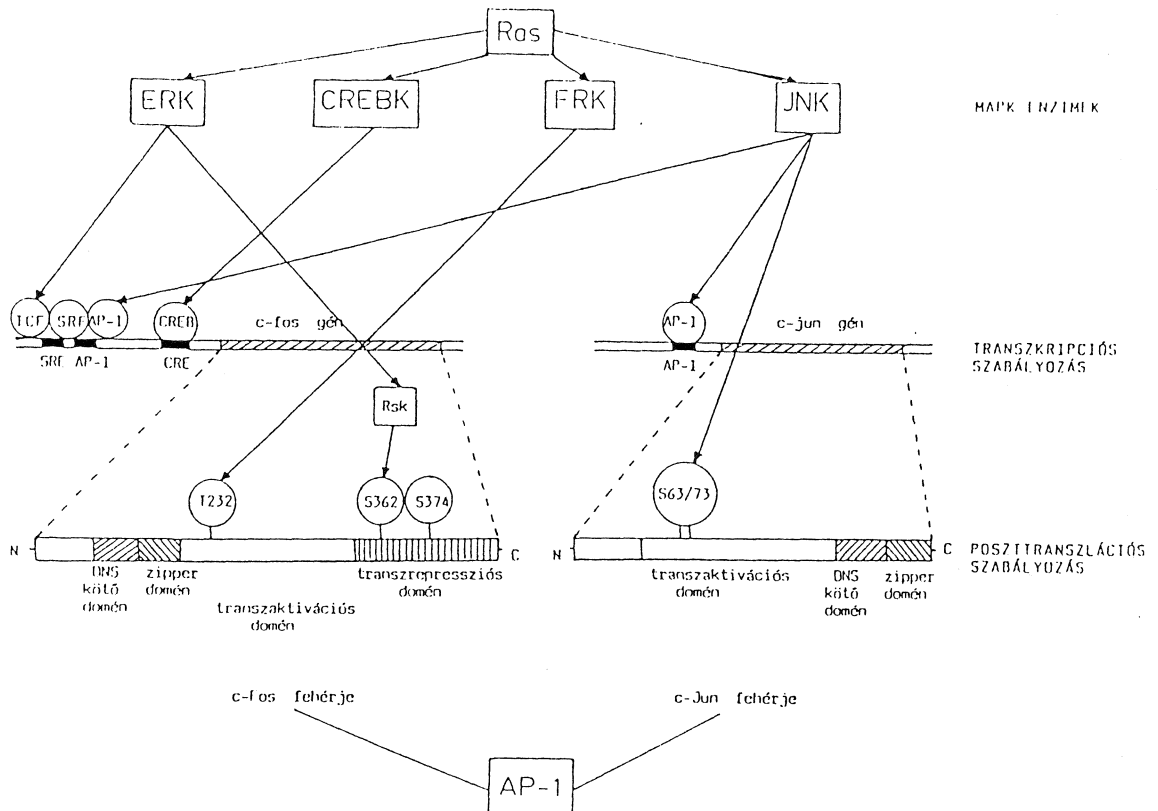
faktorok és az azokat foszforiláló fehérjekinázok (pl. Rsk) is vannak. NGF-hatásra az ERK-k transzlokálódnak a magba, ez a lépés kritikusnak látszik a differenciációs válaszhoz (13). Jelenlegi tudásunk szerint a Ras/ Raf/MEK/ERK út az NGF differenciációs hatásának fő közvetítője. A c-Jun fehérje foszforilációjának vizsgálata vezetett az elmúlt 2 évben egy másik transzcriptoplazmatikus fehérjekináz kaszkád, a **Ras/MEKK/SEK/JNK** út feltérképezéséhez (a nagyszámú eredeti közlemény listáját a 13, 14 review-cikkek tartalmazzák). Az út disztális enzimei, a JNK-k ubiquiter expressziójú enzimek, amelyek aktiváló hatású szerin-foszforilációt hajtanak végre a c-Jun fehérjén. Növekedési faktorokon kívül számos olyan hatás is aktiválja ezeket az enzimeket (pl. $TNF\alpha$, UV-besugárzás, hő sokk), amelyek stresszválaszt váltanak ki a sejtekben (innen származik az enzimek másik elnevezése: stressz-aktivált protein kinázok, SAPK-k). PC12 sejtekben az NGF, EGF és UV besugárzás általi aktiváció Ras-függő, a $TNF\alpha$ által kiváltott JNK-stimuláció viszont Ras-tól független mechanizmussal valósul meg. A fehérjekináz kaszkádban a JNK-októl proximálisan elhelyezkedő SEK (azaz SAPK/ERK kináz) aminosavsorrendjében és biokémiai jellemzőjében is a MEK analógja. Kettős specifikitású kinázként treonin- és tirozin-foszforilációval aktiválja a JNK enzimeket. A sor legproximálisabb enzime a MEKK (MEK kináz). Mint azt neve is mutatja, a MEKK-et eredetileg a Ras/Raf/MEK/ ERK út egy, a Raf alternatívájaként szereplő jelátviteli fehérjének tekintették, valószínűbb azonban, hogy inkább a stresszaktivált út egyik komponense. PC12 sejtekben nagy mennyiségben expresszálódik, konstitutív aktivációja erősen proliferáció- gátló hatású. A Ras/MEKK/SEK/JNK út valamennyi eleme expresszálódik PC12 sejtekben, az NGF-jelátvitelben játszott szerepe azonban még nem tisztázott.

A MAPK-család újonnan felfedezett tagja a **CREBK** (12). Ez az enzim PC12 sejtekben expresszálódik, NGF kezeléssel Ras-függő módon stimulálható és a CREB fehérjében ugyanannak a szerinoldalláncnak a foszforilációját végzi, mint a protein kináz A és a kalmodulin-függő protein kináz. A CREBK NGF jelátviteli szerepére utal, hogy a CRE-enhancer szükséges (bár nem elégséges) a c-fos promoter NGF-indukciójához, hogy CRE-elemek jelen vannak számos NGF-indukálható korai (pl. zif268, nur77) és késői válasz gén (pl. tranzin, tirozin hidroxiláz, periferin, Na^+ -csatorna génje) promoterében. Így, bár jelenleg sem proximális szabályozó mechanizmusai, sem a neuronális differenciációban játszott pontos szerepe nem ismert, a CREBK-al kapcsolatos vizsgálatok valószínűleg érdekes eredményeket tartogatnak számunkra.

A MAPK-család további tagjainak (pl. az FRK /c-Fos-reguláló kináz/ enzimnek (18), l. 4. ábra) szignál transzdukciós szerepét is vizsgálják, az NGF-jelátvitelben való részvételükre azonban még nincsenek adatok.

Az AP-1 aktivitás szabályozása

A kép tehát rendkívül bonyolult és várható, hogy további szereplők felfedezésével, részletek tisztázásával még komplexebbé válik. Ennek illusztrálására álljanak itt annak a szignál transzdukciós hálózatnak a fő elemei,



4. ábra: Az AP-1 transzkripciósfaktor szintjének és aktivitásának szabályozása.

amely hálózat egyetlen transzkripciósfaktor, az AP-1 szabályozását végzi (4. ábra). Az AP-1 faktor a fos és jun proto-onkogén családok tagjai által kódolt fehérjék dimérje, amely számos, promoterében az AP-1-re specifikus enhancer elemet tartalmazó gén átírását szabályozza. A sejt nyugalmi AP-1 aktivitása egyebek mellett növekedési faktor stimulációval fokozható. A serkentés transzkripcionális és posztranszlációs szinten egyaránt érvényesül. Növekedési faktor hatására a Ras közvetítésével a c-fos és c-jun gének aktivációja következik be, ezt az ERK --> TCF, a CREBK --> CREB és a JNK --> AP-1 foszforilációs események közvetítik. (Nyugalmi sejtben az AP-1 Jun homodimerekből áll, így az FRK aktiváció ekkor még nem játszik szerepet.) A génindukció következtében újonnan szintetizált Fos és Jun

fehérjék jelennek meg a sejtben, amelyek stimuláló jellegű foszforilációját elsősorban az FRK és JNK enzimek végzik. Az említett hatások következtében az AP-1 aktivitás emelkedik, ami további génexpressziós változásokhoz vezet. Az AP-1 stimulációt természetesen számos egyéb tényező befolyásolja: a celluláris környezet (egyes fehérjekinázok és transzkripciós faktorok expressziója szövetspecifitást mutat), egyéb ágensek (a transzkripciós faktorok aktivitását másodlagos messengerek modulálhatják, pl. a cAMP --> PK A rendszer a CREB-ét, a diacilglicerint --> PK C út az AP-1-ét, stb.), egyes kinázok gátló foszforilációt is végezhetnek (pl. az ERK-k által végrehajtott c-Jun foszforiláció), foszfoprotein foszfatázok módosíthatják a transzkripciós faktorok foszforiláltsági szintjét.

Modell-rendszer párhuzamos NGF-jelátviteli utak vizsgálatára

A jelátviteli hálózatokat alkotó utak tanulmányozásának bevett módszere az egyes utak szelektív gátlása és a következmények vizsgálata. Egyéb módszerek (többé-kevésbé specifikus gátlószerek alkalmazása, antisense oligonukleotidok expressziója, specifikus antitestek mikroinjekciója) mellett bevált eljárás domináns módon gátló mutáns fehérjék bevitele a vizsgálandó sejtekbe. A módszer előnye, hogy stabil transzfekcióval a mutáns fehérjét expresszáló sejtvonalak izolálhatók és részletes biokémiai vizsgálatok végezhetők rajtuk.

Domináns negatív Ras-fehérjét termelő PC12 sejtvonalaink modellként használhatók a Ras szerepének vizsgálatára az NGFjelátvitelben. Eltérő mértékben Ras-függő utak szelektíven vizsgálhatók és tanulmányozhatók (l. I. táblázat). Jelenlegi munkánk középpontjában a korai és késői válasz gének indukciója és a biológiai hatás közötti kapcsolat tanulmányozása áll. Előkísérletek tanúsága szerint a c-Fos és Zif268 korai géntermékek szintézise és foszforilációja nem elégséges a késői válasz gének indukciójának és a neuritnövekedésnek a kiváltásához. Egy másik kísérletsorozatban különböző mértékben Ras-függő, NGF-indukálható géneket keresünk a differential display módszerével (19); az eddig talált, különböző sejtvonalainkban eltérően expresszálódó cDNS-ek további vizsgálata hasznos információt szolgáltat a génexpresszió és neuronális differenciáció kapcsolatának megértéséhez.

Irodalmi hivatkozások

1. Szeberényi J., Erhardt P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1222: 187-202.
2. Barbacid, M. (1993) *Oncogene*, 8: 2033-2042.
3. Roberts, T.M. (1992) *Nature*, 360: 534-535.
4. Blenis, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:
5889-5892.
5. Karin, M. and Smeal, T. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, 17:
418-422.
6. Feig, L.A. and Cooper, G.M. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3235-3243.
7. Cai, H., Szeberényi, J. and Cooper, G.M. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5314-5323.
8. Szeberényi, J., Cai, H. and Cooper, G.M. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5324-5332.
9. Szeberényi, J., Erhardt, P., Cai, H. and Cooper, G.M.
(1992) *Oncogene*, 7: 215-2113.
10. Troppmair, J., Bruder, J.T., App, H., Cai, H., Szeberényi,
J., Cooper, G.M. and Rapp, U.R. (1992) *Oncogene*, 7: 1867-
1873.
11. McMahon, S.B. and Monroe, J.G. (1992) *FASEB J.* 6: 2707-2715.
12. Ginty, D.D., Bonni, A., and Greenberg, M.E. (1994) *Cell*,
77: 713-725.
13. Marshall, C.J. (1995) *Cell*, 80: 179-185.
14. Hill, C.S. and Treisman, R. (1995) *Cell*, 80: 199-211.
15. Jaiswal, R.K., Moodie, S.A., Wolfman, A. and Landreth, G.E.
(1994) *MCB* 14: 6944-6953.
16. Rosen, L.B., Ginty, D.D., Weber, M.J. and Greenberg, M.E.
(1994) *Neuron*, 12: 1207-1221.
17. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C.J.
(1994) *Cell*, 77: 841-852.
18. Deng, T and Karin, M. (1994) *Nature*, 371: 171-175.
19. Liang, P. and Pardoll, A.B. (1992) *Science*, 257: 967-971.

A PROGESTERON-FÜGGŐ IMMUNMODULÁCIÓ SZEREPE A TERHESSÉG ALATT

Szekeres-Barthó Júlia POTE Mikrobiológiai Intézet

Immunológiai párbeszéd az anya és magzata között

A magzat, amelyet genetikailag különböző egyedek hoznak létre, fele részben apai, az anya számára idegen antigéneket hordoz. Várható lenne, hogy az anyai immunrendszer reagál az idegen antigének jelenlétére és a "graftot" kilöki. A terhességek többségében a "kilökődés" nem következik be, ezért feltételezhető olyan mechanizmusok működése, amelyek vagy a felismerést, vagy pedig a felismerés nyomán létrejött immunológiai reakciót gátolják.

Jelenlegi ismereteink szerint a magzat jelenlétének immunológiai felismerése nem egyszerűen nem káros, de feltétlenül szükséges is ahhoz, hogy beinduljanak azok a mechanizmusok, amelyek továbbiakban megvédik a magzatot az anyai immunrendszer támadásától. *A felismerés szükséges voltát a következő adatok támasztják alá:*

- a) Habitualisan vetélő asszonyok és férjeik között lényegesen gyakoribb a két vagy több hisztokompatibilitási (HLA) antigenben való megegyezés, mint más házaspároknál¹, és az anyák apai vagy idegen leukocytákkal történő immunizálása javítja az élveszületési arányt².
- b) Spontán magas abortusarányt mutató egértörzsben a vetélés kivédhető apai lépsejtekkel történő előzetes immunizálással³, ill. az anyák immunrendszerének nem specifikus stimulálásával⁴.
- c) Az antigenfelismerés és a következményes lymphokin termelés mértéke egerekben korrelál a megszületett magzat nagyságával⁵.

A magzat és az anya immunológiai kapcsolata kétoldalú folyamat. Az interakciót magzati részről a magzatra jellemző antigének prezentálása befolyásolja, anyai részről pedig azok felismerése és az immunológiai reakció mértéke. A trophoblast magzati eredetű szövet, és a terhesség alatt folyamatos, állandó kapcsolatban áll az anyai vérrel, tehát elsőrendűen ez az a felület, ahol a magzati antigének felismerése, ill. az anyai immunválasz effector fázisa lejátszódhat. A trophoblast klasszikus polymorph hisztokompatibilitási (HLA) antigéneket nem fejez ki⁶, de jelen vannak rajta egyebek között trophoblast specifikus antigének és I osztályú monomorph HLA antigének (HLA-G)⁷. A HLA-G rendelkezik az I. osztályú HLA antigen keretének (A,B,C) jellemzőivel, hiányzik azonban róla az egyénre jellemző specificitásokat biztosító polymorphizmus. A trophoblaston kifejezett HLA-G mennyisége a gesztáció során folyamatosan változik⁸. Feltételezhető, hogy a HLA-G a foeto-maternalis immunológiai kapcsolat kulcsfigurája. A foeto-maternalis határterületet alkotó trophoblast nem érzékeny a transzplantációs immunitásra. Bár lymphokin aktivált killer sejtek képesek elpusztítani a trophoblastot, ez a sejtféléség rezisztens a cytotoxicus T lymphocyták és a természetes ölüsejtek (NK) medialis lysisse szemben⁹⁻¹¹. A cytotoxicus T lymphocyták számára a célsejt felismeréshez szükséges az I osztályú polymorph HLA antigének jelenléte, az újabb adatok szerint pedig az NK sejtek célsejtfelismerése

éppen ezen antigének hiányának felismerésén alapul¹². Elképzelhető, hogy a trophoblast a monomorph HLA-G-t "álarcként" használja. A cytotoxicus T lymphocyták azért nem ismerik fel targetként a trophoblast sejteket, mert a rajtuk levő HLA antigen nem hordoz polymorph determinánsokat, az NK pedig azért, mert jelen van rajtuk az első osztályú HLA-ra jellemző keret antigen (A-B-C). Ilyen módon a HLA-G jelenléte megvédheti a trophoblastot a károsító effektor mechanizmusoktól.

Az anyai immunrendszer felismeri az idegen antigéneket (bizonyított tény az anti-paternalis és anti-placentalis anyai immunválasz megléte) és változatos védekezési mechanizmusokkal válaszol.

A védekezés egyik lehetséges módja a *blokkoló jellegű antitestek* termelése, amelyek a megfelelő antigéneket lefedve gátolják az effektor mechanizmusokat. Padányi és mtsai.¹³ terhes asszonyok serumában trophoblast specificitású blokkoló aktivitású ellenanyagokat mutattak ki, amelyek habitualisan vetélő nők serumából hiányoznak. Margni és mtsai.¹⁴ adatai szerint a egészséges terhes nők placéntájáról nagy mennyiségben oldhatók le olyan aszimmetrikus IgG ellenanyagok amelyek az egyik Fab részen levő extra cukormolekula sterikus gátló hatása miatt nem képesek effektor funkciókat ellátni.

A másik igazolt mechanizmus a *suppressor funkciójú sejtek* megjelenése a deciduában. Magas spontan abortus arányt mutató egerekben a decidualis suppressor activitas kisebb, mint normal egértörzsekben. A suppressor hatásért két különböző fenotípusú sejt felelős. A pre- és periimplantatios fázisban CD8+T sejtek mutatják ezt a sajátsgot, míg a postimplantatios fázisban non T non B sejtek, melyek egy TGF β 2-vel rokon molekulát termelnek¹⁵. A T sejtek részvételére utal, hogy az IL-10 eliminálása a terhesség alatt káros a foetalis fejlődés szempontjából¹⁶. Azok az egerek, akiket IL-10 gen törlésével IL-10 deficienssé tettek, súlyos károsodásokkal születtek, nagyságuk pedig az ugyanazon anyától született többi egérnek csak kétharmada volt¹⁷. Abortáló egértörzskombinációkban T sejt citokinek, pl. IL-3 és GM-CSF gátolják az abortus létrejöttét, ezzel szemben a T sejtek eliminálása fokozza az abortusarányt.

Progesteron függő immunológiai szabályozás

A terhesség alatt a sejt közvetítette immunválaszadási készség csökken. Terhesek seruma nagy mennyiségben tartalmaz a terhesség alatt fokozott mennyiségben, ill. kizárólag a terhesség során termelődő hormonokat. A P jelenléte az emlős fajok jelentős részében elengedhetelen a terhesség fennmaradásához. Emberben a corpus luteum elégtelensége a terhesség megszakadását eredményezi. A P immunológiai hatásai régóta ismertek. A hormon magas koncentrációival történő lokális kezelés meghosszabbítja a xenotranszplantatok túlélését¹⁸. In vitro körülmények között pedig pharmacologiai koncentrációkban gátolja nem terhes donorok T sejtjeinek activálódását és befolyásolja a cytotoxicus T lymphocyták valamint suppressor sejtek indukcióját¹⁹.

Lymphocyta Progesteron receptorok (PR)

A lymphocyta PRok felfedezéséhez az a megfigyelés vezetett, hogy terhes nők lymphocytáinak P érzékenysége mintegy százszorosa a nem terhes donorok lymphocytáiban mért értéknek²⁰. Mivel a lymphocyták P sensitivitásának feltétele a megfelelő sűrűségű, funkcionális PRok megléte, feltételezhető volt, hogy a lymphocyták terhesség alatti fokozott P érzékenységének hátterében a lymphocytákon megjelenő P kötő helyek állnak. PR-specificus monoclonalis ellenanyag segítségével terhes nők lymphocytáin PRokat (PR) mutattunk ki. Nem terhes donorok lymphocytáin ilyen kötőhelyek nem voltak detektálhatók^{21,22}. A PR-t hordozó lymphocyták többsége CD8+ fenotípusú és γ/δ T sejt receptorral rendelkezik.

A PR pozitív lymphocyták aránya a perifériás vérben a terhesség előrehaladásával fokozódik, és a terhesség spontan megszakadásával járó pathológiás állapotokban csökken. Szülés, koraszülés ill. spontan vetélés alatt a PR pozitív lymphocyták aránya igen alacsony²².

A lymphocyta PR-ok expressziójának szabályozása

Mivel a lymphocyta PR-k jelenléte látszólag összefügg a gesztáció fennmaradásával, míg a terhesség megszakadását ezen kötőhelyek hiánya jellemzi, felmerül a kérdés, hogy *milyen stimulus indítja meg a terhesség kezdetén a lymphocyta PR-ok kialakulását, és mi az az ok, amely a terhesség spontán megszakadásával kapcsolatban ezen receptorok eltűnéséhez vezet.*

A klasszikus endocrin szövetekben tapasztalható hormon dependens PR regulációval ellentétben a lymphocyta PR-k megjelenése a lymphocyta aktiváltsági állapotával függ össze. Normál nyugvó lymphocytákon sem a PR mRNS sem a receptorfehérje nem mutatható ki. Mindkettő detektálhatóvá válik azonban a lymphocyták mitogen vagy alloantigen stimulációja után^{21,23}.

Az in vitro adatok in vivo relevanciáját bizonyítja az a tény, hogy transzplantáción átesett és transfundált betegek perifériás vérében a terhesekéhez hasonlóan magas a PR-t tartalmazó sejtek aránya²⁴. Ez egyben arra is utal, hogy a terhességgel kapcsolatban a magzat által kifejezett idegen antigének felismerése lehet felelős a lymphocyta PR-ok kialakulásáért.

Ezek után kézenfekvő feltenni a kérdést, hogy melyek azok a receptorok a T sejteken, melyeknek ingerlése kiváltja a P-receptorok megjelenését, és melyek azok az antigének, amelyek PRokat indukálnak. Előzetes kísérletek szerint a CD3 molekula kötése vagy lymphokin aktiváció elegendő a receptorok indukációjához. Transfectalt sejtekkel végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a lymphocyták I.vagy II. osztályú rtranszplantációs antigénekkel való stimulációja kiváltja a PR-ok megjelenését. A monomorph HLA antigének (HLA-G) nem indukálnak PR-t, mi több, gátolják a mitogen indukálta PR expressziót, ami arra enged következtetni, hogy a HLA-G ebben a rendszerben szabályozó hatást fejt ki²⁵.

A következő megválaszolandó kérdés az, hogy hol találkoznak ezek a PGR-t indukáló antigének az anyai immunrendszerrel. A hemochoriális típusú placéntákban a monomorph MHC antigen expressziót mutató trophoblast sejtek közvetlen kapcsolatban állnak az anyai vérrel. Az egyes emlős fajokban a terhesség időtartama többé-kevésbé arányos az állat, következésképpen a placenta méretével. Kézenfekvőnek tűnik az a feltételezés, hogy a terhesség befejeződését a placenta öregedésével kapcsolatos események (pl. a placenta antigenitásának változása) indítják meg. Elképzelhető, hogy a monomorph HLA antigének kifejeződésének a gesztáció előrehaladásával kapcsolatos változása szerepet játszik a terhesség megszakadásakor a lymphocyta PRok eltűnésében.

A trophoblast sejtek PR indukáló képessége gesztációs kor előrehaladtával csökken, mi több, a szüléskor nyert placéntából származó trophoblast sejtek a mitogen indukálta PR expressziót is gátolják, ami arra utal, hogy a korosodó trophoblast sejtek olyan felszíni struktúrákat fejtenek ki, amelyek befolyásolhatják a lymphocyta PR indukációt²⁵.

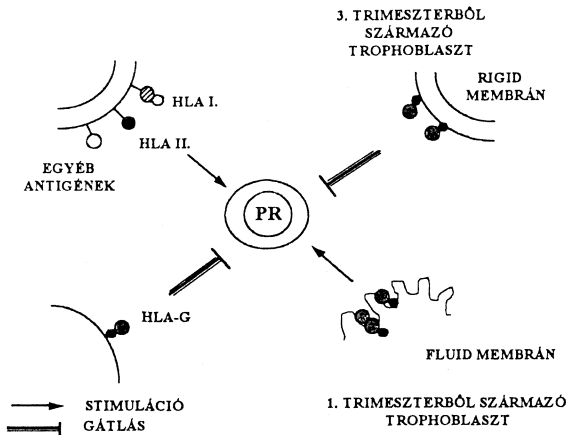
Bizonyos sejtek membran-fluiditása és antigenitása ill. immunogenitása között kapcsolat áll fenn. A membran fluiditásának csökkenése az immunogenitás fokozódását vonja maga után²⁶. Cholesterol-hemisuccinat (CHS) beépítésével rigiddé tett membránú, első trimeszterből származó trophoblast sejtek elvesztik PR indukáló hatásukat, ami megengedi azt a feltételezést, hogy olyan felszíni struktúrák jelennek meg rajtuk, melyek a receptorexpresszió ellen hatnak²⁵. A gesztáció korai időszakában a fiatal, fluid membránú trophoblast sejteken a monomorph MHC termékek nem mutathatók ki, és ezek a sejtek képesek a lymphocytákban PR-t indukálni, míg terminusban a rigid membránú monomorph MHC antigéneket kifejező trophoblast sejtek gátolják a lymphocyta PR expressziót. Megjegyzendő még, hogy a művi megszakításból származó sejtek syncytiotrophoblast microvillus membránjai significansan fluidabbak, mint akár a spontan abortusból, akár a szülésből származó sejtek membránjai²⁷.

Mindezek alapján elképzelhető a következő mechanizmus működése (1. ábra). A placenta érése és differenciálódása ("öregedése") során a trophoblast sejtek membránfluiditása megváltozik, ami megváltozott antigenprezentációt ill. a felszíni struktúrák megváltozott kifejeződését eredményezi. Egyebek között a HLA-G fokozott expressziója is elképzelhető, amely a PR indukció gátlását eredményezné.

Szentágotai János : TUDOMÁNPOLITIKAI STRATÉGIÁNK ÚJ VONÁSAI Magyar Tudomány 1981 (6).

A stratégia újragondolásának elidegeníthetetlen része a tudományos teljesítmény objektív mérése : egyének, kutatóhelyek, tudományos együttműködések és folyóiratok vonatkozásában egyaránt. A teljesítmény és hatékonyság - orientáltság minden más elé helyezendő.

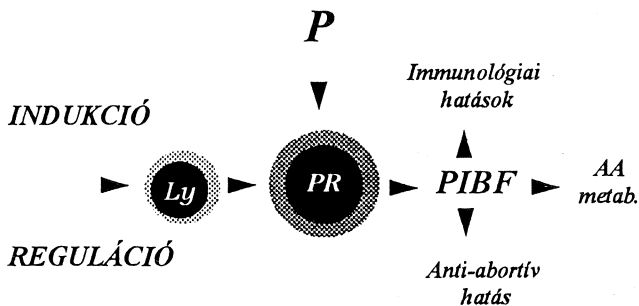
A tudományos munka célja és értelme nem a közlés - ezt végre egyszer már észre kell vennünk - hanem az illető területet előbbre vivő kutatási eredmény.



1. ábra A trophoblast membránfluiditásának hatása a PR indukcióra

A lymphocyta PR expresszió funkcionális következményei

A többi steroid hormonokhoz hasonlóan a P hatásai is mediátorfehérjéken keresztül valósulnak meg. A receptor a hormont kötés után a magba transzlokálódik, genexpressziót indukál és de novo fehérjeszintézist indít el²⁸. A P immunológiai hatásait egy 34 kD fehérje, a P Indukált Blokkoló Faktor (PIBF) közvetíti²⁹ (2. ábra).



2. ábra A progesteron-függő immunmoduláció vázlata

A PIBF gátolja az arachidonsav felszabadulást²⁹, immunmodulátor tulajdonságokkal rendelkezik³⁰ és egerekben anti-abortív hatású³¹⁻³³. A PR-ok blokkolása gátolja, a glucocorticoid receptorok blokkolása azonban nem befolyásolja a fehérje termelését.

A fehérje immunológiai hatásai közé tartozik az NK aktivitás gátlása, suppressor funkciójú sejtek indukciója valamint a citokintermelés egyensúlyának megváltoztatása.

Az NK aktivitás kulcsszerepet játszik a terhesség megszakadásában. Gendron and Baines³⁴ károsodott egér magzatokban és placentáikban NK sejt infiltrációt mutattak ki. Egérben vetélés idézhető elő magas NK

aktivitású lépsejtek transzferjével³⁵, és a magzati károsodás mértéke befolyásolható az NK aktivitás modulálásával.

Normális lefolyású human terhességben az NK aktivitás lényegesen alacsonyabb, mint nem terhes egyéneknél. Ismeretlen hátterű spontan vetélések gyakran fokozott NK aktivitással járnak együtt, és szülést megelőzően az NK aktivitás emelkedése mutatható ki³⁶.

A PIBF in vitro körülmények között gátolja az NK aktivitást³⁰, így hozzájárulhat annak terhesség alatti alacsony szinten tartásához, tehát a lymphocyták PIBF termelő képessége a terhesség kimenetelére szempontjából fontos szerepet játszhat.

PIBF-specifikus ellenanyag segítségével kimutatható a PIBF jelenléte a lymphocytákban. Kétszáz terhes asszony lymphocytáinak PIBF expresszióját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a habitualisan vetelő nők, ill. spontan terhességmegszakadás klinikai tüneteit mutató asszonyok perifériás vérében szignifikánsan alacsonyabb a PIBF pozitív sejtek aránya, mint az egészséges terhesek perifériás vérében. Signifikáns negatív korrelációt sikerült kimutatni a PIBF expresszió és az NK aktivitás mértéke között³⁷. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a PIBF in vitro körülmények között megfigyelt NK aktivitást befolyásoló hatása in vivo is működik és biológiai jelentőséggel bír.

A PIBF hatása a citokintermelés mintázatára

Ismert, hogy a terhesség alatt az intracelluláris pathogénekkal szembeni érzékenység fokozott, és az immunválasz a humorális irányba tolódik el.

Az anyai immunrendszer és a magzat közt kétoldali kapcsolat áll fenn.

1) Az anyai immunrendszer elősegítheti vagy gátolhatja a magzat növekedését.

2) A magzati antigének az anyai immunválaszt humoralis irányban tolják el.

A fenti állításokat a következő megfigyelések támasztják alá.

ad 1. Spontan abortáló egyéneknél allogeen lymphocytákkal ill. MHC molekulákkal való immunizálás javíthatja a foeto-placentalis egység túlélési esélyeit ill. növekedését³.

A szakasosnál nagyobb a placentával rendelkező MRL lpr/lpr homozygota egértörzsben fokozott T sejt proliferáció és phagocytosis figyelhető meg. A T sejt aktivitás anti-T sejt monoclonalis ellenanyaggal történő közbősítése normalizálja a placentalis paramétereket³⁸.

Normál egértörzsben a T sejt aktivitás gátlása fokozott mértékű magzati károsodást eredményez. A T sejtekkel nem rendelkező nude egerek placentája a normálisnál kisebb és a T sejt aktivitás neutralizálása nem befolyásolja a placenta méretét³⁸.

Valószínű, hogy a T sejtek ezen hatásukat citokineken keresztül fejtik ki, tehát, hogy a normális placentalis növekedés a lokális citokin termelés ellenőrzése alatt áll. A T sejtek az általuk termelt citokinek alapján két

csoporthoz oszthatók. A Th1 sejtek termelt cytokinok (IL-2, TNF, IFN γ) a celluláris immunválaszt fokozzák, míg a Th2 sejtek által termelt cytokinok (IL-4, IL-5, IL-10) a humorális választ segítik.

Egyes cytokinok (GM-CSF, IL3 és CSF1) fokozzák a trophoblast növekedését és differenciálódását, növelik a placenta méretét³⁸. IL-2, TNF és IFN γ ellenkező hatást fejtenek ki. Mivel utóbbiakra szükség van az infekciókkal szembeni rezisztencia szempontjából, valószínű, hogy normális körülmények között a kétféle típusú cytokin termelése egyensúlyban van, de speciális esetekben (pl. terhesség) az arány eltolódhat.

ad 2. A terhesség alatt a celluláris immunitás csökkent mértékű, míg a humoralis immunválasz fokozódik. Az inkább celluláris típusú autoimmunitás kategóriájába sorolható rheumatoid arthritisben szenvedő nők mintegy 70%-ának állapota javul a terhesség alatt, míg a humorális pathogenezisű Systemás Lupus Erythematoses-ben szenvedő nők állapota romlik a terhesség alatt. A terhesség során intracelluláris pathogének által okozott fertőzések pl. coccidiomycosis, malaria, toxoplasma és TBC is fellángolhatnak, az NK aktivitás csökkenése következtében. Ezek a jelenségek arra utalnak, hogy a terhesség alatt TH2 túlsúly alakul ki.

A TH1 sejtek által termelt cytokinok az IL2, TNF, IFN γ a terhesség kimenetelére szempontjából kedvezőtlen hatásúak. Az IFN γ cytotoxicus T lymphocytákat és aktivált NK sejteket indukál, egyidejűleg gátolva a B sejt fejlődést. A TH1 válasz tehát a trophoblastot károsító, fokozott NK sejt aktiválódáshoz vezethet. A foetoplacentalis egység ez ellen TH2 típusú cytokinok termelésével védekezik. Egér placenták tenyészteteli a terhesség mindhárom trimesztérében IL4, IL5 és IL10-t termelnek, ezzel szemben IFN γ alig mutatható ki. A normal placentalis sejtekkel stimulált lymphocyták TH2 típusú cytokinokat termelnek. Vetélésből származó placenták ugyanilyen körülmények között TH1 típusú választ indukálnak³⁸.

PIBF jelenlétében mitogen aktivált lymphocyták cytokintermelése megváltozik. Az IL10 termelés tízszeresére emelkedik, és hasonló válasz mutatható ki a többi Th2 cytokin esetében is. Az IL12 nevű nemrég felfedezett Th1 típusú cytokin hatása az NK aktivitás fokozása. Mitogennel aktivált lymphocyták IL12 termelése fokozódik, és ezt a hatást PIBF jelenléte kivédi³⁸.

Adataink arra utalnak, hogy a PIBF a cytokintermelés mintázatának megváltoztatása révén befolyásolja a celluláris immunválasz, különösképpen a terhesség megszakadásában szerepet játszó NK aktivitás mértékét.

A PIBF hatása a B sejtek funkciójára

Az előbbiekből látható, hogy a PIBF cytokinok közvetítésével csökkenti a celluláris- és fokozza a humorális immunitást. Kérdés, hogy van-e a PIBF-nek direkt hatása a B sejtek által termelt antitestek minőségére. Ismert, hogy a B sejtek által termelt ellenanyagok egy része az egyik Fab régióiban jelenlevő oligoszacharid csoport jelenlétének köszönhetően aszimmetrikus szerkezetű¹⁴. Az ilyen antitestek nem képesek az antigént precipitálni, valamint egyéb effektor funkciókat ellátni (komplement-kötés, cytotoxicitás). Mivel az antigént ugyanolyan affinitással kötik mint az azonos specificitású szimmetrikus immunoglobulin molekulák, az immunreakciókban inkább blokkoló antitestekként hatnak, mint effektor molekulaként. Az aszimmetrikus

antitestek csak az IgG osztályban fordulnak elő, annak normális körülmények között mintegy 10-15 %-át teszik ki.

Ezeknek a blokkoló antitesteknek szerepe lehet a terhesség során a magzat immunológiai védelmében. Normális terhességre jellemző az aszimmetrikus antitestek megnövekedett aránya¹⁴. Anti-TNF monoclonalis ellenanyagot termelő hybridoma sejtek segítségével vizsgáltuk a PIBF hatását az immunglobulin termelés minőségére. A PIBF jelenlétében tenyésztett sejtek által termelt immunglobulin populáción belül az aszimmetrikus molekulák aránya többszörösére növekedett⁴⁰. Ez az aszimmetrikus IgG populáció a konvencionális anti TNF ellenanyagokkal ellentétben nem volt képes a TNF cytotoxicus hatásának neutralizálására. Ezek az eredmények megengedik a következtetést, hogy a PIBF hatására a B sejtek által termelt ellenanyagok minősége megváltozik. Fokozódik a blokkó hatású antitestek, egyidejűleg csökken az effektor hatással rendelkező molekulák szintézise. Ez a jelenség a magzat által kifejezett antigének elfedése révén szerepet játszhat a magzat immunológiai védelmében. Alátámasztja feltételezésünket az a tény, hogy egészséges terhes nők szérumában az aszimmetrikus ellenanyagok aránya szignifikánsan magasabb, mint a nem terheseikében. Magas NK aktivitással járó habitualisan vetélő nők serumában az aszimmetrikus ellenanyagok arányának növekedése elmarad. További indirekt bizonyítéknak tekinthető az a tény, hogy egerekben a terhesség alatti PIBF termelés gátlása, ill. a PIBF hatásának neutralizálása az aszimmetrikus ellenanyagok arányának jelentős csökkenésével jár.

A PIBF biológiai szerepe

Az eddig felsorolt adatok közvetett módon utalnak a PIBF-nek a normális terhesség fenntartásában játszott szerepére. Az összefüggés direkt bizonyítékát állatkísérletek szolgáltatják.

1) Egérkísérletek eredményei alátámasztják azt a feltételezést, hogy a terhesség alatt a krónikus alloantigén stimuláció felelős a lymphocyta PR-k kialakulásáért és a P mediálta immunmoduláció megindulásáért.

Terhes egerek PR blokkolóval (RU486) való kezelése dózisfüggő módon vetélést idéz elő. Apai sejtekkel előzetesen alloimmunizált állatokban ugyanazon RU486 dózisok abortív hatása lényegesen kisebb. A jelenség azzal magyarázható, hogy alloimmunizálás következtében megnövekszik a lymphocyta PR-ok száma, tehát az antiprogeszteron eredeti dózisa már nem elegendő a megnövekedett számú receptor lekötéséhez, ami az abortív hatás csökkenésében nyilvánul meg²⁵.

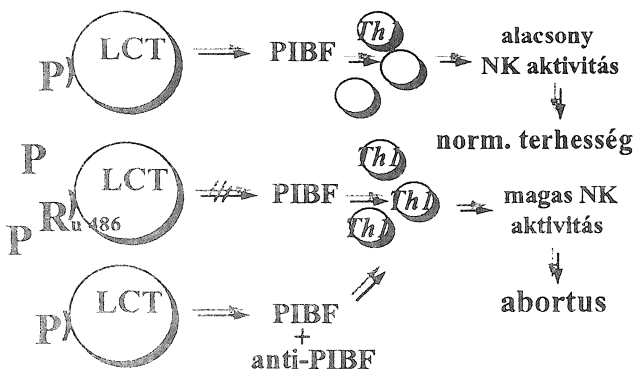
Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a progesteron-dependens immunomodulator mechanizmus működésbe lépése az anyai immunrendszer megfelelő stimulációjának függvénye.

2) PR blokkolóval (RU 486) kezelt egerekben a terhesség megszakad. Ezen egerek lépesejtjei között a PIBF termelő sejtek aránya jelentősen csökken, amit az NK aktivitás emelkedése követ. A PR blokkolóval egyidejűleg adott PIBF kezelés a PR blokk abortív hatását kivédi³², tehát **a blokkoló faktor termelődésének és egyben a gestáció sikerének a PRok működőképessége a feltétele.** A fentiekből arra lehet

következtetni, hogy a funkcionáló PR-t nem tartalmazó sejtek még megfelelő P kínálat mellett sem képesek a mediátorfehérje termelésére. A blokkoló anyag hiányában a localis NK aktivitás felszabadul a gátlás alól, és ez eddig még nem egészen tisztázott mechanizmus útján megindítja a terhesség megszakadásához vezető folyamatokat.

3) *A PIBF anti-abortív hatása az NK aktivitás gátlásán keresztül valósul meg.* A fokozott NK aktivitás bizonyítottan szerepet játszik a terhesség megszakadásában egerekben. Terhes Balb/c egerekben magas NK aktivitású lépesejtek transzferjével abortus idézhető elő³², és a PIBF ezt a hatást kivédi³³. Ez arra enged következtetni, hogy a blokkoló factor NK aktivitásra in vitro kifejített hatása in vivo is érvényesül és biológiai jelentőséggel bír.

Egérben PIBF kezeléssel megakadályozható a terhesség idő előtti megszakadása. A fehérje in vivo hatását bizonyítja, hogy *a fiziológiásan termelődött PIBF biológiai hatásának specifikus ellenanyaggal való semlegesítése a terhesség megszakadását idézi elő*⁴¹. Az anti-PIBF-el kezelt egerek lépesejtjeinek IL10 termelése csökken, IFN γ termelése és NK aktivitása fokozódik⁴¹ (3. ábra).



3. ábra A PIBF szintézis gátlása vagy a PIBF hatás semlegesítése Th1 típusú cytokin túlsúlyt indukál és a terhesség megszakadását idézi elő

Az eredmények arra utalnak, hogy a PR-ok blokkolása a PIBF termelés gátlásán keresztül vezet a terhesség megszakadásához. Az intact, működőképes PRral rendelkező lymphocytákban a P jelenléte blokkoló fehérje termelését eredményezi. Ez a fehérje gátolja az NK aktivitást. Ismert, hogy az NK aktivitás fokozásával egerekben vetélés váltható ki, így feltehetőleg a PIBF az NK aktivitás alacsony szinten tartásával járul hozzá a terhesség normális lefolyásához. Ha a PR-okat blokkoljuk, PIBF nem termelődik. A PIBF immunológiai hatásának hiányában öngerjesztő folyamat alakul ki, melynek eredménye az NK aktivitás fokozódása, a terhesség következményes megszakadásával.

IRODALOM

- 1) Komlos, L., Zamir, R., Joshua, H., Halbrecht, I. Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 7, 330, 1977.
- 2) Mowbray, J.F., Liddell, H., Underwood, J.L., Gibbins, C., Reginald, P.W., Beard, R.W. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*, i, 941, 1985.
- 3) Chaouat, G., Kolo, J.P., Higer, N., Stanislawsky, M., Wegmann, T.G. Immunologic consequences of vaccination against spontaneous abortion in mice. *J. Immunol.* 134, 1594, 1985
- 4) Toder, V., Strassburger, D., Irlin, I., Carp, H. Pecht, M., Trainin, N. Nonspecific immunopotentiators and pregnancy loss.: Complete Freund Adjuvant reverses high fetal resorption rate in CBA/JxDBA/2 mouse combination. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 24, 63, 1990.
- 5) Wegmann, T.G. Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol. Letters* 17, 297, 1988.
- 6) Sunderland, C.A., Redman, C.W.G., Stirrat, G.M. HLA A,B,C antigens are expressed on nonvillous trophoblast of the early human placenta. *J. Immunol.* 127, 2614, 1981.
- 7) Ellis, S.A., Sargent, I.L., Redman, C.W.G., McMichael, A.J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59, 595, 1986.
- 8) Kovacs, S. Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fischer, S.J., DeMars, R. A Class I antigen expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220, 1990.
- 9) Drake, B.L., Head, J.R. Murine trophoblast cells can be killed by allospecific cytotoxic T lymphocytes generated in Gibco OPTI MEM medium. *J. Reprod. Immunol.* 15, 71, 1989.
- 10) Zuckermann, F.A., Head, J.R. Murine trophoblast resists cell-mediated lysis I. Resistance to allospecific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 139, 2856, 1987.
- 11) Zuckermann, F.A., Head, J.R. Murine trophoblast resists cell-mediated lysis- II Resistance to natural cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 116, 274, 1988.
- 12) Versteeg, R. NK cells and T cells: mirror images? *Immunol. Today* 13, 244, 1992.
- 13) Padanyi, A., Horuzsko, A., Gyodi, E., Sarmay, G., Reti, M., Kassai, M., Fulop, V., Petranfy, G.Gy. Human TLX specific alloantibody with FCgammaRII and MLC blocking function induced by transfusion probably associates immunosuppressive function in vivo. *Tiss. Antigens* (in press)
- 14) Margni, R.A., Binaghi, R.A. Nonprecipitating asymmetric antibodies. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 535, 1988.
- 15) Clark, DA, Lea, RG, Podor, T., Daya, S., Banwatt, D., Harley, C. *Ann. NY Acad. Sci.* 626, 524, 1991.
- 16) Wegmann, T.G., Guilbert, L.J., Mosmann, T.R., Lin, H. The role of placental IL-10 in maternal-fetal interactions. *Progress in Immunology* 8, 857, 1992.
- 17) Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W. IL-4 and IL-10 deficient mice. In: Abstracts, 8th International Congress of Immunology, Budapest, Hungary, August 23-28, p. 203.

- 18) Moriyama, I., Sugawa, T. Progesterone facilitates implantation of xenogeneic cultured cells in hamster uterus. *Nature New Biol.* 1972;236:150-153.
- 19) Stites, D.P., Bugbee, S., Siiteri, P.K. Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interaction during lymphocyte activation.- relevance to immunosuppression during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 5, 215, 1983.
- 20) Szekeres-Bartho, J., Hadnagy, J., Pacsa, A.S. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity.: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.* 7, 121, 1985.
- 21) Szekeres-Bartho, J., Szekeres, Gy., Debre, P., Autran, B., Chaouat, G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 125, 273, 1990.
- 22) Szekeres-Bartho, J., Reznikoff-Etievant, M.F., Varga, P., Varga, Z., Chaouat, G. Lymphocytic progesterone receptors in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 16, 239, 1989.
- 23) Paldi, A., d'Auriol, L., Misrahi, M., Bakos, A., M., Chaouat, G., Szekeres-Bartho, J. Expression of the gene coding for the progesterone receptor in activated human lymphocytes *Endocrine Journal* 1994;2: 317-319.
- 24) Szekeres-Bartho, J., Weill, B.J., Mike, G., Houssin, D., Chaouat, G. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients *Immunol. Letters* 22, 259, 1989.
- 25) Szekeres-Bartho, J. Immunosuppression by progesterone in pregnancy. Monograph. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1992.
- 26) Shinitzky, M., Skornick, Y., Haran-Ghera, N. Effective tumor immunization induced by cells of elevated membrane lipid microviscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5313, 1979.
- 27) Szekeres-Bartho, J., Nemeth, A., Varga, P., Csernus, V., Koszegi, T., Paal, M. Membrane fluidity of villous trophoblast and susceptibility to lysis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 19, 92, 1989.
- 28) Yamamoto, K. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 1985;19: 209-252.
- 29) Szekeres-Bartho, J., Kilar, F., Falkay, G., Csernus, V., Torok, A., Pacsa, A.S. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Amer. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 9, 15, 1985.
- 30) Szekeres-Bartho, J., Autran, B., Debre, P., Andreu, G., Denver, L., Chaouat, G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 122, 281, 1989.
- 31) Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Kapovic, M., Chaouat, G. Complete Freund adjuvant treatment of pregnant females influences resorption rates in CBA/JxDBA/2 matings via progesterone-mediated immunomodulation. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 26, 82, 1991.
- 32) Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Chaouat, G. A progesterone-induced immunologic blocking factor corrects high resorption rate in mice treated with antiprogesterone. *Am.J.Ob.Gyn.* 163, 1320, 1990.

Állás

A Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete (1450 Budapest, Pf.: 67) molekuláris neurobiológusok részére állásokat hirdet, egyet laboratórium-vezetői, kettőt pedig tudományos főmunkatársi illetve munkatársi beosztásban. A pályázókkal szembeni elvárás, hogy a modern molekuláris biológiai technikában nagy gyakorlattal rendelkezzenek, és tudományos érdeklődésük középpontjában a neuronális plaszticitás és egyedfejlődés, valamint kémiai neuroanatómiai kérdések álljanak. Az Intézetben belül szervezzék meg és irányítsák független tudományos programjukat, sikerrel vegyenek részt hazai és külföldi kutatási pályázatokban. Megfelelő kezdeti támogatás, laboratóriumi terület, és egy asszisztensi státusz áll a csoport rendelkezésére. Kérjük, hogy a pályázatokat dr. Vizi E. Szilveszter akadémikusnak, az Intézet igazgatójának küldjék, amely tartalmazzon önéletrajzot, publikációs listát és 3 éves kutatási programot.

Molecular Neurobiologist positions are available at the **Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences** (Budapest, P.O.Box 67, H-1450 Hungary), a chief of laboratory position, and two others at the level of assistant/associate professor. An established research experience in state-of-the-art molecular biological techniques with specific research interest in neuronal plasticity, development and chemical neuroanatomy is required. The three candidates are expected to form their own team within the Institute, direct their independent lines of research, and to be successful in grant applications. A competitive start-up package including a technician position, adequate laboratory space and research facilities are available. Please, send a CV with a list of publications, and a short description of proposed research for a period of 3 years to Prof. E. Szilveszter Vizi at the above address.

-
- 33) Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Chaouat, G. The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 24, 105, 1990.
- 34) Gendron, R., Baines, M. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell. Immunol.* 113, 281, 1988.
- 35) Kinsky, R., Delage, G., Rosin, N., Thang, M.N., Hoffmann, M., Chaouat, G. A murine model for NK-mediated resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23, 73, 1990.
- 36) Szekeres-Bartho, J., Varga, P., Pacsa, A.S. Immunologic factors contributing to the initiation of labour - lymphocyte reactivity in term labour and threatened preterm delivery. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 155, 108, 1986.
- 37) Szekeres-Bartho, J., Faust, Zs., Varga, P. Expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Amer. J. Reprod. Immunol.* (in press)
- 38) Wegmann, T.G., Hui, Lin, Guilbert, L., Mosmann, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 14, 353, 1993.
- 39) Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance (submitted)
- 40) Kelemen, K. Bogнар, I., Szekeres-Bartho, J. B cells under progesterone effect produce blocking antibodies. *Cell. Immunol.* (submitted)
- 41) Szekeres-Bartho, J., Par, G. Dombai, Gy. Volgyi, Z. Neutralizing progesterone-dependent immunomodulation in mice induces abortion via a Th1 shift (submitted)

Fehérje szintézis humán thrombocitákban

Ludány Andrea, Nagy Eszter, Kellermayer Miklós

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Klinikai Kémiai Intézet

A thrombociták a megakariocitákból kiszabadulva mag nélküli citoplazma fragmentekként kerülnek a vérkeringésbe, majd ezt követően megközelítőleg 10 napig tartózkodnak a periférián. Kérdés ma is, hogy a vérben ezalatt a 10 nap alatt valóban képesek-e fehérjéik újraképzésére? A válasz akkor helyes, ha azt állítjuk: a fehérje szintézist in vitro tanulmányok indirekt módon alátámasztani látszanak.

A bizonytalanság szükségszerűen abból fakad, hogy a szervezetben a vérrel keringő thrombociták in vivo viszonyaira vonatkozóan nem rendelkezünk direkt mérési adatokkal. Látszólag ugyanis könnyű lenne kísérleti állatokat jelzett aminosavakkal kezelni és a fehérje szintézist a thrombocitákban detektálni. Ily módon azonban a fehérjék jelölődése már a megakariocitákon belül is létrejönne, mielőtt még a thrombociták a keringésbe kikerülnének s ezért a kérdést így nem lehetne megválaszolni.

Ma már ismert és jól dokumentált, hogy a thrombociták mRNS-eket hordoznak, komplett fehérje szintetikus apparátussal valamint elegendő energia utánpótlást biztosító mitokondriumokkal is rendelkeznek [1-6].

Warshaw úttörő munkáját követően (amelyben L-leucin thrombocita-fehérjébe való beépülését igazolta) [7] számos megfigyelés látszott igazolni a thrombociták fehérje szintézisét különböző in vitro médiumokban [1,8-13].

Túl azon a tényen, hogy a thrombociták a megakariociták magjában szintetizált hosszú életű mRNS-eket tartalmaznak, egyes közleményekben arra is találunk utalásokat, hogy a fehérje szintézishez az információk esetleg a mitokondriumokból származnának [10,12,14]. A tanulmányok nagyobb része azonban megkérdőjelezi a mitokondriális eredetet és az információ nukleáris (megakariocita) eredetét valószínűsíti [1,13,15,16].

Szükségesnek látszik megjegyezni, hogy a fehérje szintetikus aktivitás in vitro vizsgálata során a vérből szeparált vérlemezkék jelentősen alacsonyabb aktivitással rendelkeznek mint pl. a fibroblasztok vagy egyéb sejt kultúrák hasonló körülmények között. Az elmúlt évek során bizonyítást nyert és az említettek részben magyarázatul is szolgál, hogy csak egy "fiatal" vérlemezke populáció rendelkezik ilyen képességgel, azaz a megakariocitákból történő kiszabadulás után csak rövid ideig szintetizálnak fehérjéket [1,3,17].

Az in vitro kísérletek során az alvadásgátlás, amely mindig szükséges a thrombociták integritásának vérpályán kívüli megtartásához szintén felelős lehet azért az alacsony fehérje szintetikus aktivitásért, amelyet a tanulmányokban, mesterséges körülmények között a thrombocitáknál általában tapasztaltak. Megfigyeléseink szerint az antikoagulációt a kalcium elvonásának egy mérsékelt és egyensúlyban tartott beavatkozásával ajánlott elérni [11,18], mert a heparin - abban a koncentrációban amely az antikoagulációt hatékonyan biztosítaná - a fehérje szintézist is gátolja.

Ismételt és jogos argumentum a thrombociták in vitro detektálható fehérje szintetikus képességével kapcsolatban az az ellenvetés, hogy az inkorporált jelzett aminosavak nem a thrombocitákból, hanem a "szennyező" fehérvérsejtekből származnának. Kétségtelenül utóbbiak jelenlétének lehetőségét a szeparált és "tisztított" thrombocita mintákban sem lehet soha teljes bizonyossággal kizárni. Thrombocita specifikus fehérjék újraképződésének célzott vizsgálatával kerülték meg rendszerint ezt a problémát.

Saját kísérleteink során a thrombocitákat in vitro vizsgálva a humán vérlemezkék fehérje szintetizáló képességét ^{35}S metionin inkorporáció és thrombocita specifikusnak talált "fehérje térképek" alapján sikerült megerősítenünk [18]. Egészséges egyének vérlemezkéit szeparálva, a thrombocitákban alacsony fehérje szintetikus aktivitásra utaló inkorporációs rátát találtunk. A különböző

thrombocita fehérjék megújulási rátáját szignifikánsan különbözőnek észleltük. Kétdimenziós poliakrilamid géllemezen fehérje térképeket készítve [ref.19 szerint] és a jelölt fehérjéket fluorográfiásan detektálva [20] egy tropomiozin-szerű fehérjét találtunk [21], amely a thrombocita fehérjék között legmagasabb szintetikus aktivitással rendelkezett. A vizsgálatok során mindvégig kihasználva a mások által e kérdéskörre nem alkalmazott két dimenziós O'Farrell technika előnyeit, a fehérje tropomiozin voltát molekulatömege, izoelektromos pontja [22,23], hőstabilitása [24], urea kezelése alapján [25,26], továbbá detergens rezisztens citoskeletonhoz kapcsolódása és antitropomiozinnal pozitív reakciója alapján is igazoltuk [23,27-31].

Közel 30 év telt el azóta, hogy Warshaw és mtsai először megfigyelték, hogy jelzett aminosav (^{14}C - Leucin) a thrombocita fehérjékbe in vitro inkorporálható [7]. Nem sokkal ezután, vagy a megfigyeléssel csaknem egyidejűleg Booyse és Rafelson azt találták, hogy a humán vérlemezkékben in vitro a **kontraktilis fehérjék** azok, amelyek a jelzett aminosavakat főleg tartalmazzák [8,9]. Ezzel a korai megfigyeléssel egybehangzónak látszott a tropomiozinra utaló észlelet, és a korábbi konklúziót megerősítette. Az 1967-ből idézett kísérleti sorozatban érthető okokból még nem végeztek differenciálást és pontos kémiai azonosítást a thrombocita kontraktilis proteinek molekuláris alkotórészei között. Nem sokkal ezután vált csak ismertté, hogy a thrombocita mint "nem izom" sejtfagment fehérje állományának mintegy 20%-át maga az aktin teszi ki, s 1.6%-ban tropomiozin egyéb aktinkötő fehérjék kíséretében.

Kiemelést érdemel az a saját megfigyelésünk, hogy a thrombocita fehérjéi között kísérleteink során mi nem észleltünk aktin szintézist az általunk használt in vitro vizsgálati körülmények között, az egészséges donoroktól nyert mintákban. Ez az észlelet eltér Kieffer és munkatársai megfigyelésétől, akik ITP-s betegek (Idiopatiás thrombocitopéniás purpura) "fiatal" thrombocita populációját vizsgálták és aktin szintézis jelenlétét sikerült legújabbán kimutatniuk [1]. Az említett és az ezt

megelőző korábbi tanulmányok kizárólag egydimenziós elektroforetikus elválasztást alkalmaztak fehérje azonosításhoz [1,11,13]. Sottile és munkatársai ismét eltérő kísérleti körülmények között cDNS Northern blot technikával aktinnak megfelelő mRNS transzkriptum jelenlétét igazolták egészséges donor egyén tisztítatlan thrombocita mintájában [4].

Változatlanul függőben maradt az a kérdés, hogy az egyes thrombocita fehérjék, így pl. a tropomiozin szelektíven magasabb in vitro szintetikus rátája érvényes-e in vivo a keringésben is, vagy csak in vitro körülmények között igaz. A megfigyelések úgy is értékelhetők ugyanis, hogy egy pozitívnak talált fehérje szintézise a mesterséges körülmény között kevésbé gátolt mint a többi fehérjéé. Minden további diszkusszió ezen a ponton a kérdéses mRNS feltételezett stabilitásának direkt megfigyelése nélkül inkább csak spekuláció lehet a fehérje szintézis thrombocitákban történő regulációjáról.

Visszatérve a bevezetőben megállapítottakra, a humán thrombociták in vivo fehérje szintézise két hetes életidejük alatt a **keringésben** még ma is sok kérdést tartogat megválaszolásra. Általában megállapítható, hogy az alacsony szintetikus aktivitásért a megakariocitákból folyamatosan és éppen kiszabaduló thrombociták felelősek, amelyek fokozatosan elvesztik ezt a képességüket. Az in vitro vizsgálatok technikai problémái miatt különösen embernél, a direkt információk magára a keringő vérré vonatkozóan hiányoznak. Az elmúlt évtizedek során megjelent különböző in vitro tanulmányok közötti ellentmondások részben magyarázhatók az eltérő vizsgálati körülményekkel, és ez magyarázná azokat a különböző észleleteket is, amelyek a membrán glikoproteinekre [6], az alfa-granulum proteinekre, mint pl. a fibrinogénre, a thrombospondinra [1], a thrombocita 4-es faktorra, valamint az aktinra [4] vonatkoznak. Saját kísérleti körülményeink között az újon szintetizált fehérjék sorában egy tropomiozin izoformot találtunk a legkiemelkedőbbnek.

Irodalom

- 1.) Kieffer, N., J. Guichard, J.-P. Farcet, W. Wainchenker, J. Breton-Gorius: (1987)
Biosynthesis of Major Platelet Proteins in Human Blood Platelets.
Eur. J. Biochem. 164, 189-195.
- 2.) Newman, P. J., J. Gaski, G. C. White, S. Gidwitz, C. J. Gretney, R. H. Aster: (1988)
Enzymatic Amplification of Platelet-specific Messenger RNA Using the
Polymerase Chain Reaction.
J. Clin. Invest. 82, 739-743.
- 3.) Roth, G. J., M. J. Hickey, D. W. Chung, D. D. Hickstein: (1989)
Circulating Human Blood Platelets Retain Appreciable Amounts of
Poly(A)⁺RNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 705-710.
- 4.) Sottile, J., D. F. Mosher, J. Fullenweider and J. N. George: (1989)
Human Platelets Contain mRNA Transcripts of Platelet Factor 4 and Actin.
Thromb. Haemostas. 62, 1100-1102.
- 5.) Wenger, R. H., A. N. Wicki, A. Walz, N. Kieffer, K. J. Clemetson: (1989)
Cloning of cDNA Coding for Connective Tissue Activating Peptide III from a
Human Platelet Derived gt11 Expression Library.
Blood 73, 1498-1503.
- 6.) Wicki, A. N., A. Walz, S. Gerber-Huber, R. H. Wenger, R. Vornhagen,
K. J. Clemetson: (1989)
Isolation and Characterization of Human Blood Platelet mRNA and
Construction of cDNA Library in gt11.
Thromb. Haemostas. 61, 448-453.
- 7.) Warshaw, A. L., L. Laster, N. R. Shulman: (1967)
Protein Synthesis by Human Platelets.
J. Biol. Chem. 242, 2094-2097.
- 8.) Booyse, F. M., jr. M. E. Rafelson: (1967)
Cell-Free Synthesis of Contractile Protein of Human Platelets: Its Location
and Role in Cellular Adhesiveness.
Blood 30, 553-554.
- 9.) Booyse, F. M., Jr. M. E. Rafelson: (1967)
In Vitro Incorporation of Amino Acids into the Contractile Protein of Human
Blood Platelets.
Nature 215, 283-284.
- 10.) Schneider, W., R. Dries, G. Kulenkampf: (1972)
Studies on the Protein and Nucleic Acid Synthesis of Normal Human Blood
Platelets.
Acta Univ. Carolinae (Med. Monog., Praha) 53, 113-117.

- 11.) Soslau, G., A. Rybicki: (1982)
In Vitro Incorporation of Fucose and Methionine into Human Platelet Proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 1256-1263.
- 12.) Soslau, G.: (1983)
De Novo Synthesis of DNA in Human Platelets.
Arch. Biochem. Biophys. 226, 252-256.
- 13.) Shaw, T., C.N. Chesterman, F.J. Morgan: (1984)
In Vitro Synthesis of Low Molecular Weight Proteins in Human Platelets: Absence of Labelled Release Products.
Thromb. Res. 36, 619-631.
- 14.) Agam, G., H. Bessler, M. Djaldetti: (1976)
In Vitro DNA and RNA Synthesis by Human Platelets.
Biochim. Biophys. Acta 425, 41-48.
- 15.) Booyse, F.M., Jr. M.E. Rafelson: (1967)
Stable Messenger RNA in the Synthesis of Contractile Protein in Human Platelets.
Biochim. Biophys. Acta 145, 188-190.
- 16.) Belloc, F., E. Heilmann, R. Combrie, M.R. Boisseau, A.T. Nurden: (1987)
Protein Synthesis and Storage in Human Platelets: a Defective Storage of Fibrinogen in Platelets in Glanzmann's Thrombasthenia.
Biochim. Biophys. Acta 925, 218-225.
- 17.) Booyse, F.M., T.P. Hoveke, Jr. M.E. Rafelson: (1968)
Studies on Human Platelets: Protein Synthetic Activity of Various Platelet Populations.
Biochim. Biophys. Acta 157, 660-663.
- 18.) Ludány, A., M. Kellermayer: (1988)
Protein Synthesis in Human Platelets.
Clin. Biochem. 21, 107-110.
- 19.) O'Farrell, P.H.: (1975)
High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins.
J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- 20.) Bonner, W.M., R.A. Laskey: (1974)
A Film Detection Method for Tritium Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
- 21.) Cohen, I., C. Cohen: (1972)
A Tropomyosin-Like Protein from Human Platelets.
J. Mol. Biol. 68, 383-387.
- 22.) Coté, G.P., W.G. Lewis, M.D. Pato and L.B. Smillie: (1978)

Platelet Tropomyosin: Lack of Binding to Skeletal Muscle Troponin and Correlation with Sequence.
FEBS Lett. 94, 131-135.

- 23.) Giometti, C.S., N.L. Anderson: (1981)
A Variant of Human Nonmuscle Tropomyosin Found in Fibroblasts by Using Two-Dimensional Electrophoresis.
J. Biol. Chem. 256, 11840-11846.
- 24.) Matsumura, F., S. Yamashiro-Matsumura, J.J.C. Lin: (1983)
Isolation and Characterization of Tropomyosin-Containing Microfilaments from Cultured Cells.
J. Biol. Chem. 258, 6636-6644.
- 25.) Coté, G.P.: (1983)
Structural and Functional Properties of the Non-Muscle Tropomyosin.
Mol. Cell Biochem. 57, 127-146.
- 26.) Sender, P.M.: (1971)
Muscle Fibrils: Solubilization and Gel Electrophoresis.
FEBS Lett. 17, 106-110.
- 27.) Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon: (1979)
Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4350-4354.
- 28.) Anderson, N.L., S.L. Nance, T.W. Pearson, N.G. Anderson: (1982)
Specific Antiserum Staining of Two-Dimensional Electrophoretic Patterns of Human Plasma Proteins Immobilized on Nitrocellulose.
Electrophoresis 3, 135-142.
- 29.) Dingus, J., S. Hwo, J. Bryan: (1986)
Identification by Monoclonal Antibodies and Characterization of Human Platelet Caldesmon.
J. Cell Biol. 102, 1748-1757.
- 30.) Onji, T., M. Takagi and N. Shibata: (1987)
Caldesmon Specifically Inhibits the Effect of Tropomyosin on Actomyosin System in Platelet.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 143, 475-481.
- 31.) Onji, T., M. Takagi, N. Uodome, N. Shibata, K. Aoki: (1989)
Tropomyosin-Caldesmon/Actomyosin Systems in Platelets and Arterial Smooth Muscle: Result from Exchange Experiments.
Biochim. Biophys. Acta 993, 248-253.



NAPJAINK LAPJAINKBAN

IMPAKT 5. évf. 3. szám, 1995. március

ISSN 1215-3702

TÉNYEK A TUDOMÁNYOS ALAPKUTATÁSRÓL

A tudósok gazdagságra vagy hírnévre vágynak?*

— Egyre gyakoribb, hogy a tudósok a nagyközönséghez szóló médiában adnak hírt felfedezéseikről, nem várva meg a szakmai folyóiratok ítéletét, ezzel azt is kockáztatva, hogy téves vagy elhamarkodott következtetéseket tesznek közzé. Válságban van a tudományos eredmények közzététele?

— Én ezt nem nevezném válságnak. Az biztos, hogy a kutatók soha nem voltak ennyire nyomás alatt. A mai erős versengésben a *Nature*-ben vagy más hasonló folyóiratban való megjelentetés életbe vágóan fontos a számukra, ettől függ, hogy előbbre jutnak-e pályájukon, hogy kapnak-e pénzt a kutatáshoz. Hetente mintegy kétszáz cikket küldenek nekünk. Ha egymásra raknánk a kéziratokat, többméternyi papírtorony képződne. Ebből a mennyiségből végül is csak tizenhét vagy tizennyolc írást jelentetünk meg.

— Kíméletlenül rostálniuk kell tehát! Milyen kritériumok alapján végzik ezt?

— Az első válogatást maguk a szerzők végzik, amikor csak a legjobb írásukat küldik el a *Nature*-nek. Ez magyarázza, hogy amióta 1966-ban átvettem a lap irányítását, a közzétételre küldött cikkek száma nagyjából változatlan. Emellett a közléshez elengedhetetlen a lektorok kedvező véleménye. A lektorok az érintett tudományterület avatott tudósai, akiknek átadjuk a cikket, hogy ítéljenek a minőségről. Az egész világon vannak lektoraink, a nyilvántartásunkban tizenhétézer név szerepel, minden tudományág és minden ország képviselői.

— Véleménye szerint nőtt-e az utóbbi időben a téves tartalmú vagy a gyenge minőségű cikkek száma?

— Az időkényszer miatt az emberek hajlamossá válnak arra, hogy engedjenek a gondosságból. A legsúlyosabb problémának azt tartom, amit "szalámitaktikának" nevezek. Az átadott cikk nem ad teljes áttekintést a kutatásról, mondjuk csak egy kísérlet leírása, érvelt értelmezés nélkül. Vagyis a kutató csak a munka egy részét dolgozza fel, s ezt közreadja, pedig valójában még volna mondanivalója. Így reménye van arra, hogy lesz egy cikke a *Nature*-ben, egy másik cikke egy másik folyóiratban, megint egy másik egy harmadikban, s mind a három cikk a közlendőknek csak egy részét tartalmazza. Ez a "szalámitaktika" nyilván arra jó, hogy a kutatónak több publikációja legyen.

— A publikációk száma többet hoz, mint a minőség?

— Igen, mert a kutatási intézmények vagy a finanszírozásról döntő bizottságok csak megszámlálják a publikációkat, de nem olvassák el őket. Ezért, amennyire lehet, arra törekszünk, hogy a nálunk megjelenő cikkek átfogóan dolgozzák fel az adott kutatást.

* Beszélgetés John Maddox-szal, a *Nature* főszerkesztőjével

Másrészt a tudósok gyorsan akarnak haladni, ezért nincs idejük utánanézni, hogy eredményeik milyen kapcsolatban vannak más kutatásokkal. Így az olvasó egyre nehezebben tudja összekötni azt ami nálunk jelenik meg, azzal, amit másutt publikáltak. Ez bizonyos zűrzavart teremt a tudományos irodalomban.

És végül itt van a kifejezett tévedés problémája. Elvileg ezt a lektorok ki tudják szűrni, még ha nem is csálhatatlanok. Persze, ha egy szerző manipulálja az adatokat, az mindenkit megtéveszt. De a logikátlanság, mondjuk két, ellentmondó eredményeket adó kísérlet, könnyen, észrevehető. Azt hiszem, a kirívó tévedéseket el tudjuk kerülni, de amit mi visszautasítunk, az gyakran másutt megjelenik. Így a tudományos irodalomban elkerülhetetlenül jelen vannak tévedések. Ami minket illet, rendkívülinek tekinthető, hogy meghamisított eredményeket tegyünk közzé, de mint minden folyóirat, mi is közöltünk néhány, tévedéseket tartalmazó írást.

— Mondana erre példát?

— Tavaly közöltünk a New York-i Columbia Egyetemről egy tanulmányt, amely nagy figyelmet keltett. A szerzők úgy vélték, találtak egy gyógyszerkombinációt, amely megakadályozza az AIDS-vírus mutációját. A hírt a New York Times az első oldalon hozta. Hat héttel később azonban kiderült, hogy a kísérletek nem voltak bizonyító erejűek, az adatok értelmezésébe pedig hiba csúszott. Szerkesztőségi cikkben adtunk magyarázatot a történetekre, nagyon nehezen tudtuk viszont meggyőzni a szerzőket, hogy írják meg tévedésüket, még ha az jóhiszemű volt is. Engem nagyon lesújtott, hogy a lektorok nem vették észre a hibát. Persze, az is előfordul, hogy a téves megfigyelések érdemi eredmények ösztönzőivé válnak.

— Elmondható ez a hidegfúzióról is?

— Nem. Nekem az a véleményem: Pons és Fleischmann nem tudta bizonyítani, hogy a jelenség reprodukálható, de ezt nem akarták beismerni. Utahi sajtókonferenciájukon bejelentették, hogy tanulmányukat elküldték a *Nature*-nek. Két napra rá meg is kaptuk, s tövábbi-

tottuk a bírálóknak. A lektoroknak számos ellenvetésük volt, különösen a hőmérsékleti mérésekkel kapcsolatban. Emlékszem, vasárnap hívtam fel Pons Utahban, azt kérve tőle, hogy válaszoljon az ellenvetésekre, mert a következő héten közölni akartuk a tanulmányt. Telefaxon küldött válasza lényegében azt tartalmazta: "Nincs időnk válaszolni a bírálóokra, mert mással kell foglalkoznunk, ezért visszavonjuk a tanulmányt." Kicsit egzaltálnak találtam ezt a magatartást, de a későbbiekből arra következtetek, hogy Pons és Fleischmann valójában nem tudtak válaszolni a lektorok megjegyzéseire.

— Ez a magatartás kivételes?

— A tudományban viszonylag gyakori, hogy a kutatók megszállottan hisznek abban, hogy nagy felfedezésre jutottak, még ha senki nem veszi is komolyan őket. Pons és Fleischmann esetében az súlyosbította a dolgokat, hogy első megfigyelésük után mindent titokban akartak tartani, nehogy valaki ellopja tőlük a felfedezést és meggazdagodjon belőle. Ez lehetlenné tette a vitát kísérleti adataik értelmezéséről.

— Nem várható-e titkolódzási mánia azokon a területeken, amelyek jelentős gazdasági tétet is képviselnek, például a genetikában?

— Elsősorban attól kell félnünk, hogy a kutatók eredményeik lényeges elemeit addig nem teszik közzé, amíg nem szereznek rájuk szabadalmi védelmet. Ennek elkerülésére mindent megteszünk, hogy a publikációink teljesek legyenek. Például, ha valaki leírást ad egy különleges génről, de nem mondja meg, hogyan különítette el, a tanulmány nem adjuk ki. A szerző erre dönthet úgy, hogy mindent titokban tart, ami nagyon sajnálatos lenne. Ezzel együtt a kutatás nagyobb részét nem érintik ezek a problémák. Egyébként is, ki tudhatja, milyen genetikai felfedezéseknek lesz nagy gazdasági jelentőségük?

— A közlések megbízhatóságát azonban befolyásolhatja az ilyesmi.

— A tudósok ma kettős szorításban vergődnek: meggazdagodni és publikálni. Én azt hiszem, a publikálás vágya erősebb a meggazdagodás vágyánál. Van nekik problémák, de a kutatók többsége tisztességes, és szereti a munkáját

*Michael de Pracontal, Le Nouvel Observateur, 28 (1994) 12-13.
(A Valóságban (1994. X. hó p118) megjelent fordítás alapján.)*

Nem okatlan ambíció egy kutatónál ha dicsőségre vágyik. De ha valaki meggazdagodás vagy hatalomszerzés céjából adja magát kutatásra, nem neki való dolgot végez.

FLEMING ALEXANDER
(1881 - 1955)

Nem a nyomor, nem a mohóság - nem, hanem a hatalom szeretete az emberek démona.

NIETSCHE FRIEDRICH
(1844 - 1900)

Az idézetelemzéses értékelés határai

Kicsit bátrabban *A tudománymetria határai* címet is adhattam volna ennek a kis írásnak. Arról van szó ugyanis, hogy véleményem szerint a tudománymetria — annak ellenére, hogy számokkal dolgozik — legfeljebb csak "kvázi-kvantitatív" lehet, semmiképpen sem teljesen kvantitatív.

Ennek kimondása részéről azért merészség, mert a tudománymetria ma már valóban külön tudomány, amelynek világszerte elismert művelői vannak és eredményeit a kutatásértékelési gyakorlat semmiképpen sem nélkülözheti. Erről nem lehet vita. Jómagam viszont — bár kutató vagyok, nem ennek a tudományágnak a művelője.

A tudománymetria nagyon fiatal tudomány, ezért különösen gyors a fejlődése, változása. Rövid története folyamán — jellemző paramétereit illetően is — számos változáson esett át. Így aztán, ha mégoly komoly vitát ingerlő megállapításokkal is — vagy különösen azok által —, remélhető, hogy hozzá tudunk járulni további fejlődéséhez.

Az idézetek kvantitatív értékelésének mindenekelőtt az szab határt, hogy a *cikkek manapság általában többszerzősek*: a természettudományokban az egyszerű cikk kivételszámba megy. A több szerző közül pedig a legtrikább esetben fordul elő az, hogy minden szerző hozzájárulása pontosan azonos a cikkben közölt eredmény eléréséhez. Így tehát nem járható út az idézetek számának egyszerű osztása a szerzők számával. Az a tény, hogy a cikkeknel az egyes szerzők neve után nem szerepel százalékarány, amely relatív súlyukat jellemezné a szóban forgó eredmény létrehozásában, már önmagában is kvalitatív irányba tolja el az idézetelemzést. Vegyük még hozzá, hogy a szerzők egyike lehet akár Nobel-díjas, vagy más, különösen kiemelkedő tudós egyéniség. Ezért az ilyen cikkre vonatkozó sok idézet esetleg elsősorban ennek is tulajdonítható. Kérdés tehát, hogy e szóban forgó cikk idézeteit milyen súllyal kell figyelembe venni egy másik szerző (egy nem Nobel-díjas) esetén.

Tegyük fel továbbá, hogy egy cikk, amelyre igen sok a hivatkozás, *egy táblázat vagy egy technikai fogás*. Természetesen ezek igen fontos eredmények lehetnek, azonban kétségtelen, hogy más súlyúak, mint egy olyan eredmény, amely ténylegesen "tartalmilag" vitte előbbre az adott tudományterületet. A kérdés ismét az, hogy hogyan lehet ezt *kvantitatíve* figyelembe venni.

Igazuk van azoknak, akik arra mutatnak rá, hogy az idézetek között különbség van. Más a súlya annak, ha egy "review" cikk hosszan tárgyalja az idézett cikk eredményeit, esetleg ábrákat is átvész belőle, mintha csak számos más cikkre hivatkozva, köztük felsorolja a kérdéses cikket is. A nem "review" cikkeknel is hasonlóan más a súlya annak, ha csak meg van említve a cikk (sok más felsorolt munka között, amelyek az adott kérdéssel foglalkoztak), mintha a további vizsgálatokban tényleg rá, illetve eredményeire támaszkodnak. Ezért javasolják egyesek, hogy valaki munkásságának értékelésénél ne csak "számokkal operáljunk", hanem idézzünk elismerő szövegeket egyes "mértékadó" hivatkozásokból. [1]

Mindezek után viszont megint azt lehet kérdezni, hogy hogyan lehet mindezt "kvantitatíve" megtenni, illetve, hogy hova lett a "kvantitatívítás".

Van olyan álláspont, hogy nem az idézetek össz-számát kell figyelembe venni, mint "mértékszámot", hanem az *egy cikkre jutó idézetek számát* (az idézetek száma osztva a cikkek számával). Ezzel is vigyáznunk kell azonban, mivel vannak "termékeny" kutatók, akik talán több cikket írnak, mint optimális volna. Viszont ezzel együtt lehetséges, hogy vannak igen jelentős "sok idézetes cikkek" is, amelyeket az idézetek átlagolása elfed. Más álláspont szerint csak ezeket a "sok-idézetes" cikkeket kell figyelembe venni egy kutató értékelésénél, illetve egyáltalán az értékelésnél. Természetesen itt is fel lehet vetni, hogy mennyi a "sok idézet", ha az ilyen cikkek számával akarjuk összehasonlítani az egyes kutatók teljesítményét.

Ma már nem lehet kétséges, hogy a tudománymetriát, ill. annak a cikkek és idézetek elemzésével foglalkozó részét semmi körülmények között nem lehet negligálni. Nem szabad azonban sohasem elfelejteni, hogy a kutatásértékelés nagyon összetett feladat. Nemcsak, hogy nem lehet valakinek vagy akár csoportoknak, témáknak az értékelését egy számmal elintézni, de számos más tényezőt (pl. meghívás nemzetközi konferenciákra összefoglaló előadások megtartására, vagy ugyanott tanácsadó bizottsági tagság, stb., és persze a "peer review"-t) is figyelembe kell venni. A cikk- és idézetelemzés csak egy része a kutatásértékelésnek, amely a fentiekben kifejtettek szerint a benne rejlő bizonytalanság miatt *legfeljebb "kvázi-kvantitatív"* tekinthető.

Az előbbi állítások még inkább igazak, ha nemcsak a természettudományokat tekintjük, hanem a tudományok egészét. A tudományos teljesítmények értékelése — általánosan fogalmazva — mindig az *eredmények vizsgálatát* jelenti. Nem hiába az egyesült államokbeli "Office of Naval Research" megfelelő kézikönyvének címe: "The Handbook of Research Impact Analysis" [2].

A végső következtetésem, hogy *semmilyen tudománymetriai elemzés nem helyettesíti, csak segítheti az adott területhez való szakmai hozzáértést*. Ha más nem is, az e jegyzetben előadott érvek — úgy gondolom — egyértelműen erre mutatnak. Máskülönbön — ezen megfontolások fényében — elfogadhatatlannak tartom az olyan követelményrendszert, amely egy adott fokozat stb. eléréséhez meghatározott számú idézetet kíván meg (még akkor se, ha "mértékadó" idézetet kötnek ki), még csak nem is az egy cikkre eső átlagos idézetet vagy valami "finomabb" paramétert. Amelyeknek "egyértelműsége" különben az e megjegyzésben előadottak szerint szintén megkérdőjelezhető.

Berényi Dénes, ATOMKI, Debrecen

- [1] H. Small, Citation context analysis, Progress in Communication Science, 3 (1982) 387.
[2] R.N. Kostoff, The Handbook of Research Impact Assessment, First Edition, Summer, 1994. Office of Naval Research, Arlington, USA

DEBRECENI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
BIOKÉMIAI INTÉZET



1994

TARTALOMJEGYZÉK

A DOTE Biokémiai Intézetének múltja, alapítója és első professzora, Dr. Tankó Béla életútjának tükrében (írta: Dr. Zsindely Áttila)	1
A Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézete 1973-1993 (írta: Dr. Elődi Pál)	10
Tények, adatok, információk (összeállította: Dr. Keresztes Tamásné)	21
Hazai és külföldi kollaboráció	21
Az 1973-1993 között szerzett tudományos fokozatok	23
Külföldi tanulmányutak	26
Oktatók kitüntetései	30
Tudományos rendezvények	32
Eltávozott munkatársak	33
Publikációs jegyzék 1973-1993	34
Részlet Dr. Fésüs László tanszékfoglaló előadásából	80
A Biokémiai Intézet munkatársai 1994 októberében	90

A Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézete történetének első évtizedeit összefoglaló, izléses kiállítású kis kötet számomra nemcsak a gondtalan diákeveket, hanem a pályára való felkészülésem háborús szelektől és viharoktól kísért éveit is felidézi. A negyvenes évek elején a biokémia még nem volt kötelező tantárgy, így Tankó Béla magántanári előadásait magánszorgalomból halgattam - élvezettel és azzal a meggyőződéssel, hogy biokémiai alapok nélkül nem lehetek jó orvos. '46 őszétől már a budapesti Szent-Györgyi intézet munkatársaként - a pesti intézetben láthattam viszont Tankó tanár urat. Ismétlődő látogatásaiból megsejtettem, hogy nagy célért küzd: intézet alapítói, tudományos és oktatói munkásságát életútjának tükrében foglalja össze a kötet.

1973 nyarán új otthont kapott az intézet s új tanszékvezető professzorral új feladatok megoldását tűzte ki célul mind az oktatás, mind a kutatás területén. Elődi professzor az oktatói munka tárgyi és személyi feltételeit magas nemzetközi színvonalra emelte, a kutatásnak pedig új irányait indította el. Az intézet hazai és nemzetközi tudományos kapcsolatait kiszélesítette s fiatal munkatársai külföldi tanulmányútjaival gazdagította.

Az intézet munkájába 1986-ban bekapcsolódott Fésüs László 1993-ban tanszékvezetői kinevezést nyert. Az aoptózis (természetes sejthalál) kutatásával új téma művelését, új molekuláris biológiai program megindítását, új módszerek bevezetését kezdeményezte. (Biokémia XVIII(2)53-58, 1994.)

W.Churchill szerint - minél messzebb tudunk visszatekinteni, annál távolabbra látunk előre. A debreceni intézet születésekor a mai biokémiai ismereteknek 90%-a még ismeretlen volt. Sok lehetőség kínálkozik tehát az előrelátásra. (bd)

FEBS**THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES**

A Registered Charity

Chairman of the Advanced Courses Committee

Professor Dr. Horst Feldmann

Institut für Physiologische Chemie der Universität

Schillerstraße 44 D-80336 München

Tel: #49 89 5996 451/439 Fax: #49 89 5996 316

E-Mail: feldmann@dec1.bio.med.uni-muenchen.de

FEBS ADVANCED COURSES 1996**96-01: Molecular Mechanisms of Signalling and Targeting**

Lecture Course (18 lecturers; 100 students)

Spetsai (Greece): August 18-30, 1996

Professor Dr. Karel W.A. Wirtz,

Centre for Biomembranes and Lipid Enzymology, Utrecht University,

P.O.Box 80.854, 3508 TB Utrecht (The Netherlands)

Tel: +31-30-533 443; fax: +31-30-522 478

Deadline for applications: May 1, 1996

96-02: Structure and Function of Interacting Protein Domains in Signal and Energy Transduction

Lecture Course (18 lecturers; 80 students)

Maratea - Acquafredda (Italy): September 10-19, 1996

Prof. Dr. Ludwig M.G. Heilmeyer jr.,

Ruhr Universität Bochum, Institut für Physiologische Chemie, Abt. für Biochemie

Supramolekularer Systeme, D-44780 Bochum (Germany)

Tel: +49-234-700-2428,9; fax: +49-234-7094-193

Deadline for applications: May 31, 1996

96-03: Basic and Specialized Techniques in Cell Biology

Practical Course (8 lecturers; 22 students)

University of Aarhus (Denmark): June 10-19, 1996

Prof. Dr. Julio E. Celis,

Institute of Medical Biochemistry and Danish Centre for Human Genome Research,

University of Aarhus, Ole Worms Allé build. 170, DK-8000 Aarhus C (Denmark)

Tel: +45-89-422 880; fax: +45 86 131 160

Deadline for applications: April 1, 1996

96-04: Mechanisms in Eukaryotic Gene Regulation

Lecture Course (24 lecturers; 120-140 students)

Island of Spetses (Greece): Sept. 2-12, 1996

Prof. Dr. Horst Feldmann,

Institute of Physiological Chemistry, University of Munich, Schillerstraße 44,

D-80336 München (Germany)

Tel: +49-89-5996-451/439; fax: +49-89-5996-316

Deadline for applications: April 30, 1996

96-05: Comparative Developmental Biology

Lecture Course (15 lecturers; 40 students)

Ischia (Naples)/ (Italy): May 11-17, 1996

Prof. Dr. Roberto Di Lauro,

Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Villa Comunale I, 80 121 Naples (Italy)

Tel: +39-81-583 32 78; fax: +39-81-583 32 85

Deadline for applications: December 31, 1995

96-06: An Introduction to animal cell culture techniques for biochemists

Practical and Lecture Course (10 lecturers; 16 students)

Dublin City University (Ireland): June 24-July 3, 1996

Prof. Dr. Martin Clynes,

National Cell & Tissue Culture Centre,

Dublin City University, Glasnevin, Dublin 9 (Ireland)

Tel: +353-1-704 57 00; fax: +353-1-704 54 84

Deadline for applications: March 1st, 1996

96-07: Neurotransmitter Release and Uptake

Lecture Course (22 lecturers; 80 students):

Kusadasi (Turkey): April 21-30, 1996

Prof. Dr. Sakire Pöğün,

Ege University Center for Brain Research, Ege University School of Medicine,

Department of Physiology, Bornova, 35100 Izmir (Turkey)

Tel: +90-232-388 28 68; fax: +90-232-374 65 97

Deadline for applications: December 11, 1995

96-08: Chemistry of Metals in Biological Systems

Practical and Lecture Course (28 lecturers; 40 students)

Wavre/Louvain-la-Neuve (Belgium): May 8-18, 1996

Prof. Dr. Robert R. Crichton,

Unité de Biochimie, Université Catholique de Louvain, Place Louis Pasteur 1,

B-1348 Louvain la-Neuve (Belgium)

Tel: +32-10-472 794; fax: +32-10-472 796

Deadline for applications: January 31st, 1996

96-09: Oxidative Phosphorylation: Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology

Practical and Lecture Course (27 lecturers; 85 students)

University of Bari (Italy): May 6-17, 1996

Prof. Dr. Sergio Papa,

Institute of Medical Biochemistry and Chemistry, University of Bari,

Piazza G. Cesare, 70124 Bari (Italy)

Tel: +39-80-278 428; fax: +39-80-278 429

Deadline for applications: January 31, 1996

96-10: Basic Methods in Yeast Genetics and Molecular Biology

Practical and Lecture Course (5 lecturers; 20 students)

Institut de Botanique Strasbourg (France): July 15-26, 1996

Prof. Dr. Jean-Luc Souciet,

URA-GEM (CNRS and Université Louis Pasteur)

Institut de Botanique, 28, rue Goethe, F-67083 Strasbourg (France)

Tel: +33-882 44 163; fax: +33-883 58 484

Deadline for applications: March 1, 1996

Államigazgatástan

BUCHWALD TÖRVÉNYE

Arthur Bloch

Ha a gazdaság rendbe jön, minden egyéb
tönkremegy.

Murphy törvénykönyve - Gondolat, 1985



ADÓ

anno 1516

és adószedés

A fejedelem környezetében egyesek állandóan azon törnek a fejüket, hogy milyen címen tudnának újabb és újabb összegeket kicsikarni a népből. Közben meg vannak győződve, hogy ők helyesen sáfárkodnak a nép vagyonával, és nem veszik észre, hogy tulajdonképpen ellenségei a népnek.

Inkább arra kell törekedni, és inkább azon kell gondolkozni, hogy miképpen lehet a lehető legkevesebbet kisajtolni a lakosságból. Az adónövelés leghasznosabb módja az lenne, ha a fejedelem csökkentené a felesleges kiadásokat, ha a lebzselő szolgákat elzavárná, ha a háborúkat és az ezekhez hasonló külföldi utazásokat elkerülné, ha a hivatalnokok kapzsóságát fékezné, és ha inkább arra törekednék, hogy birodalmát helyesen kormányozza, nem pedig arra, hogy birodalmát kiterjessze.

Ha a szükség úgy kívánja, hogy néha mégiscsak kell adót szedni a néptől, a fejedelem szent kötelessége ezt úgy végrehajtani, hogy a kispénzűek a legkisebb kárt szenvedjék. Mert az, hogy a gazdagokat jobb gazdálkodásra készíttjük, az lehet hasznos is. Ámde a szegényeket éhhalálba kergetni, ez egyrészt embertelen, másrészt pedig egyáltalán nem biztonságos dolog.

A fejedelem vagyona akkor növekszik leginkább, ha csökkenti a kiadásokat, vagy ahogy a közmondás mondja: leghasznosabb adó a takarékoság.

o o o

„Ezen a világon semmire sem mondhatjuk, hogy biztos, kivéve a halált és az adót.”

FRANKLIN, BENJAMIN

amerikai nyomdász, államférfi, író
(1706 - 1790)

„Az infláció legtöbbször nem egyéb, mint a kormány által gyakorolt óriásméretű rablás egy formája; a kormány költi el azt, amit az állampolgár megtakarított.”

SZENT-GYÖRGYI ALBERT
(1893 - 1986)