

ENZIMSZERKEZET, ENZIMEK LOKALIZÁCIÓJA*

SZABOLCSI GERTRUD

SZBK Enzimológiai Intézete, Budapest

A 60-as években a biokémia eljutott odáig, hogy meghatározza a kis-molekulasúlyú, 120—150 aminosavból álló fehérjék kémiai szerkezetét, aminosav-sorrendjét. A biokémikusok és biofizikusok együttműködésével már meghatározható volt ezen fehérjék térszerkezete is. Sőt, mi több, szerény hozzájárulásunkkal a fehérjeszerkezet dinamikus volta is bizonyítást nyert.

Mínt hogy azonban, a biológiailag aktív fehérjék (enzimek, transzport- és immun-fehérjék stb.) döntő többsége nagymolekulasúlyú, több polipeptidláncból álló egység (oligomer fehérjék), ezután került napirendre ezen nagyobb egységek kémiai és fizikai sajátosságainak felderítése. A 60-as évek végén határozták meg Cambridge-ban az első 143 000-es mólsúlyú oligomér fehérje, a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (továbbiakban GAPD) aminosav-sorrendjét (DAVIDSON és mtsai 1967, HARRIS és mtsai 1968). Ez a fehérje 4 azonos kémiai szerkezetű alegységből áll, melyek egyenként 333 aminosavat tartalmaznak és 10 évvel az elsődleges szerkezet leírása után tartunk ott, hogy jó közelítéssel ismerjük ennek a fehérjének térszerkezetét is (OLSEN és mtsai 1976). A 70-es években került napirendre a nagymolekulasúlyú fehérjék megismerése. Az oligomér fehérjéknek az a közös sajátossága, hogy az egyes alegységeket összetartó erők nem kovalens kötések, mint pl. a peptidkötések vagy a diszulfid hidak, hanem úgynevezett „másodlagos erők” (H-hidak, hidrofób kölcsönhatások, sókötések).

Ezekkel a kutatásokkal szinte egyidejűleg, egy új irányzat is előtérbe került. A biokémikusok és biofizikusok már nemcsak az egyedi fehérjéket vizsgálták, hanem kölcsönhatásaikat egyéb fehérjékkel, a sejt egyéb alkotó elemeivel, lokalizációjukat a sejten belül. Ismeretessé vált pl., hogy olyan enzimek, melyek az élő szervezetben egymás utáni reakciókat katalizálnak — gyakran komplexet alkotnak egymással. Felépítésük azokhoz az egyedi fehérjékhez hasonló, melyek azonos vagy néha különböző polipeptid láncból alakulnak oligomér szerkezetűvé.

Az elmúlt évek során az én érdeklődésem is a fenti két témakörben mozgott. Ebből a két témakörből szeretnék egy-egy munkát bemutatni.

* Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1980. április 12-én.

Az egyik munka során, kristályosan előállítható, nagy molekulásúlyú, oligomér fehérjét vizsgáltunk. Nagyon leegyszerűsítve, azt a kérdést vetettem fel, hogy vajon „meddig enzim egy oligomér fehérje”. Ismeretes, hogy a fehérje szintézis során kialakulnak a polipeptid lánc peptidkötései és kialakul az aminosavsorrend által meghatározott, az aktív centrum működését biztosító natív térszerkezet. A kérdés az volt, hogy oligomér szerkezetű fehérje esetén, megbontható-e a kész polipeptidlánc anélkül, hogy az alegységek szétesnének és vajon az egész, *intakt* szerkezet szükséges-e a katalitikus aktivitáshoz, az aktív centrum szerkezetének fenntartásához.

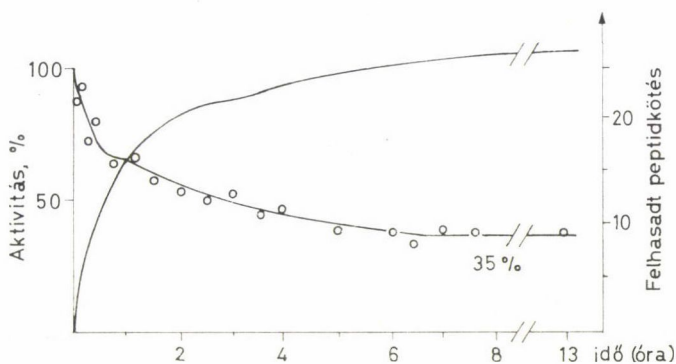
Mikor ezeket a vizsgálatokat elkezdtem, már volt példa arra, hogy egy *kisméretű*, kovalens kötésekkel stabilizált szerkezetű enzimet meg lehet bontani. Ez az enzim a 124 aminosavból álló ribonukleáz. An enzim, azon kívül, hogy kisméretű, térszerkezetét *négy* helyen stabilizálják diszulfid (—S—S—) hidak. RICHARDS és VITHAYATHIL (1959) tudott olyan körülményeket találni, amelyek között a szubtilizin nevű proteolitikus enzim hatására a ribonukleáz nem bontódott le teljesen, hanem csak ún. limitált proteolízis következett be: a fehérje 20. és 21. aminosava között, *egyetlen* peptidkötés hasadt fel. Ezáltal keletkezett egy 20-tagú peptid (1—20 aminosavak), melyet kovalens kötés már nem tartott össze a fehérje többi részével. Ennek, akkori tudásunk szerint, oldatba kellett volna mennie. Ez a peptid mégis kötve maradt a fehérjén, bár csak az úgynevezett „gyenge erők” kötik a fehérjéhez. Ez a módosított enzim aktív marad. A peptidet el lehet távolítani a fehérjéről anélkül, hogy azt denaturálnák. Ekkor a csonka enzim inaktív. Ha azonban visszaadják a fehérjéhez az eltávolított peptidet, az „megtalálja eredeti helyét”, visszakötődik és az enzim újra aktív lesz.

Merrifield laboratóriumában érdekes vizsgálatokat végeztek ezzel az enzimmal, amelyek azt mutatják, hogy a jelenségek nem olyan egyszerűek (TEPLÁN 1974, HODGES és MERRIFIELD 1975). Ismeretes volt, hogy a ribonukleáz C-terminális részéről, egymás után le lehet hasítani néhány aminosavat és ekkor az enzim inaktív lesz (Aufinsen 1955). Merrifield laboratóriumában 6 aminosavat hasítottak le az enzimről, majd szintetizálták a hiányzó peptidet, de ez nem „talált vissza” a helyére és a fehérje inaktív maradt. A fehérje C-terminális részének 14-tagú peptidjét kellett szintetizálni ahhoz, hogy az a csonka enzim megfelelő helyére kötődjék vissza. Tehát egy átfedő peptidrészlet kellett ahhoz, hogy a polipeptid lánc kiegészüljön és visszanyerje enzimátikus aktivitását.

Mi nagy fába vágtuk a fejszénket, nem kis fehérjét vizsgáltunk, hanem mint már említettem, több alegységből álló, oligomér enzimet: az aldolázt. Az aldoláz minden élőlényben megtalálható, mi nyúlizomból vontuk ki és kristályosítottuk. Az enzim nagyon érdekes reakciót katalizál, nevezetesen C—C kötés hasítását — ami a vegyésznek semleges pH-n és 37 °C-on nem megy. Korábban, munkatársaimmal sokat foglalkoztunk az enzim és az aktív centrum

szerkezetével. Az aldoláz 4 alegységből áll (KAWAHARA és TANFORD 1966) és egy alegység is 364 aminosavat tartalmaz. Tehát már egy alegység is nagy fehérjének számít. Szeretném felhívni a figyelmet arra is, hogy az enzim térszerkezetét nem stabilizálják diszulfid kötések. Bár a munka megkezdésekor távol álltunk az aminosavsorrend ismeretétől, mind SAJGÓ, mind LAI előzetes vizsgálataira utaltak, hogy az alegységek kémiai szerkezete azonos és ezt később be is bizonyították (SAJGÓ és HAJÓS 1974, LAI és mtsai 1974). Az aldoláz térszerkezete még ma sem ismeretes, az enzimkristályok nem alkalmasak röntgen diffrakciós vizsgálatokra, tehát csak kémiai és fizikai-kémiai módszerekkel tudjuk közelítőleg leírni.

Sikerült olyan körülményeket kidolgoznunk, melyek között, ha az aldolázt kevés tripszinnel emésztjük — ez nem emésztődik meg teljesen, azaz limitált proteolízist idéztünk elő (BISZKU és SZABOLCSI 1964, BISZKU és mtsai 1964, BISZKU és mtsai 1973, SOLTJ és mtsai 1975).



I. ábra. Az aldoláz-T keletkezésének időfüggése. A kihúzott vonal a felhasadt peptidkötések számát jelenti a tetramér aldolázra számítva (automatikus kiíró szerkezettel felvett görbe); o, az aktivitás csökkenés folyamata. A vonal kétlépéses konzekutív reakció elméleti görbéje

Az I. ábrán látható, hogy a limitált proteolízis során az enzimaktivitás az emésztési elegyben 35%-ra csökken, majd állandó marad. Az emésztés 26 peptidkötés/tetramer felhasadása után áll le, azaz később, mint az aktivitás csökkenés. A csonka enzimet gélszűrővel izoláltuk az emésztési elegyből és aldoláz-T-nek, azaz tripszinnel kezelt aldoláznak neveztük el. A fehérje homogénnek bizonyult (vö. 2. ábra, A, B, és C elektroferogram) és stabilis volt. Minthogy a csonka enzim keletkezése során a polipeptid láncok tekintélyes része kihasadt, az izolált aldoláz-T *specifikus aktivitása* az eredeti aktivitás 50%-a lett. Tehát egy erősen megcsonkított, de még félig aktív enzim volt a kezünkben.

Az aldoláz-T, azaz a csonka enzim keletkezési mechanizmusának és szerkezetének felderítése sok izgalmat és örömet szerzett csoportunknak, mely szövetkezett Sajgó Mihály fehérje analitikus és Závodszy Péter fizikus kollegákkal.

I. táblázat

Az aldoláz-T keletkezése során kihasadó peptidek. A peptideket jellemző aminosav tartalmuk alapján neveztük el. Az N_t peptid a fehérje 27-tagú N-terminális peptidjét jelöli. A C₁, C₂ és C₃ peptidek nem tartalmazznak olyan aminosavat, melynek alapján kvantitatíve meg lehetne határozni. A zárójelben levő számok becslült értékek.

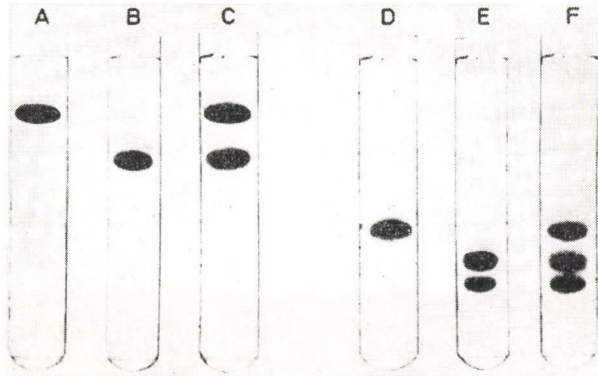
A peptidek elnevezése	TYR-A	TYR-B	TYR-C	TRP	CYS	N _t	C ₁	C ₂	C ₃
mól peptid	4	2	2	2	2	4	(2)	(2)	(2)
tetramer aldoláz									

Az aktivitás csökkenés, a kinetikai analízis alapján, két lépéses konszekutív reakciónak bizonyult. Egy gyors lépésben az aktivitás 70%-osra csökken és egy sokkal lassúbb, konszekutív lépésben áll be a 35%-os végleges aktivitás. Tehát két meghatározott helyen történő hasítás hozza létre a csökkent aktivitást. Ezzel szemben a felhasadt peptidkötések száma 26. Ez a szám először is túl nagy, ezenkívül pedig nem osztható négygel — és az enzim 4 alegységből áll. A jelenség értelmezését még bonyolította, hogy Sajgó 9 különböző peptidet izolált az emésztési elegyből. Ezek az adatok sehogyan sem voltak összeegyeztethetők, minthogy ahhoz, hogy 9 peptid lehasadjon egy tetramerből, minimálisan 36 kötés kell felszakadjon. Már a peptidek kvalitatív analízisének azonban kiderült, hogy szerencsénk van.

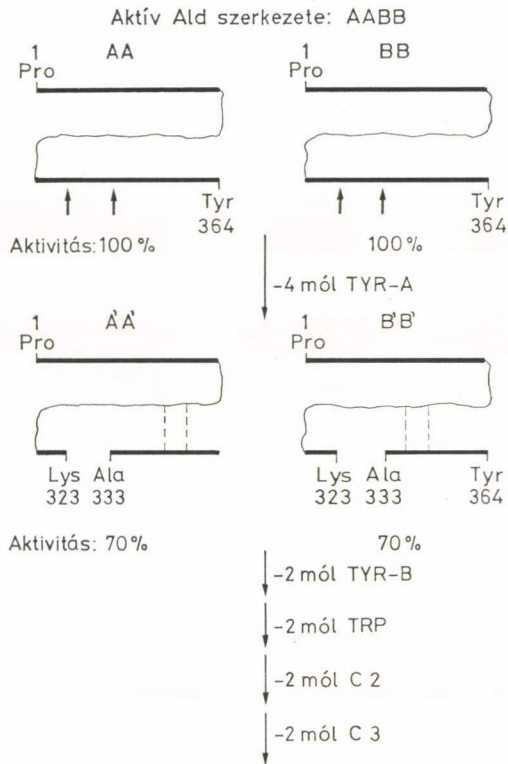
A 9 peptid közül 6-nak a kihasadása kvantitatíve meghatározható (I. táblázat) és a kihasadás kinetikája analizálható. Az elegyben 3 tirozin-, 1 triptofán- és 1 cisztein-tartalmú peptidet találtunk. Lehasadt továbbá a fehérje 27-tagú N-terminális peptidje is (N_t-peptid). Az emésztési elegy csak 3 olyan peptidet tartalmazott, melynek kihasadását nem lehetett kvantitatíve követni, a C₁, C₂ és C₃ peptidek.

A kvantitatív analízis füresa eredményt adott. Az analizálható peptidek közül csak kettő hasad ki *mind a 4 alegységből*: A TYR-A és az N_t peptidek. A többi csak két alegységből hasad ki. Az emésztés tehát nem egyformán érinti a négy alegységet. Az I. táblázatban, a C-peptidek alatt zárójelben levő számok azt jelentik, hogy feltételeztük, hogy ezek is csak két alegységből hasadnak ki. Ezekkel az adatokkal és egy feltételezett peptid szekvenciával, már el tudtunk számolni a 26 peptidkötés felhasadásával. A feltételezett szekvencia helyességét SAJGÓ és HAJÓS (1974) később igazolta.

A jelenségben az volt a megdöbbentő, hogy annak ellenére, hogy az aldoláz alegységei azonos primér szerkezetűek, mégis tripszines emészthetőségük páronként különbözőnek bizonyult. Ezt a következtetést alátámasztották a gélelektroforézis vizsgálatok is. Az aldoláz-T homogén fehérje, jól elkülöníthető a natív enzimtől. Natrium dodecilsulfátban végzett gélelektroforézissel pedig, két, különbözőképpen megcsónkított alegység mutatható ki (2. ábra, D, E és F elektroferogram).

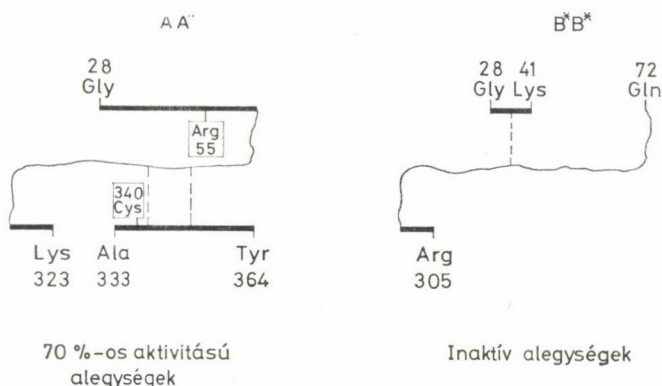


2. ábra. Az aldoláz és aldoláz-T poliakrilamidgél elektroforézises vizsgálata. A, B és C, rendre: intakt aldoláz, aldoláz-T és a kettő keveréke. D, E és F, Na-dodecilsulfátban végzett elektroforézis, rendre: intakt aldoláz, aldoláz-T és a kettő keveréke



3. ábra. Az aldoláz-T keletkezésének sémája (a hasítás első lépése). A páronként különböző viselkedésű alegységekből csak egyet-egyét ábrázoltunk. Szaggatott vonalakkal jelöltük, hogy az Ala-333-Tyr-364 peptid nem-kovalens kötésekkel kapcsolódik a fehérje többi részéhez

tás csökkenése. Az aktivitás csökkenés leállása után még lehasad a fehérje N-terminálisa felől egy 27-tagú peptid, az N_t-peptid — még hozzá mind a négy alegységből. Úgy látszik, ez a részlet sem szükséges az enzimaktivitáshoz. Így alakul ki az a furcsa szerkezetű enzim, melyet aldoláz-T-nek nevezünk (5. ábra). Az aldoláz-T két A-helyzetű alegysége csonka — mégis 70%-os aktivitású. A B-helyzetű alegységekből a láncnak majdnem egyharmada hiányzik — ez inaktív. Így az emésztési elegyben mért aktivitás 35%, de az elegyből izolált csonka enzim mennyiségére számított ún. *specifikus aktivitás* 50%.



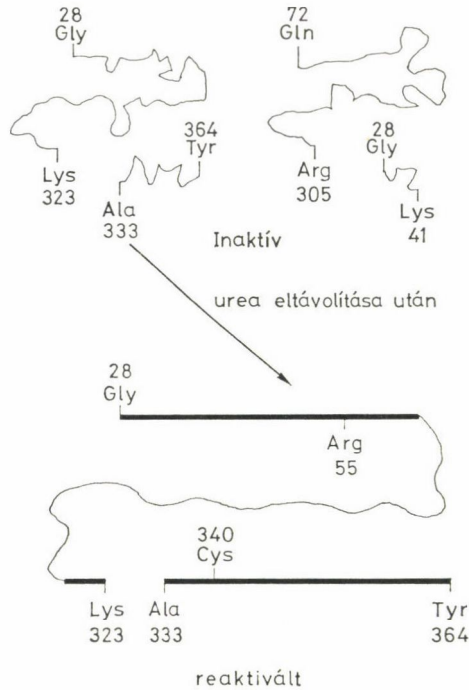
5. ábra. Az aldoláz-T szerkezetének sematikus ábrázolása. Az izolált csonka enzim specifikus aktivitása, az eredeti aktivitás 50%-a

ZÁVODSZKY és BISZKU (1967) vizsgálatai szerint az aldoláz-T kompakt tetramér — bár az ember valamilyen laza, instabilis terméket várna. Az alegységeket összetartó erők tehát olyan erősek, hogy ilyen nagymérvű csonkítás után is megmarad az oligomér szerkezet.

Az 5. ábrán látható, hogy a részlegesen aktív A-helyzetű alegységekben van egy nem-kovalens kötéssel tartott peptid-részlet (334—364). Minthogy ismeretes volt, hogy az aldoláz 4 M ureában reverzibilisen denaturálható (STELLWAGEN és SCHACHMAN 1962), megvizsgáltuk, hogy mi történik az aldoláz-T-vel ureában. Mint a 6. ábra mutatja, ureában, amikor a polipeptidláncok kigombolyodnak, a nem-kovalensen kötött részletek oldatba mennek — ezt kísérletesen bizonyítottuk — az enzim inaktív. Ha azonban az ureát eltávolítjuk, de a peptid az elegyben marad, a csonka enzim is reaktiválódik. A 30-tagú C-terminális peptid „visszatalál” a megfelelő helyre és valószínűleg az eredetileg A-helyzetű alegységek állnak össze tetramérré. Nemigen tudnánk elképzelni, hogy az erősen megcsonkított B-helyzetű polipeptidláncokból denaturáció után még egyszer fehérje lesz.

Az aldoláz-T keletkezésével és reverzibilis denaturációjával bizonyítottuk tehát, hogy:

1. Diszulfid hidakkal nem stabilizált, nagyméretű, tetramér fehérje megcsonkítható és kihalászható belőle több részlet anélkül, hogy ez az aktivitást



6. ábra. Az aldoláz-T reverzibilis denaturációjának sematikus ábrázolása. Felső séma: az aldoláz-T-t 4 M ureával kezeltük és aktivitását 4 M ureát tartalmazó pufferben mértük. Alsó séma: az ureával kezelt csonka enzimet pufferrel hígítottuk és aktivitását pufferben mértük. Ha az ureát dialízissel távolítottuk el, ami az oldatban levő peptideket is eltávolítja, akkor a fehérje inaktív volt

lényegesen befolyásolná. Nyilvánvaló, hogy a hasítások nem érintették az aktív centrum térszerkezetét.

2. Az erősen megcsomósított fehérje megtartja tetramér szerkezetét. A hasítások tehát nem érintették az alegységek közötti kontakt felszíneket sem.

3. A csonka enzimen egy-egy peptidrészlet nem-kovalens erővel is kapcsolódhat a fehérje többi részéhez. Egy 30-tagú peptid még reverzibilis denaturáció után is specifikusan visszakötődik a helyére.

4. A natív aldoláz teljes peptidláncára szükség van ahhoz, hogy az aktív centrum és az alegységek közötti szoros kölcsönhatások kialakuljanak. Ha azonban ezek már kialakultak — a polipeptidlánc számos részlete kihasználható a fehérjéből. Érdeemes megjegyezni, hogy az ún. gyenge erők kooperatív kölcsönhatása milyen nagyfokú stabilitást biztosít a fehérjének, hiszen, mint említettem, az aldoláz térszerkezetét nem stabilizálják diszulfid hidak.

Az eddig ismert vizsgálatok egyedi, izolált enzim saját magával alkotott komplexéről szóltak. Az elmúlt évtizedben azonban leírtak számos olyan enzimkomplexet is, melyekben különböző funkciójú enzimek létezhetnek szoros kölcsönhatásban, ezek együtt is izolálhatók a sejtéből. Ezek az enzimek

általában az anyagsereutak egymást követő lépéseit katalizálják és az ún. multienzim komplexek képződése nagymértékben fokozhatja az anyagsere „hatékonyságát”. GREEN és mtsai (1965), majd FRIEDRICH (1974) vetette fel, hogy valószínűleg az egyedileg könnyen izolálható glikolitikus enzimek is, a sejtben komplexet alkotnak és nem „úszkálnak” szabadon a citoplazmában. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy a sejtben igen magas a fehérje koncentráció, ami kedvez az asszociációnak. OVÁDI és KELETI (1978), OVÁDI és mtsai (1978), valamint PATTHY és VAS (1978) kísérletei azt bizonyították, hogy az izolált izom aldoláz és a GAPD, tömény oldatban *in vitro* is képez komplexeket. A vörösvérttest (továbbiakban vvt) GAPD egyes szerzők szerint a membránnal alkot komplexet, aminek az lenne a fiziológiás jelentősége, hogy a kívülről a sejtbe jutó anorganikus foszfát a „helyszínen” átalakulhatna makroerg foszfáttá (KANT és STECK 1973, YU és STECK 1975). Ezt a nagyon tetszetős elképzelést azonban többen kritizálják. A GAPD ugyanis csak erősen hipotóniás közegből izolált membránhoz kötődik, izotóniás körülmények között a kötődés nem mutatható ki. MARETZKI és mtsai (1974), valamint FUJII és SATO (1975) a komplexet műterméknek tartják.

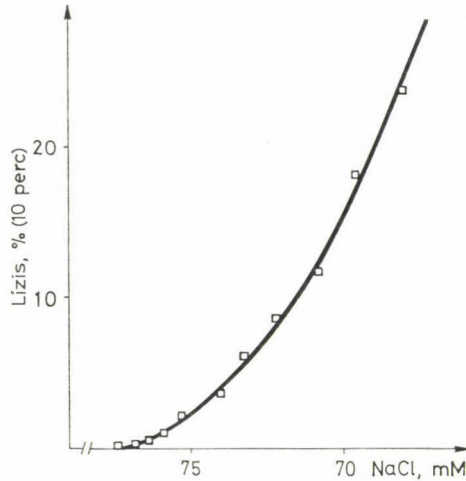
Az új kutatási irányzat és a fenti vitatott eredmények ismeretében térünk át az egyedi enzim vizsgálatáról az enzimrendszerek vizsgálatára. A továbbiakban nem izom enzimekkel, hanem a vörösvérttest enzimeivel foglalkoztunk. Vvt-vel foglalkozott Intézetünkben Friedrich Péter és Solti Magda, valamint Straub Brunó és Biszku Etelka is.

Enzimek, enzimrendszerek lokalizációjának meghatározását próbáltuk megközelíteni — az eddigiektől eltérő módszerekkel, amelyek talán jobban tükröznék a fiziológiás állapotot. — STRAUBnak (1953) egy immár klasszikus eredményéből indultunk ki. Eszerint a vvt membrán — enyhén hipotóniás közegben — átjárhatóvá válik olyan metabolitok számára is, amelyekre nézve egyébként impermeábilis. STRAUBnak sikerült nemcsak „megcsapolnia”, de „fel is töltenie” a vvt-t cukorfoszfáttal, GÁRDOSnak (1954) pedig egy különleges trükkal még ATP-vel is.

Megnéztük tehát, hogy a membrán átjárhatóvá válik-e nemcsak kis molekulákra, hanem makromolekulákra, *fehérjékre* nézve is. (CSEKE és mtsai 1978).

Ismeretes, hogy enyhén hipotóniás közegben a vvt-be víz áramlik be és só áramlik ki, a sejt megduzzad. STRAUB és GÁRDOS eredményei szerint a sejt duzzadása megfeszíti a hártyát, amelyen *átmenetileg* pórusok nyílnak és ez teszi lehetővé, hogy a membrán átjárható legyen, egyébként impermeábilis anyagokra nézve. Minthogy a kiáramló sejt tartalom lecsökkenti az ozmózis nyomás különbséget, egy idő után a fiziológiás impermeabilitás helyreáll. Hangsúlyozni kívánom, hogy ezen idő alatt a pórusok állandóan nyílnak és záródnak, a membrán egy pulzáló rendszerhez hasonlítható.

Az enyhén hipotóniás közeg relatív fogalom. Mint ismeretes, az izotónia a 154 mM NaCl oldat ozmózis nyomásának felel meg, mégis az átlagos vvt



7. ábra. Emberi vörösvértest lízisének foka a külső ozmózis nyomás függvényében. Egy térfogat mosott vörösvértestben négy térfogat NaCl oldatot adtunk az abszcisszán feltüntetett koncentrációban és 10 percig tartottuk 0 °C-on, majd a sejteket 900 g-val kiülepítettük. A lízis fokát a sejtmentes felülúszóban található koleszterin tartalomból számoltuk

mintáknál 80–78 mM-os NaCl-dal való kezelés még nem okoz lízist (7. ábra). Amint azonban a NaCl koncentrációt tovább csökkentjük, a lízis erősen növekszik. Megvizsgáltuk, hogy a 80–73 mM NaCl koncentráció tartományban a vvt membrán átjárható-e fehérjékre nézve. A kilenc vizsgált fehérjét és azok mólsúlyát a 2. táblázat foglalja össze. Természetesen vizsgáltuk a K^+ kiáram-

2. táblázat

Vizsgált fehérjék

	Mólsúly
<i>Glikolízis</i>	
3-Foszfoglicerát kináz (PGK)	48 000
Triózfoszfát izomeráz (TPI)	56 000
Tejsav dehidrogenáz (LDH)	140 000
Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPD)	145 000
Aldoláz	160 000
<i>Pentózfoszfát sönt</i>	
6-Foszfoglukonát dehidrogenáz (6-PGD)	105 000
Glukóz-6-foszfát dehidrogenáz (G-6PD)	210 000
<i>Egyéb fehérjék</i>	
Szénsavanhidratáz (CA)	30 000
Hemoglobin (Hb)	68 000

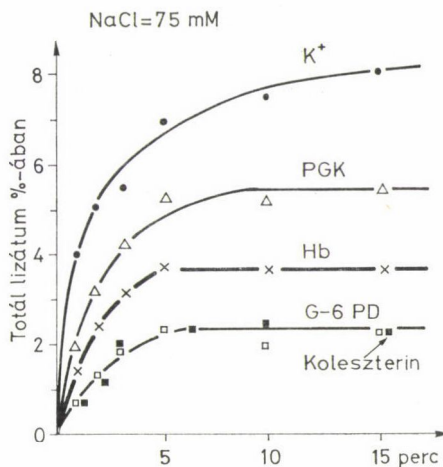
lását is. Mint látható, a 30 000-es mólsúlyú szénsavanhidratáz és a 210 000-es mólsúlyú G-6PD között a legkülönbözőbb méretű fehérjék kiáramlását tanulmányoztuk.

Egy tipikus kísérlet időfüggését mutatja be a 8. ábra. Hogy elkerüljük a túlzásfolt ábrát, csak három, különböző méretű fehérje kiáramlását tüntettük fel. Mint látható, a fehérjék megjelennek a sejtmentesített felülúszóban, de az eredeti sejttartalomhoz képest, *különböző százalékban*. Tehát a duzzadt sejtek membránja átjárható fehérjékre nézve is. Az elegy egyaránt tartalmazza a lizált sejtekből eredő fehérjéket és a *duzzadt* sejtekből kiáramló fehérjéket. Ezért furcsa jelenség, hogy a G-6PD alacsonyabb százalékban található az elegyben, mint a hemoglobin, hiszen köztudomásúlag a lízis fokát a hemoglobinnal mérik. Ez a jelenség az egész vizsgált NaCl koncentráció tartományban fennáll, ami azt jelenti, hogy a hemoglobin *csak teljes lízis* esetén mértéke a sejt pukkanásnak — egyébként nem az.

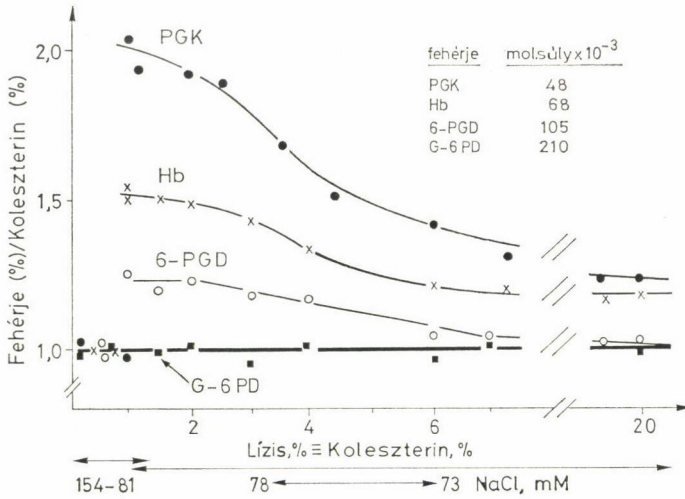
Mint hogy a kísérleti körülmények között a lizált sejtek membránja a centrifugálással sejtmentesített felülúszóban marad, úgy véltük, hogy az irreverzibilis sejt-pukkanás mértékéül a membrán tartalmat kell vennünk, illetve az ezzel arányos koleszterin tartalmat. A gázkromatográfiás vizsgálatok azt mutatták, hogy a G-6PD a koleszterinnel azonos százalékban található a felülúszóban, tehát *csak* a lizált sejtekből szabadul ki — a duzzadt sejtekből nem.

Itt jegyzem meg, hogy az irodalomban ismeretes egy nem jól deffiniált fogalom — a *praehemolitikus* hemoglobin veszteség jelensége. Valószínűleg ezt a jelenséget észlelte több kutató, csak nem lehetett értelmezni.

A 9. ábrán a lízis fokának függvényében tüntettük fel a kiszabadult fehérjék és a koleszterin arányát. Ebből a kísérlet sorozatból a következők tűnnek szembe:



8. ábra. Részleges lízis időfüggésének tipikus kísérlete. A rövidítéseket vö. 2. táblázat



9. ábra. A kiszabaduló fehérjék és a koleszterin aránya a lízis fokának függvényében. A mosott vörösvértesteket 10 percig inkubáltuk 0°-on különböző, csökkenő koncentrációjú NaCl oldatokban. Minthogy a lízis foka adott ozmózis nyomásnál, a vérmintáktól függően kismértékben változik, az abszcissa alatt jelöltük meg az alkalmazott NaCl koncentráció tartományt. A rövidítéseket vö. 2. táblázat

1. 154 és kb. 80 mM NaCl-dal való kezelés során 0,5 — 1,0% lízis észlelhető, azaz valamennyi vizsgált fehérje és a koleszterin azonos százalékban jelenik meg a felülúszóban, arányuk = 1. Ez valószínűleg a manipuláció során megsérült sejtek lízisét tükrözi. A mennyiség függ a vérmintától és saját ügyességünktől. Lehetséges, hogy idetartozik a sejtpopuláció legöregebb frakciója is, amely az ozmózis nyomás csökkenésére nagyon érzékeny (SIMON és TOPPER 1957).

2. Ha azonban az ozmózis nyomást csak csekély mértékben is csökkentjük, a görbe diszkontinussá válik, a 48 000-as molsúlyú PGK-ból pl. kétszer annyi jelenik meg, mint amennyi a sejtek líziséből várható lenne. A többi fehérje pedig molekulásúlyának megfelelően, rendre egyre kisebb mennyiségben jelenik meg. Úgy tűnik tehát, hogy a vvt membrán — enyhén hipotóniás közegben — úgy viselkedik, mint egy molekuláris szűrő, egy molekuláris méretekkel rendelkező szita: minél kisebb egy fehérje, annál nagyobb mennyiségben szabadul ki a duzzadt sejtéből.

A jelenséget a következőképpen képzeljük el: ha a fehérjék eloszlása a sejtben egyenletes és az átmenetileg nyitva levő pórusok sugara közel azonos, akkor — első közelítésben — a kiszabadulás valószínűségére a következő lehetőségek vannak: a) a fehérje sugara sokkal kisebb, mint a pórus sugara — a kiáramlás valószínűsége igen nagy, b) a fehérje sugara közelít a pórus sugár méretéhez — a kiszabadulás valószínűsége egyre csökken és c) a két sugár egyenlő, vagy a fehérje sugara nagyobb, mint a pórusé — a fehérje nem szabadul ki. Ebből következik, hogy a nem-litikus eredetű, tehát molekuláris szűrésből eredő

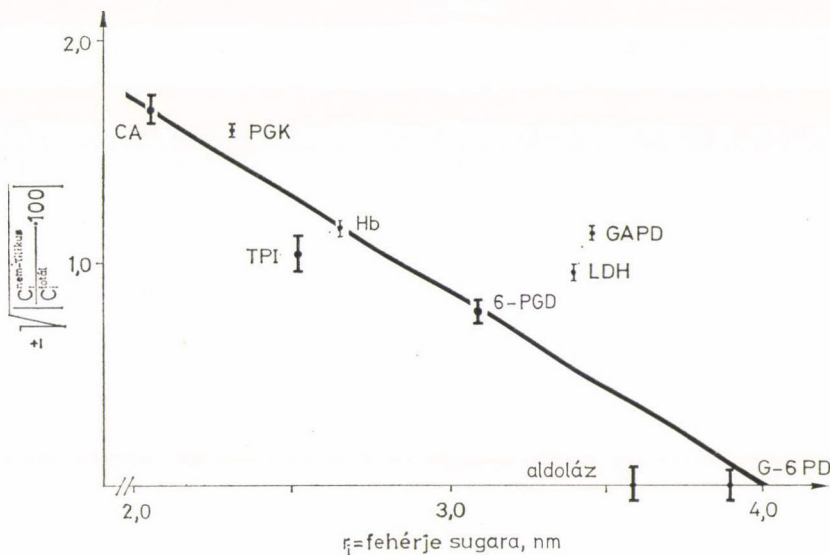
fehérje frakció egyenesen arányos egy olyan kör területével, melynek sugara, a pórus és a fehérje sugarának különbsége (1. egyenlet)

$$\frac{C_i^{\text{nem-litikus}}}{C_i^{\text{total}}} = k\pi(r - r_i)^2 \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol k a külső ozmózisnyomás függvénye, r a pórus és r_i a fehérje sugara. Ha tehát a molekuláris szűrésből eredő fehérje frakció négyzetgyökét ábrázoljuk a fehérjesugár függvényében, akkor egyenest kell kapnunk. Mindazon fehérjék pontjai, amelyek egyenletes eloszlásban vannak a sejtben, az egyenesre fognak esni. Azok a fehérjék, amelyek a membránnal vagy egyéb fehérjével komplexet alkotnak, az egyenes alá fognak esni, a komplex K_D -jétől függően. Ha azonban, valamely fehérje a sejtfelület közelében lokalizált, a koncentrációja nagyobb azon a helyen, ahol a molekuláris szűrés bekövetkezik, mint az egész sejtben, az ennek megfelelő pont, ábrázolt összefüggésünkben az egyenes fölé fog esni.

A vizsgált 9 fehérje közül csak négy esik az egyenesre, ezek egyike a hemoglobin (10. ábra). Úgy tűnik, ezek a fehérjék egyenletes eloszlásban vannak a vvt-ban és méreteik szerinti mennyiségben szabadulnak ki a duzzadt sejtből és a pórus mérete nem nagyobb a C-6PD méreténél.

A vizsgált glikolitikus enzimekkel más a helyzet. Egyik sem esik rá az egyenesre.



10. ábra. A molekuláris szűrés és a fehérjék sugara közötti összefüggés. A függőleges vonalak a standard hibát jelölik. Az ábra értelmezését vö. 1. egyenlet és szöveg. A fehérjék neveinek rövidítését lásd 2. táblázat

1. A PGK-, GAPD- és LDH-ból lényegesen több jön ki, mint amennyi a sugara szerint várható lenne. Ez arra utal, hogy ezek a fehérjék a sejtfelszín közelében a membrán alatt helyezkednek el. Nem valószínű, hogy a membránhoz kötődnek, hiszen akkor várhatóan *kevesebb* lövelne ki belőlük, mint az egyenletes eloszlásban levő fehérjékből. A GAPD-re vonatkozó következtetéseinket újabban megerősítették SOLTI és mtsai (33) eredményei, melyek szerint úgy tűnik, hogy az intakt sejtben triciált jód-ecetsavval jelzett GAPD, a membrán alatt helyezkedik el.

2. Nézzük a TPT-t és az aldolázt. Mindkettőből *kevesebb* szabadul ki, mint amennyi egyenletes eloszlás esetén várható lenne. Az egyenlet értelmezése szerint az aldoláz csak a lizált sejtekből jön ki, pedig a nem sokkal kisebb méretű LDH-ból jóval több áramlik ki, mint mérete szerint várható lenne. SOLTI és FRIEDRICH (1976) egyéb vizsgálatai alapján nagyon valószínűtlen, hogy az aldoláz olyan szorosan kötődne a membránhoz, hogy a duzzadt sejtéből ne szabadulhatna ki.

Mint ismeretes, az aldoláz, a TPI és a GAPD egymást követő reakciókat katalizálnak. Mint már említettem, OVÁDI és KELETI (1978), OVÁDI és mtsai (1978), valamint PATHY és VAS (1978) kimutatta, hogy az izolált izom GAPD komplexet képez az aldolázzal. Plauzibilisnek tűnik, hogy a vvt-ben az aldoláz a TPI-vel és/vagy a GAPD-val alkot komplexet és talán ezért tűnik olyan nagyméretűnek, hogy nem szabadul ki a duzzadt sejtéből.

Természetesen, ezeket a komplexeket összetartó erők nem lehetnek olyan erősek, mint pl. a fent említett aldoláz alegységei közötti kölcsönhatások. Az aldoláz, a TPI és a GAPD egy része, a disszociációs állandóknak megfelelően, szabadon kell legyen és kijöhetne a duzzadt sejtéből. Ezért lehetséges az is, hogy a kiáramló GAPD mennyisége, ami ugyan az egyenes fölé esik, *kevesebb*, mint ami helyzetéből adódna, hiszen egy része lehet, hogy komplexben van. Úgy látszik, hogy a szabadon levő aldoláz mennyisége olyan kicsi, hogy nem tudjuk kimutatni.

A 10. ábra adatai tehát *egyrészt* azt mutatják, hogy a vvt membrán enyhén hipotóniás közegben *molekuláris szűrőként* viselkedik, *másrészt* azt is mutatják, hogy a glikolitikus enzimek egy része a sejtfelszín közelében, a membrán alatt helyezkedik el. Két glikolitikus enzim pedig úgy tűnik, hogy komplexet alkot egymással és lehet, hogy harmadikkal is.

A vvt-vel végzett vizsgálataink még folyamatban vannak. Azért bátorodtam belevonni egy akadémiai székfoglaló előadásba nem lezárt munkát is, mert úgy gondolom, hogy mindig az új irányzat az érdekes és előre mutató.

Amikor ezt a munkát összeállítottam, eltűnődtem a fehérje-biokémia fejlődésén az elmúlt évtizedekben. Önkéntelenül is kitört belőlem a „néhai vegyész” és a lebontás és a szintézis analógiája jutott eszembe. Ahhoz, hogy egy vegyület szerkezetét megállapítsuk, ezt mind a lebontás, mind a szintézis

módszereivel igazolni kell. Az enzimek, ill. valamennyi biológiailag aktív fehérje működési mechanizmusának, a működés szerkezeti alapjainak felderítéséhez, a sejteket szét kellett roncsolni. Ebben az időszakban tért át a fehérje-biokémia a jelenségek empirikus leírásáról a tudományos megállapítások korszakába. Ma már ott tart a fehérje kutatás, hogy a szintézis felé tolódhat. Az egyedi fehérje szerkezetének és működési mechanizmusának felderítése mellett, már napirendre került az anyagszere szabályozása mechanizmusának felderítése, ami a fehérjék egymás közötti és a sejt egyéb alkotó elemeivel való kölcsönhatásokon alapul. Így integrálódik ma a fehérje kutatás a sejtbiológia egyéb ágazataival.

Végezetül nemcsak kutatótársaimnak, hanem laboratóriumunk valamennyi munkatársának (Majzik Illésné, Földi Attiláné, Papp Éva) szeretném kifejezni köszönetemet jó és ötletes munkájukért. Most sem szeretnék megfedkezni néhai Gróh Gyula professzorról, aki mellett megtanultam dolgozni és szeretve tisztelt mesteremről, néhai Szörényi Imre akadémikusról, aki nemcsak tudományos szemléletre és szigorú kritikára, hanem emberségre is nevelte — az akkori fiatalokat.

IRODALOM

- ANFINSEN, C. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 593—594 (1955).
 BISZKU, E. és SZABOLCSI, G.: *Acta Physiol. Hung.* **25**, 169—178 (1964).
 BISZKU, E., BOROSS, L. és SZABOLCSI, G.: *Acta Physiol. Hung.* **25**, 161—167 (1964).
 BISZKU, E., SAJGÓ, M., SOLTÍ, M. és SZABOLCSI, G.: *Eur. J. Biochem.* **38**, 283—292 (1973).
 CSEKE, E., VÁRADI, A., SZABOLCSI, G. és BISZKU, E.: *FEBS Lett.* **96**, 15—18 (1978).
 DAVIDSON, B. E., SAJGÓ, M., NOLLER, H. F. és HARRIS, J. I.: *Nature* **216**, 1181—1185 (1967).
 FRIEDRICH, P.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 159—173 (1974).
 FUJII, T. és SATO, M.: *J. Clin. Chem.* **3**, 453—459 (1975).
 GÁRDOS, G.: *Acta Physiol. Hung.* **6**, 191—199 (1954).
 GREEN, D. E., MURER, E., HULTIN, H. O., RICHARDSON, S. H., SALMON, B., BRIERLY, G. P. és BAUM, H.: *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 635—647 (1965).
 HARRIS, J. I., DAVIDSON, B. L., SAJGÓ, M. és NOLLER, H. F.: *Enzymes and Isoenzymes. Structure, Properties and Function. Proc. V. FEBS Meeting (1968). Vol. 18*, pp. 1—15. Ed.: D. Shugar. Acad. Press. London—New York (1970).
 HODGES, R. S. és MERRIFIELD, R. B.: *J. Biol. Chem.* **250**, 1231—1241 (1975).
 KANT, J. A. és STECK, T. L.: *J. Biol. Chem.* **248**, 8457—8464 (1973).
 KAWAHARA, K. és TANFORD, C.: *Biochemistry* **5**, 1578—1584 (1966).
 LAI, C. Y., NAKAI, N. és CHANG, D.: *Science* **183**, 1204—1206 (1974).
 MARETZKI, D., GROTH, J., TSAMAKOULAS, A. G., GRÜNDE, M., KRÜGER, S. és RAPOPORT, S.: *FEBS Lett.* **39**, 83—87 (1974).
 OLSEN, K. W., GARAVITO, R. M., SABESAN, M. N. és ROSSMANN, M. C.: *J. Mol. Biol.* **107**, 577—584 (1976).
 OVÁDI, J. és KELETI, T.: *Eur. J. Biochem.* **85**, 157—161 (1978).
 OVÁDI, J., SALERNO, C., KELETI, T. és FASELLA, P.: *Eur. J. Biochem.* **90**, 499—503 (1978).
 PATTHY, L. és VAS, M.: *Nature* **276**, 94—95 (1978).
 PATTHY, L., VÁRADI, A., THÉSZ, J. és KOVÁCS, K.: *Eur. J. Biochem.* **99**, 309—313 (1979).
 RICHARDS, F. M. és WITHAYATHIL, P. J.: *J. Biol. Chem.* **234**, 1459—1465 (1959).
 SAJGÓ, M. és HAJÓS GY.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 239—241 (1974).
 SIMON, E. R. és TOPPER, Y. J.: *Nature* **180**, 1211—1212 (1957).
 SOLTÍ, M. és FRIEDRICH, P.: *Molec. and Cell Biochem.* **10**, 145—152 (1976).

- SOLTI, M., BISZKU, E., SAJGÓ, M. és SZABOLCSI, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **10**, 185–199 (1975).
- SOLTI, M., BARTHA, F., HALÁSZ, N., TÓTH, G., SIROKMÁN, F. és FRIEDRICH, P.: *J. Biol. Chem.* (1981. sajtó alatt).
- STELLWAGEN, E. és SCHACHMAN, H. K.: *Biochemistry* **1**, 1056–1068 (1962).
- STRAUB, F. B.: *Acta Physiol. Hung.* **4**, 235–240 (1953).
- SZAJÁNI, B., FRIEDRICH, P. és SZABOLCSI, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **4**, 265–272 (1969).
- SZAJÁNI, B., SAJGÓ, M., BISZKU, E., FRIEDRICH, P. és SZABOLCSI, G.: *Eur. J. Biochem.* **15**, 171–178 (1970).
- TEPLÁN, I.: *MTA Kémiai Oszt. Közleményei* **41**, 437–454 (1974).
- ZÁVODSZKY, P. és BISZKU, E.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **2**, 109–112 (1967).
- YU, J. és STECK, T. L.: *J. Biol. Chem.* **250**, 9176–9184 (1975).